

# Atti del 12° Convegno AISITEC

## CEREALI E SCIENZA:

resilienza, sostenibilità e innovazione

**15-17 giugno 2022**

Dipartimento di Agraria  
Università degli Studi di Napoli Federico II  
Reggia di Portici, Portici (NA)



A cura di

**R. Acquistucci, M. Blandino, M. Carcea, M.G. D'Egidio, E. Marconi,  
M.A. Pagani, G. Panfili, G.G. Pinnavaia, R. Redaelli**

**Atti del 12° CONVEGNO AISTEC**

**CEREALI E SCIENZA:  
resilienza, sostenibilità e innovazione**

**15-17 giugno 2022**

**Dipartimento di Agraria  
Università degli Studi di Napoli Federico II  
Reggia di Portici, Portici (NA)**

A cura di

**R. Acquistucci, M. Blandino, M. Carcea, M.G. D'Egidio, E. Marconi,  
M.A. Pagani, G. Panfili, G.G. Pinnavaia, R. Redaelli**

Volume interamente pubblicato dall'AISTEC

Gli autori sono responsabili del contenuto dei loro lavori

In copertina: Sfogliatrice-Sgranatrice per mais (1899) - Centro MUSA, Portici (NA)

© 2022 Associazione Italiana di Scienza e Tecnologia dei Cereali AISTEC

c/o Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria - Centro di ricerca Alimenti e Nutrizione

Via Ardeatina 546 - 00178 Roma (RM)

ISBN: 978-88-906680-7-4

***Con il patrocinio e la collaborazione di:***



*CREA - Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria*



*ENEA - Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile*



*CAISIAL - Centro di Ateneo per l'Innovazione e lo Sviluppo dell'Industria Alimentare*



*Cluster Agrifood Nazionale*



*SISTAL - Società Italiana di Scienze e Tecnologie Alimentari*



*FIDAF - Federazione Italiana Dottori in Scienze Agrarie e Forestali*



*CNR - Consiglio Nazionale delle Ricerche*





ACCADEMIA DEI GEORGOFILI

*Accademia dei Georgofili*



*SINU - Società Italiana di Nutrizione Umana*



*SIA - Società Italiana di Agronomia*



*AISSA - Associazione Italiana Società Scientifiche Agrarie*



**ANTIM**  
Associazione Nazionale  
Tecnici dell'Industria Molitoria

*ANTIM - Associazione Nazionale Tecnici dell'Industria Molitoria*



*Ente Nazionale Risi*



*Centro Interateneo di Eccellenza per la Ricerca e l'Innovazione  
su Pasta e CeREali*

***Con il contributo di:***



*Chiriotti Editori - Pinerolo (TO)*

**NAMAD**

*Namad - Tecnologie Alimentari e Impianti, Roma*



*Antimo Caputo SRL*

**emme3**  
your lab choice

*EMME 3 S.r.L.*

## Prefazione

Il 12° Convegno dell'Associazione Italiana di Scienza e Tecnologia dei Cereali (AISTEC) si è svolto dal 15 al 17 giugno 2022 presso la Reggia di Portici (NA), ospitato dal Dipartimento di Agraria dell'Università di Napoli Federico II e ha celebrato il ritorno in presenza dopo i 2 anni di blocco delle attività congressuali dovuti alla pandemia da Covid19.

Sono intervenuti oltre 130 esperti per fare il punto sulle più recenti acquisizioni scientifiche nel campo della scienza e tecnologia dei cereali in un sistema agroalimentare che ha mostrato alta resilienza anche in tempo pandemico e che richiede innovazione, produttività, economicità, sostenibilità, qualità e attitudine alla trasformazione in funzione della destinazione d'uso, sicurezza e alto valore nutrizionale.

Sono stati presentati 107 contributi (tra comunicazioni orali e posters) nell'ambito di 6 sessioni scientifiche che hanno riguardato la selezione genetica e l'agronomia, la gestione e la sostenibilità delle filiere, i trattamenti tecnologici e l'ottimizzazione di processo, il pane e la salute, i nuovi ingredienti e le innovazioni tecnologiche, le materie prime alternative ed i nuovi prodotti alimentari. I partecipanti hanno anche potuto ascoltare una relazione magistrale sulle dinamiche del mercato dei cereali ed in particolare sui fattori strutturali, congiunturali e sugli effetti della situazione geo-politica da parte del Presidente ISMEA.

Il convegno ha offerto anche momenti di aggiornamento per la presenza di espositori di strumentazione scientifica oltre che momenti culturali e di convivialità nel corso della cena sociale presso la splendida Villa Campolieto. Durante la manifestazione sono stati inoltre assegnati 2 premi (offerti dalla Chiriotti Editori) per i migliori poster: uno, intitolato alla memoria di Giovanni Chiriotti, per il miglior poster su tecnologie innovative nel settore della trasformazione e utilizzazione dei cereali e uno per il miglior poster sulle tematiche del convegno, rivolto a giovani ricercatori.

Il presente volume raccoglie 77 lavori che sono stati presentati come comunicazioni orali o poster al convegno e testimonia la vivacità scientifica della ricerca italiana nello specifico settore. I manoscritti forniti dagli autori sono stati rivisti per la stampa dal Comitato di Redazione. Il comitato desidera ringraziare la Dott.ssa Elisa De Arcangelis ed il Sig. Francesco Martiri per il prezioso supporto fornito nella raccolta dei lavori e nell'assemblaggio del presente volume.

### Il Comitato di Redazione

*Rita Acquistucci*

*Massimo Blandino*

*Marina Carcea*

*Maria Grazia D'Egidio*

*Emanuele Marconi*

*Maria Ambrogina Pagani*

*Gianfranco Panfili*

*Gian Gaetano Pinnavaia*

*Rita Redaelli*

# Indice

## RELAZIONI ORALI

<b>Filiere sementiere biologiche regolamentate di popolazioni evolutive di frumenti: una importante risorsa per il settore biologico - il progetto Breed4Bio</b> .....	2
<i>S. Folloni, M. Marchini, S. Grando, C. Piazza, V. Moschini, C. Gretter, A. Lo Fiego, M. Petitti, A. Sommovigo</i>	
<b>Strategie agronomiche, molitorie e di trasformazione per attenuare il rischio di contaminazione da acrilamide nei prodotti da forno</b> .....	7
<i>M. Blandino, V. Scarpino, F. Travaglia, M. Loscalzo, V. Landolfi, J.D. Coisson, A.M. Colombo, M. Cortassa, A. Valente, M. Arlorio</i>	
<b>Effetto delle condizioni ambientali e del genotipo sul contenuto e sulle caratteristiche molecolari degli arabinoxilani dell'orzo e del malto</b> .....	12
<i>E. Bravi, G. Perretti, V. Sileoni, V. Alfeo, O. Marconi</i>	
<b>Frumenti e mais pigmentati: selezione varietale, gestione colturale e molitoria per l'ottenimento di farine ricche in composti antiossidanti</b> .....	17
<i>C. Sardella, F. Vanara, B. Burešová, P. Martinek, M. Blandino</i>	
<b>Impiego di grani pigmentati per lo sviluppo di prodotti alimentari tracciabili ad alto valore aggiunto naturalmente ricchi di molecole bioattive: il progetto PIGRANI</b> .....	22
<i>P. De Vita, S. Esposito, S. Moscaritolo, F. Sestili, S. Palombieri, M. Volpato, F. Manni, L. Tommasi, L. Bonassisa, E. De Maio, M.C. Messia, E. Marconi</i>	
<b>Impronta del carbonio della <i>Pizza Napoletana Verace</i></b> .....	27
<i>A. Falciano, A. Cimini, P. Masi, M. Moresi</i>	
<b>L'indirizzo interpretativo dell'Autorità Garante della Concorrenza e del Mercato sulle regole di etichettatura dell'alimento pasta</b> .....	32
<i>D. Monci</i>	
<b>Approcci biotecnologici per migliorare le proprietà nutrizionali e di texture di grano saraceno</b> .....	37
<i>S. Iametti, M. Gardella, M. Rollini, A. Barbiroli, M. Di Nunzio, A. Marti</i>	
<b>Nuovi approcci metodologici allo studio delle interazioni tra proteine in matrici complesse: applicazioni al network proteico di cereali</b> .....	41
<i>D. Emide, A. Barbiroli, F. Bonomi, S. Iametti</i>	
<b>Studio dei fenomeni coinvolti nella lievitazione degli impasti per pizza</b> .....	46
<i>C. Covino, A. Sorrentino, P. Di Pierro, P. Masi</i>	
<b>Miglioramento delle caratteristiche nutrizionali del pane attraverso l'aggiunta di farina di ceci maltati</b> .....	51
<i>A. Cimini, A. Poliziani, M. Moresi</i>	
<b>Pani funzionali di grano duro ottenuti mediante parziale sostituzione della semola con sfarinati integrali di cereali minori e legumi</b> .....	56
<i>A. Spina, P. De Vita, L. Padalino, V. Giannone, L. Lecce, M.A. Del Nobile, V. Giovanniello, M. Canale, D.B.M. Ficco</i>	
<b>Valutazione qualitativa e nutrizionale di pani funzionali, arricchiti con estratti essiccati di <i>Portulaca oleracea</i> L. e <i>Opuntia ficus indica</i> Mill.</b> .....	61
<i>F. Sciacca, N. Virzì, M. Palumbo, S. Licciardello, A. Pesce, E. Li Puma, A. Leonardi, V. Di Stefano, M. G. Melilli</i>	
<b>Pane da farine composite di frumento e pannello di canapa (<i>Cannabis sativa</i> subsp. <i>sativa</i>): un'opportunità qualitativa?</b> .....	66
<i>E. Carini, A. Di Fazio, L. Del Vecchio, M. Chiodetti, M. Cirlini</i>	



<b>Paste funzionali da processi tecnologici innovativi e materiali di scarto di origine vegetale</b> .....	<b>71</b>
<i>L. Gazza, F. Nocente, F. Taddei, E. Galassi, R. Ciccoritti, M. Durante, M. S. Lenucci</i>	
<b>Riutilizzo sostenibile delle trebbie di birra per la produzione di pasta ad alto contenuto proteico e di fibre</b> .....	<b>76</b>
<i>F. Cuomo, M.C. Trivisonno, S. Iacovino, L. Falasca, M.C. Messia, E. Marconi</i>	
<b>Caratterizzazione di pasta fresca arricchita in amido resistente</b> .....	<b>81</b>
<i>A. Cimini, A. Poliziani, E. De Arcangelis, E. Botticella, D. Lafiandra, M. Moresi</i>	
<b>Valutazione dell'attitudine alla trasformazione di una varietà di frumento alto amiloso e utilizzo di uno sfarinato tipo-semola per la produzione di pasta</b> .....	<b>86</b>
<i>E. De Arcangelis, M.C. Trivisonno, M. Angelicola, M. Quiquero, V. Di Nardo, S. Iacovino, L. Falasca, F. Sestili, M.C. Messia, E. Marconi</i>	
<b>Bio-fortificazione in provitamina A della granella di frumento duro</b> .....	<b>91</b>
<i>S. Palombieri, M. D. Garcia Molina, G. Gambacorta, R. Beleggia, P. De Vita, E. Botticella, D. Lafiandra, S. Masci, F. Sestili</i>	
<b>Studio di shelf-life di biscotti con miscele lipidiche diverse</b> .....	<b>96</b>
<i>F. Pasini, S. Marzocchi, C. Ravagli, M.C. Messia, M.F. Caboni</i>	
<b>Caratterizzazione di sfarinati di grani teneri antichi</b> .....	<b>101</b>
<i>A. Borriello, N.A. Miele, E. Torrieri, N. Velleca, S. Cavella</i>	
<b>Risi pigmentati italiani: caratteristiche e peculiarità</b> .....	<b>106</b>
<i>A. Cantalupi, C. Simonelli, E. Fantozzi</i>	
<b>Impiego di varietà colorate di frumento tenero in impasti per prodotti da forno "funzionali"</b> .....	<b>111</b>
<i>A. Romano, G. D'Auria, P. Ferranti, M. Blandino, G. Mamone, L. Di Stasio, P. Masi</i>	
<b>Il ruolo dei geni delle polifenol-ossidasi nella storia evolutiva dei frumenti tetraploidi</b> .....	<b>116</b>
<i>P. De Vita, G. Mangini, M. M. Miazzi, P. Stevanato, F. Taranto</i>	
<b>Analisi proteomica per l'identificazione di nuovi marcatori del germe di grano</b> .....	<b>121</b>
<i>L. Di Stasio, G. Mamone, A. Reale, M.C. Messia, E. Marconi</i>	
<b>Analisi del proteoma di riserva di farine di frumenti (<i>T.durum</i> e <i>T.aestivum</i>) cresciuti in presenza di biostimolanti e ammendanti</b> .....	<b>126</b>
<i>S. Graziano, M. Caldara, M. Gulli, E. Maestri, N. Marmioli</i>	
<b>Accessioni di farro dicocco: caratterizzazione bio-agronomica e qualitativa</b> .....	<b>131</b>
<i>A. Iori, A. Belocchi, A. Cammerata, E. Galassi, E. Gosparini, M. Fornara, V. Mazzon, F. Taddei, F. Quaranta</i>	
<b>Valutazione dell'uniformità genetica di varietà autoctone siciliane di frumento duro attraverso lo studio delle proteine del glutine</b> .....	<b>136</b>
<i>S. Masci, S. Palombieri, S. Potestio, M. Bonarrigo, F. Sestili, D. Lafiandra, C. Miceli, B. Messina, G. Russo</i>	
<b>Recupero e valorizzazione di antichi frumenti caucasici: <i>Triticum zhukovskyi</i> e <i>Triticum timopheevii</i></b> .....	<b>141</b>
<i>F. Nocente, E. Galassi, F. Taddei, C. Natale, R. Ciccoritti, L. Sereni, P. Cacciatori, L. Gazza</i>	
<b>Banca del Germoplasma di mais del CREA: arricchimento e innovazione tramite cooperazione Italia-Bolivia e Network europeo EVA</b> .....	<b>146</b>
<i>C. Balconi, A. Torri, G. De Luise, P. Valoti, R. Redaelli</i>	
<b>Micronutrienti chiave in popolazioni locali di grani siciliani</b> .....	<b>151</b>
<i>S. Ruggeri, P. Buonocore, P. Gabrielli, M. Canale, S. Blangiforti, A. Spina</i>	

<b>Evoluzione del contenuto in folati totali in cereali e pseudocereali crudi e cotti e loro significato nella dieta.....</b>	<b>155</b>
<i>S. Ruggeri, V. Di Nardo, A. Aguzzi, E. Marconi</i>	
<b>Confronto produttivo, reologico, nutrizionale e sanitario di cereali minori a confronto con il frumento tenero.....</b>	<b>160</b>
<i>M. Blandino, L. Righetti, R. Meloni, M. Gozzi, M. Donna, C. Dall’Asta, C. Sardella</i>	
<b>Caratterizzazione di subunità gluteniniche ad alto peso molecolare (HMW-GS) in "varietà locali" di frumenti siciliani mediante analisi proteomiche.....</b>	<b>165</b>
<i>G. Visioli, G. Giannelli, C. Agrimonti, A. Spina, G. Pasini</i>	
<b>Selezione Assistita da Marcatori Molecolari (SAM): resistenza a <i>Pyricularia grisea</i> ....</b>	<b>170</b>
<i>L. Borgo, A. Carnia, C. Simonelli</i>	
<b>Cadmio e Arsenico nel riso: un monitoraggio sul territorio italiano .....</b>	<b>175</b>
<i>A. Cantalupi, C. Simonelli, M. Casali, M. Romani</i>	
<b>Frumento duro: risposta delle varietà al complesso della septoriosi in due ambienti del Lazio .....</b>	<b>179</b>
<i>A. Iori, A. Belocchi, M. Fornara, O. Basili, R. Mariotti, A. Arcangeli, F. Malagesi, F. Quaranta</i>	
<b>Utilizzo di biostimolanti per la produzione di frumento biologico sostenibile e di qualità in Emilia-Romagna - BettER-Bio .....</b>	<b>184</b>
<i>M. Marchini, S. Folloni, C. Piazza, E. Anchisi, L. Lucini</i>	
<b>Indagine sul microbiota fungino presente in cariossidi di orzo prodotte nelle regioni dell’Italia Nord orientale e centrale.....</b>	<b>189</b>
<i>M. Cali, E. Cappelletti, M. T. Senatore, A. Prodi, D. Iraci Capuccinello, I. Alberti, M. Montanari</i>	
<b>Selezione assistita da marcatori molecolari (sam) per le caratteristiche merceologiche e nutrizionali del riso .....</b>	<b>194</b>
<i>L. Borgo, A. Carnia, C. Simonelli</i>	
<b>Il Glifosato nella filiera cerealicola: accumulo, normativa, metodi analitici.....</b>	<b>198</b>
<i>M. Masci, T. Navigato, R. Caproni</i>	
<b>AGENT: dallo studio delle risorse genetiche contenute in un network di banche del germoplasma europee nuove prospettive per la sostenibilità.....</b>	<b>203</b>
<i>P. Vaccino, F. Sansoni, A. Volante, N. Pecchioni</i>	
<b>Le lavorazioni conservative in sostituzione dell’aratura: effetto sulla qualità tecnologica e sanitaria nei cereali .....</b>	<b>207</b>
<i>M. Blandino, L. Capo, M. Scapino, V. Scarpino, F. Vanara, A. Reyneri</i>	
<b>Valutazione dell'impatto delle infestanti su una coltura di campo tramite Smartphone.....</b>	<b>212</b>
<i>E. Romano, C. Bisaglia, M. Palumbo, N. Virzì, F. Sciacca, S. Saia, I. Pecorella, P. De Vita</i>	
<b>Valutazione della sostenibilità della produzione risicola: il ruolo del Life Cycle Assessment.....</b>	<b>217</b>
<i>G. Vinci, R. Ruggieri, M. Ruggeri</i>	
<b>DSS (Decision Support System) per una coltivazione sostenibile e di precisione del frumento.....</b>	<b>222</b>
<i>M. Ruggeri, P. Meriggi, V. Rossi</i>	
<b>Cereali e prodotti derivati nelle abitudini alimentari di un gruppo di adolescenti italiani durante la pandemia da Covid-19.....</b>	<b>227</b>
<i>M. Mattera, M. Zaccaria</i>	
<b>Valutazione del contenuto di acrilammide nella pizza napoletana STG.....</b>	<b>232</b>
<i>M. Quiquero, S. Iacovino, M. Angelicola, A. Reale, M. C. Messia</i>	

<b>Promuovere la metrologia negli alimenti e nella nutrizione: l'infrastruttura METROFOOD per i cereali</b> .....	237
<i>L. Gazza, M. Carcea, M. Masci, V. Terzi, P. Vaccino</i>	
<b>Riso: valutazione della resa alla lavorazione di alcune varietà italiane applicando la norma ISO 6646:2011</b> .....	242
<i>P. Vaccino, C. Simonelli, M. Cormegna</i>	
<b>Il Progetto CHANGE-UP - Innovative agro-ecological APPROaches to achieving resilience to climate CHANGE in Mediterranean countries</b> .....	247
<i>G. Galaverna, G. Visioli, M. Bertola, L. Gazza, C. Rumpel, A. Benbelkacem, A. Fallot, M. Annabi, S. el-Fatehi</i>	
<b>Formulazione di starter microbici per la produzione di pizza</b> .....	252
<i>A. Reale, T. Di Renzo, S. Marulo, F. Boscaïno, G. Mamone</i>	
<b>Proprietà e digeribilità di impasti di frumento tenero per pizza napoletana durante la fase di lievitazione</b> .....	257
<i>A. Romano, C. Nitride, P. Masi, G. Mamone, L. Di Stasio, P. Ferranti</i>	
<b>Congelamento di panetti per pizza: effetti sulla cinetica di lievitazione e sul comportamento reologico</b> .....	262
<i>C. Covino, A. Sorrentino, P. Di Pierro, P. Masi</i>	
<b>Impiego di farine di legumi nella produzione di basi-pizza gluten-free</b> .....	266
<i>A. Pasqualone, M. Costantini, D. De Angelis, F. Vurro, R. Silletti, G. Squeo, F. Caponio, C. Summo</i>	
<b>Valutazione dell'attività antimicrobica di luppolo indigeno per la produzione di birra artigianale</b> .....	271
<i>F. Nazzaro, B. Testa, S.J. Lombardi, P. Tremonte, E. Sorrentino, R. Coppola, M. Iorizzo</i>	
<b>Caratterizzazione di un malto tipico siciliano attraverso l'introduzione di metodi di coltivazione e di trasformazione delle materie prime innovative: Il Progetto INNO.MALTO</b> .....	276
<i>A.M. Lo Scalzo, S. Licciardello, F. Sciacca, E. Li Puma, A. Leonardi, A. Pesce, D. D'Angelo, A. Gianinetti, N. Faccini, M. Palumbo, N. Virzì</i>	
<b>Impiego del lievito criotollerante <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 41CM nella produzione di birra lager</b> .....	280
<i>M. Iorizzo, B. Testa, P. Tremonte, S. J. Lombardi, M. Succi, F. Letizia, G. Albanese, E. Sorrentino, R. Coppola</i>	
<b>Pani di frumento duro funzionalizzati mediante aggiunta di sfarinati di carciofo ottenuti da scarti di lavorazione</b> .....	284
<i>M. Canale, R. Palmeri, F. Pesce, A. Todaro, M. Amenta, M.C. Strano, M. Bizzini, M. Allegra, A. Spina</i>	
<b>Sviluppo di pani di frumento duro ad elevata valenza salutistica a base di farina e concentrato proteico di lupino bianco</b> .....	289
<i>M. Canale, V. Giannone, A. Todaro, M.C. Strano, A. Pasqualone, M. Allegra, M. Bizzini, E. Li Puma, A. Spina</i>	
<b>Qualità nutrizionale di pane funzionale con lenticchie rosse pensato per un consumatore anziano ed effetti del suo consumo sul sistema immunitario murino</b> .....	293
<i>V. Turfani, V. Narducci, A. Finamore, M. Roselli, A. Durazzo, M. Carcea</i>	
<b>Influenza degli idrocolloidi sulle qualità fisiche del pane ottenuto con semola di una vecchia varietà di grano duro</b> .....	298
<i>M. G. Farbo, P. Conte, A. Del Caro, C. Fadda, A. Piga</i>	

<b>Utilizzo di idrocolloidi per l'ottimizzazione di impasti a base di una vecchia varietà di grano duro.....</b>	<b>303</b>
<i>M. G. Farbo, C. Fadda, S. Marceddu, P. Conte, A. Del Caro, A. Piga</i>	
<b>Effetto della temperatura sul tempo di cottura ottimale di spaghetti .....</b>	<b>308</b>
<i>M. Cibelli, A. Cimini, A. R. Taddei, M. Moresi</i>	
<b>Profilo ambientale della pasta di semola di grano duro convenzionale e biologico .....</b>	<b>313</b>
<i>M. Cibelli, A. Cimini, M. Moresi</i>	
<b>Valorizzazione della Manioca (<i>Manihot esculenta</i>, Crantz) attraverso la produzione di paste con aumentato valore nutrizionale .....</b>	<b>318</b>
<i>F. Taddei, P. Kouagang Tchakoutio, L. Gazza, F. Nocente, E. Galassi, R. Mortaro, A. Arcangeli, C. Natale, E. Gosparini</i>	
<b>Studio di tracciabilità <i>infotracing</i> nella filiera grano duro-pasta .....</b>	<b>323</b>
<i>C. Cecchini, C. Costa, S. Figorilli, F. Pallottino, P. Menesatti</i>	
<b>Valorizzazione di sottoprodotti dell'industria olearia attraverso la formulazione di prodotti da forno funzionali .....</b>	<b>328</b>
<i>P. Dahdah, R. Cabizza, A. Piga, M.G. Farbo, G. Hassoun, C. Fadda</i>	
<b>Attitudine alla maltazione di cereali minori per la produzione di bevande fermentate.....</b>	<b>333</b>
<i>E. Galassi, F. Nocente, A. Murru, C. Natale, F. Taddei, L. Gazza</i>	
<b>Valutazione dell'uso di triticale (<i>Triticosecale spp. W</i>) per la produzione della birra ...</b>	<b>338</b>
<i>O. Marconi, G. De Francesco, E. Bravi, F. Nocente, C. Cantale, L. Gazza, A. Latini, P. Galeffi</i>	
<b>Determinazione di marker di processo in grano duro nazionale e canadese sottoposti a macinazione e decorticazione .....</b>	<b>343</b>
<i>S. Marzocchi, F. Pasini, M.C. Messia, E. Marconi, M.F. Caboni</i>	
<b>Studio di shelf-life di taralli con miscela lipidiche diverse.....</b>	<b>348</b>
<i>F. Pasini, S. Marzocchi, C. Ravagli, M.C. Messia, M.F. Caboni</i>	
<b>Innovazione di processo e di prodotto per la produzione di bevande fermentate a base di quinoa .....</b>	<b>353</b>
<i>V. Sileoni, E. Bravi, G. De Francesco, G. Perretti, O. Marconi</i>	
<b>Effetto della decorticazione su composti bioattivi e metalli pesanti in frumenti duri pigmentati .....</b>	<b>358</b>
<i>D. B. M. Ficco, G. M. Borrelli, O. Miedico, A. Spina, V. Giovanniello, M. Tarallo, C. Pompa, P. De Vita, A. E. Chiaravalle</i>	
<b>Pre-trattamenti fisici e biotecnologici per il miglioramento delle proprietà tecnologiche del sorgo .....</b>	<b>363</b>
<i>A. Marti, S. Iametti, M. Zanoletti, G. Cardone, M. A. Pagani</i>	
<b>Composti fenolici liberi e legati in farina di teff (<i>Eragrostis tef</i>): determinazione mediante HPLC-ESI-TOF-MS .....</b>	<b>368</b>
<i>E. Diaz-de-Cerio, V. Verardo, E. Stopponi, G.G. Pinnavaia</i>	
<b>Realizzazione di nuovi prodotti a base di cereali ad elevato valore nutrizionale. Il progetto "IN.TE.GRA. - INNOVAZIONI TECNOLOGICHE GRANI ANTICHI" .....</b>	<b>373</b>
<i>A. Zappalà, F. Sciacca, M. Palumbo, A. Pesce, M. Bizzini, S. Licciardello, E. Li Puma, A. Leonardi, G. Spina, A. Barbera, N. Virzì</i>	



## **LAVORI**

## **Filiere sementiere biologiche regolamentate di popolazioni evolutive di frumenti: una importante risorsa per il settore biologico - il progetto Breed4Bio**

S. Folloni<sup>1\*</sup>, M. Marchini<sup>1</sup>, S. Grando<sup>1</sup>, C. Piazza<sup>2</sup>, V. Moschini<sup>3</sup>, C. Gretter<sup>3</sup>, A. Lo Fiego<sup>4</sup>, M. Petitti<sup>5</sup>, A. Sommovigo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Open Fields s.r.l., Strada Madonna dell’Aiuto 7/A, 43126 Parma (PR).

<sup>2</sup>Azienda Agraria Sperimentale Stuard, Strada Madonna dell’Aiuto 7/a, 43126 Parma (PR).

<sup>3</sup>CREA DC, Via di Corticella 133,40128 Bologna (BO).

<sup>4</sup>Arcoiris, Via Placido Rizzotto 46, 41126 Modena (MO).

<sup>5</sup>Rete Semi Rurali, Piazza Brunelleschi 8, 50018 Scandicci (FI).

\*E-mail: [s.folloni@openfields.it](mailto:s.folloni@openfields.it)

### **Abstract**

In 2014 the European Commission launched a temporary experiment permitting the marketing of seeds from wheat, barley, oat and maize populations (Decisions 2014/150, 2018/1519/EU), an absolute novelty in the seed sector. Additionally, the European Parliament and Council adopted a new organic regulation (EU 2018/848), deeming seeds from Organic Heterogeneous Material (OHM) suitable for organic farming. Consequently, populations could be used for future organic farming. Populations adapt better to abiotic and biotic stresses than homogeneous varieties, they ensure good, stable yields even with low-input agricultural systems like organic farming. In this scenario, the Breed4Bio project is seeking a seed supply chain model for organic heterogeneous material, able to guarantee seed traceability and quality. To this end, three bread wheat populations were grown at three farms in the Emilia-Romagna Apennines, and the harvested seed was subjected to adapted cleaning processes and laboratory tests to ensure its quality and maintenance of intrinsic biodiversity. Services such as agronomic support, management, and traceability are being developed for the supply chain.

### **Riassunto**

Nel 2014 la Commissione Europea ha disposto un esperimento temporaneo che consente la commercializzazione di semente di popolazioni di frumento, orzo, avena e mais (Decisioni 2014/150 e 2018/1519/UE), introducendo una novità assoluta nel settore sementiero. Anche il nuovo Regolamento (UE) 2018/848 relativo alla produzione biologica indica tra le sementi adatte per l’agricoltura biologica, quelle derivanti da materiale eterogeneo. Le popolazioni si adattano meglio agli stress abiotici e biotici rispetto alle varietà omogenee e garantiscono rese buone e stabili anche in sistemi agricoli a basso input come l’agricoltura biologica. Il progetto Breed4Bio vuole contribuire alla costruzione di un modello di filiera sementiera di materiale eterogeneo biologico che garantisca la tracciabilità e la qualità della semente. A tal fine, tre popolazioni di frumento tenero sono state coltivate presso tre aziende agricole nell’appennino emiliano-romagnolo e la semente in natura raccolta è stata sottoposta a processi di pulizia adattati alla tipologia di materiale ed a test di laboratorio per garantirne la qualità ed il mantenimento della biodiversità intrinseca. Il progetto sta sviluppando servizi a supporto dello sviluppo, gestione e tracciabilità della filiera.

### **Introduzione**

La FAO definisce le popolazioni come “un insieme di un alto numero di genotipi della stessa specie in un campo caratterizzate da un alto livello di diversità genetica” FAO (2009). Le popolazioni evolvono nel tempo, grazie agli incroci che naturalmente avvengono in campo ed all’adattamento verso l’ambiente in cui sono coltivate, per questo sono meglio definite popolazioni evolutive e rappresentano una risposta dinamica ai cambiamenti climatici aumentando la biodiversità agricola Dwivedi *et al.* (2017). Le popolazioni di frumento, orzo, avena e mais sono

state accolte nella sperimentazione avviata a livello comunitario in virtù delle Decisioni di Esecuzione 2014/150/UE e successiva 2018/1519/UE, che ne ha prorogato la sperimentazione temporanea fino al 2021. La continuità alla commercializzazione dei materiali di propagazione in corso di produzione è garantita fino all'adozione delle decisioni definitive a livello comunitario e fino all'adozione delle relative norme.

Dal 2010 ad oggi, diversi progetti europei di ricerca hanno studiato l'uso di materiale eterogeneo nei sistemi agrari biologici o a basso input come strategia per aumentare la loro resilienza e rispondere ai cambiamenti climatici; tra questi: SOLIBAM (<http://www.solibam.eu/SOLIBAM/home.html>), Liveseed (<https://www.liveseed.eu/>), DIVERSIFOOD (<http://www.diversifood.eu/>), Change-Up (<https://changeupproject.com/>). Dalle ricerche condotte emerge che l'uso del materiale eterogeneo potrebbe comportare benefici, in particolare per quanto concerne la produzione biologica, ad esempio per ridurre la diffusione di malattie, migliorare la resilienza e aumentare la biodiversità (Regolamento UE 2018/848). Questo Regolamento, relativo alla produzione biologica e all'etichettatura dei prodotti biologici, indica per la prima volta, tra le sementi adatte per l'agricoltura biologica, quelle derivanti da materiale eterogeneo, dandone una precisa definizione all'articolo 3. Gli atti delegati del Regolamento 2018/848 sul materiale eterogeneo hanno previsto un sistema di notifica e controllo della qualità semplificato che consentirà lo sviluppo di questo settore nei prossimi anni, fermo restando le norme fitosanitarie.

### **Materiali e metodi**

Tre popolazioni di frumento tenero (*T. aestivum* L.) (Mix Tenero Toscana 1, Mix Tenero Toscana PA1 e Furat Tenero Floriddia) sono state coltivate in pieno campo su 1200 m<sup>2</sup> ciascuna per la produzione di semente in tre aziende agricole situate a Loiano (BO) (714 m s.l.m.), Castelnuovo Ne' Monti (RE) (700 m s.l.m.) e Novafeltria (RN) (275 m s.l.m.) in regime biologico, durante la stagione colturale 2020/2021. La popolazione Furat Tenero Floriddia è stata costituita da S. Ceccarelli e S. Grando con la collaborazione del breeder del frumento tenero dell'*International Center for Agricultural Research in the Dry Areas* (ICARDA, Libano) come descritto in Spaggiari *et al.* (2022). Le popolazioni toscane sono state costituite dal Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agrarie, Alimentari, Ambientali e Forestali (DAGRI) dell'Università degli Studi di Firenze mescolando il seme derivante dagli incroci: Benco x Sieve Bianco, Sieve aristato x Verna aristato, Sieve aristato x Est Mottin, Sieve aristato x Inallettabile 96 per il Mix Tenero Toscana 1; e Verna aristato x Inallettabile 96, Andriolo x Gentilrosso aristato, Sieve x Inallettabile 96, Sieve x Inallettabile 96, Gentilrosso semi-aristato x Inallettabile 96 per il Mix Tenero Toscana PA1. Le semine sono state effettuate tra il 20 ottobre e il 15 novembre 2020, partendo da semente biologica certificata (Arcoiris per Mix Tenero Toscana 1 e Mix Tenero Toscana PA1 e Azienda Agricola Bio Floriddia per Furat Tenero Floriddia) a una densità di semina di 400 semi/m<sup>2</sup>. Le ispezioni ai campi sono state effettuate per valutare la presenza di piante di specie diversa da quella moltiplicata e la presenza di fitopatie quali carbone (*Ustilago tritici*) e carie (*Tilletia tritici*) secondo quanto previsto dalla legislazione sementiera. Non sono stati eseguiti trattamenti per il controllo dei parassiti. I rilievi agronomici sono stati eseguiti su quattro aree di saggio da 1 m<sup>2</sup> ciascuno. L'altezza della pianta e la lunghezza della spiga sono state misurate su 10 piante per area di saggio. La trebbiatura è avvenuta tra il 15 ed il 29 luglio 2021. I dati raccolti sono stati analizzati con il software Genstat 64-bit Release 21.1 (PC/Windows 8-10), utilizzando la procedura "*General analysis of variance*". La semente in natura di ciascuna popolazione è stata mantenuta separata per ciascuna azienda agricola ed è quindi stata sottoposta a specifici passaggi di pulizia su una linea di selezione (Cimbria) presso la Cooperativa Agricola Cesenate, al fine di essere impiegata come semente presso la medesima azienda agricola nell'annata successiva (secondo anno di progetto). Per ogni popolazione e per ogni azienda agricola è stato effettuato un campionamento del seme in natura ed un campionamento successivo alla lavorazione del seme. I

campioni sono stati infine analizzati per verificare la presenza di semi estranei e la germinabilità utilizzando le metodologie previste dal D.M. 22/12/1992.

## Risultati e discussione

L'interesse intorno alle popolazioni di cereali è nato per la loro capacità di garantire rese buone e stabili, soprattutto in regime biologico o a bassi input, e contribuire alla resilienza dei sistemi cerealicoli verso le sfide imposte dai cambiamenti climatici (Reg. UE 2018/848).

Di seguito riportiamo il nome delle popolazioni di frumento ed orzo coltivate in Italia nel 2022 ed alcune informazioni utili per il reperimento della semente (Tab. 1).

**Tabella 1.** Popolazioni di frumento ed orzo coltivate in Italia nel 2022

SPECIE	N.	NOME	COSTITUTTORE/DISPONIBILITA' SEMENTE
<i>T. turgidum subsp. durum</i>	8	Furat duro Petacciato (Evoluto in Molise)	ICARDA con Ceccarelli S. e Grando S./Az. agricola biologica Petacciato, S. Giuliano di Puglia (CB)
		Angelo (Sicilia)	Li Rosi G./Azienda Agricola G. Li Rosi, Raddusa (CT)
		Evoldur (Evoluto nelle Marche)	DAGRI (UNIFI) con Benedettelli S./Arcoiris sementi, Modena
		Evoldur (Evoluto in Sicilia)	DAGRI (UNIFI) con Benedettelli S./Az. agricola G. Li Rosi, Raddusa (CT)
		Evoldur (Evoluto in Toscana)	DAGRI (UNIFI) con Benedettelli S./Arcoiris sementi, Modena
		Abbadia	CGS Sementi con Porfiri O. e Ayano B./CGS Sementi, Acquasparta (TR)
		Mix duro Toscana PA1	DAGRI (UNIFI) con Benedettelli S./Arcoiris sementi, Modena
		Furat duro Floriddia (Evoluto in Toscana)	ICARDA con Ceccarelli S. e Grando S/ Az. agricola biologica Floriddia, Peccioli (PI)
<i>T. aestivum</i>	12	Mix tenero Toscana PA1*	DAGRI (UNIFI) con Benedettelli S./Arcoiris sementi, Modena
		Mix tenero Toscana 1*	DAGRI (UNIFI) con Benedettelli S./Arcoiris sementi, Modena
		Furat tenero Floriddia (Evoluto in Toscana)*	ICARDA con Ceccarelli S. e Grando S/ Az. agricola biologica Floriddia, Peccioli (PI)
		Furat tenero Li Rosi (Evoluto in Sicilia)	ICARDA con Ceccarelli S. e Grando S/ Azienda Agricola G. Li Rosi, Raddusa (CT)
		BIO2	Az. agr. Sperimentale Stuard/ Az. agr. Sperimentale Stuard, Parma
		Oroset	UNIBO con Dinelli G./Arcoiris sementi, Modena
		APPENBIO	UNIBO con Dinelli G./RV Venturoli Sementi, Pianoro (BO)
		People	UNIBO con Dinelli G./RV Venturoli Sementi, Pianoro (BO)
		Carosella	Alsia Basilicata con Cerbino D./Alsia Pollino, Rotonda (PZ)
		Selva	CGS Sementi con Porfiri O. e Ayano B./CGS Sementi, Acquasparta (TR)
Grani alti Monghidoro	Comunità Grano Alto Monghidoro/Comunità Grano Alto Monghidoro, Monghidoro (BO)		
<i>H. vulgare</i>	1	Crescent 180	Az. agr. Biologica Cortiana G. di Isola Vicentina (VI)/ Aveprobi, Villafranca (VR)
		Mix48	DSA3 (UNIPG)/UNIPG

Include sia le popolazioni autorizzate dal Ministero delle politiche agricole, alimentari e forestali (Mipaaf) per la commercializzazione della semente secondo quanto previsto dalle Decisioni di Esecuzione 214/150/UE e 2018/1519/UE, che quelle in via di iscrizione in base al Regolamento UE 2018/848. \*Popolazioni oggetto della sperimentazione del progetto Breed4Bio ([www.gobreedforbio.it](http://www.gobreedforbio.it))

Le tre popolazioni di frumento tenero coltivate presso le tre aziende agricole dell'appennino emiliano-romagnolo hanno fatto registrare una produzione generale di 2,4 t/ha, in linea con le produzioni medie della zona per due aziende agricole su tre, con proteine medie pari a 12,7 g/100 g s.s. (sostanza secca) e peso ettolitrico medio buono, pari a 79,2 kg/hl (da un minimo di 77,0 ad un massimo di 81,8 kg/hl). I valori medi delle rese, organizzati per aziende, popolazioni e popolazioni entro aziende sono riportati in Tabella 2. Furat Floriddia e Mix Toscana 1 sono risultati significativamente più alti e con peso dei mille semi significativamente maggiore di Mix Toscana PA1. Le tre popolazioni non differivano per la lunghezza della spiga (dati non mostrati).



**Tabella 2.** Produzione media delle popolazioni di frumento tenero nelle aziende agricole.

Produzione (t/ha)				
<b>Media generale</b>	2,39			
<b>Azienda</b>	<b>AZIENDA 1</b>	<b>AZIENDA 2</b>	<b>AZIENDA 3</b>	<b>LSD 0.05</b>
	2,49	3,29	1,40	0,23
<b>Popolazione</b>	<b>Mix Toscana 1</b>	<b>Mix Toscana PA1</b>	<b>Furat Floriddia</b>	
	2,27	2,30	2,62	0,23
<b>Azienda.Popolazione</b>	<b>Mix Toscana 1</b>	<b>Mix Toscana PA1</b>	<b>Furat Floriddia</b>	
Azienda 1 (Castenovo Ne' Monti)	2,14	2,86	2,48	0,40
Azienda 2 (Loiano)	3,44	2,65	3,80	
Azienda 3 (Novafeltria)	1,23	1,39	1,59	

I risultati sono riportati come medie ( $n=4$ ). LSD: *Least Significant Difference*

Per valutare l'efficacia della lavorazione al fine di produrre semente di qualità di popolazioni di frumento, sono state effettuate analisi della semente in natura e dopo lavorazione per i parametri purezza specifica, numero di semi estranei e germinabilità. La determinazione della purezza specifica consiste nella determinazione della composizione percentuale, espressa in peso, del campione in termini di semente pura, semi estranei e materie inerti e nell'identificazione delle specie dei semi estranei e della tipologia del materiale inerte presente. Dai risultati si osserva una efficacia della lavorazione del seme in termini di purezza specifica, con valori pari al 100% per tutte le popolazioni di ciascuna azienda (Tab. 3). La determinazione del numero di semi estranei, ovvero appartenenti a specie diverse da quella dichiarata, sia specie spontanee che altre specie coltivate, ha mostrato come, dopo la lavorazione del seme, il loro numero diminuisca nettamente per ciascuna popolazione, anche nelle aziende agricole che presentano un inquinamento con specie estranee più alto (dati non mostrati). Dall'analisi è emerso che le specie estranee che tendono a persistere anche dopo la lavorazione del seme sono: *H. vulgare*; *T. turgidum* subsp. *durum*; *S. cereale* e *Vicia* spp. In campo, durante la moltiplicazione del seme, si dovrà dunque porre particolare attenzione alla presenza di tali specie. La semente di popolazioni è eterogenea per dimensioni e forma; i processi di pulizia sono stati dunque adattati mediante una corretta taratura delle macchine. Per verificare che la lavorazione del seme non avesse influito sulla composizione fenotipica della popolazione, i due campioni prelevati per ogni popolazione ed azienda (seme in natura e dopo lavorazione) sono stati seminati nell'annata agraria 2021/22 nell'azienda sperimentale del CREA DC presso Budrio (BO). In base ai rilievi fenotipici effettuati, la lavorazione non ha comportato perdite importanti di fenotipi nelle popolazioni in esame (dati non mostrati). Infine, l'analisi di germinabilità mira a valutare il potenziale di germinazione della semente e consiste nella determinazione della percentuale di semi puri capaci di produrre plantule normali, entro un tempo stabilito ed in condizioni favorevoli per ciascuna specie. Tutte le popolazioni osservate in ciascuna azienda hanno una percentuale di germinabilità entro i limiti di legge per la categoria di appartenenza (85%) e, dopo la lavorazione del seme, tale dato migliora (Tab. 3).

Concludendo, le attività del progetto Breed4Bio contribuiscono a sviluppare un modello di filiera locale e sostenibile di semente biologica di popolazioni di frumento, applicabile anche a tutte le sementi biologiche.

**Tabella 3.** Purezza specifica e germinabilità del seme in natura e dopo lavorazione

Azienda	Popolazione	Seme in natura	Specie	Purezza (% in peso)	Semi di altre specie (% in peso)	Materie inerti	Germinelli normali	Semi duri	Germinelli anormali	Semi morti
1	Mix Toscana PA1	si	frumento tenero	96,6	0,1	3,3	88	0	6	6
1	Mix Toscana 1	si	frumento tenero	97,3	0	2,7	89	0	5	6
1	Furat Floriddia	si	frumento tenero	96,9	0	3,1	88	0	4	8
2	Mix Toscana PA1	si	frumento tenero	97,3	0,2	2,5	88	0	6	6
2	Mix Toscana 1	si	frumento tenero	97,8	0,1	2,1	88	0	6	6
2	Furat Floriddia	si	frumento tenero	98,3	0,1	1,6	88	0	5	7
3	Mix Toscana PA1	si	frumento tenero	96	0,5	3,5	88	0	7	5
3	Mix Toscana 1	si	frumento tenero	96,7	0,6	2,7	85	0	7	8
3	Furat Floriddia	si	frumento tenero	97,4	trifoglio	2,6	85	0	9	6
1	Mix Toscana PA1	no	frumento tenero	100	0	0	89	0	6	5
1	Mix Toscana 1	no	frumento tenero	100	0	0	90	0	7	3
1	Furat Floriddia	no	frumento tenero	100	0	0	89	0	5	6
2	Mix Toscana PA1	no	frumento tenero	100	0	0	91	0	7	2
2	Mix Toscana 1	no	frumento tenero	100	0	0	90	0	7	3
2	Furat Floriddia	no	frumento tenero	100	0	0	90	0	6	4
3	Mix Toscana PA1	no	frumento tenero	100	0	0	91	0	6	3
3	Mix Toscana 1	no	frumento tenero	100	0	0	91	0	6	3
3	Furat Floriddia	no	frumento tenero	100	0	0	90	0	6	4

Risultati della purezza specifica (grigio chiaro) e germinabilità (grigio scuro). Azienda 1 (Castenovo Ne' Monti, RE), Azienda 2 (Loiano, BO), Azienda 3 (Novafeltria, RN).

Il Progetto Breed4Bio è finanziato sulla Misura 16.1.01 – 3A del Programma di Sviluppo Rurale dell'Emilia-Romagna

### Bibliografia

Decisione di Esecuzione (UE) della Commissione 2014/150. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 82/29.

Decisione di Esecuzione (UE) della Commissione 2018/1519. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 256/65.

Dwivedi S.L., Lammerts van Bueren E.T., Ceccarelli S., Grandi S., Upadhyaya H.D., Ortiz R. 2017. Diversifying Food Systems in the Pursuit of Sustainable Food Production and Healthy Diets. *Trends in Plant Science*, 22(10): 842-856.

FAO. 2009. International treaty on plant genetic resources for food and agriculture. <https://www.fao.org/3/i0510e/i0510e.pdf>

Regolamento (UE) 2018/848 del Parlamento Europeo e del Consiglio. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 150/1.

Spaggiari M. Marchini, M. Calani L. Dodi R., Di Pede G., Dall'Asta M., Scazzina F., Barbieri A., Righetti L., Folloni S., Ranieri R., Dall'Asta C., Galaverna G. 2022. Evolutionary Wheat Populations in High-Quality Breadmaking as a Tool to Preserve Agri-Food Biodiversity. *Foods*, 11: 495.

DECRETO MINISTERIALE del 22 dicembre 1992. Metodi ufficiali di analisi per le sementi. GU Serie Generale n.2 del 04-01-1993 - Suppl. Ordinario n. 1.

## **Strategie agronomiche, molitorie e di trasformazione per attenuare il rischio di contaminazione da acrilamide nei prodotti da forno**

*M. Blandino<sup>1\*</sup>, V. Scarpino<sup>1</sup>, F. Travaglia<sup>2</sup>, M. Loscalzo<sup>3</sup>, V. Landolfi<sup>1</sup>, J.D. Coisson<sup>2</sup>, A.M. Colombo<sup>3</sup>, M. Cortassa<sup>1</sup>, A. Valente<sup>3</sup>, M. Arlorio<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>DISAFA, Università di Torino, Largo Paolo Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO).

<sup>2</sup>DSF, Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro", Largo Donegani 2/3, 28100 Novara (NO).

<sup>3</sup>Molini Valente S.p.A. Regione Mulini, 26, 15023 Felizzano (AL).

\*E-mail: [massimo.blandino@unito.it](mailto:massimo.blandino@unito.it)

### **Abstract**

Free asparagine (ASN) is the main precursor of acrylamide (AA). The ACRYSAFE project was aimed at identifying agronomic and milling solutions suitable for obtaining flours with low ASN content, in order to minimize AA levels in the biscuit-making. Samples of grains and flours obtained from specific experimental trials were analyzed for the ASN content with a spectrophotometric enzymatic method. On a selection of the most representative samples, biscuits were made according to a model recipe and analyzed for the determination of the AA content with a QuEChERS LC-MS/MS method. An integrated approach, that takes into account the choice of varieties, the proper agronomic (particularly the nitrogen fertilization) and milling management, in addition to the formulation and optimization of the technological process, is therefore fundamental for the correct control of the occurrence of this contaminant.

### **Riassunto**

L'asparagina libera (ASN) è il principale precursore dell'acrilamide (AA), sostanza per la quale è ipotizzato un rischio sanitario. Il progetto ACRYSAFE è stato finalizzato ad individuare le soluzioni agronomiche e molitorie atte all'ottenimento di farine con bassi contenuti in ASN, in grado di attenuare i livelli di AA nella produzione dei biscotti. Campioni di granelle e farine ottenute da specifiche prove sperimentali sono stati analizzati per il contenuto in ASN con un metodo enzimatico spettrofotometrico. Su una selezione dei campioni più rappresentativi sono stati realizzati dei biscotti modello, analizzati per la determinazione del contenuto in AA con un metodo QuEChERS LC-MS/MS.

Un approccio integrato di filiera che prenda in considerazione la scelta varietale, la gestione agronomica e le opportune modalità di macinazione, in aggiunta alla formulazione ed all'ottimizzazione del processo tecnologico di trasformazione dei prodotti alimentari, risulta pertanto fondamentale per la corretta gestione di questo contaminante tecnologico, come già dimostrato per altre matrici alimentari.

### **Introduzione**

L'acrilammide (AA) è un composto carbonilico  $\alpha,\beta$ -insaturo che può formarsi durante la cottura di alimenti a partire dall'amminoacido libero asparagina (ASN), suo diretto precursore. Nei prodotti da forno l'ASN presente nelle farine in presenza di zuccheri riducenti forma AA nel contesto delle reazioni di Maillard in fase di cottura, in funzione delle temperature ed al grado di umidità del prodotto.

Dato il potenziale cancerogeno dell'AA (classificata nella categoria 2A° dallo IARC, EFSA, 2015), nel 2017 la Commissione Europea ha stabilito dei livelli di riferimento e pubblicato linee guida per la sua mitigazione (Reg. UE 2017/2158), con l'intento di ridurre la presenza nei prodotti alimentari. In particolare, nel regolamento è stato raccomandato un limite di AA di 350  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e di 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  nei biscotti destinati rispettivamente all'alimentazione umana e degli infanti. Sebbene opportuni interventi tecnologici di gestione del processo di panificazione possano

limitare la produzione di AA, l'impiego di materie prima a basso contenuto di ASN sembrerebbe essere la strategia più efficace nel garantire la sicurezza dei prodotti da forno. Il progetto ACRYSAFE è stato finanziato dalla Regione Piemonte (Bando Prisme, POR 2014 -2020) con l'obiettivo di individuare le strategie agronomiche e molitorie per limitare il contenuto di ASN nelle materie prime e verificarne il contributo nel limitare il contenuto di AA, con particolare riferimento alla produzione di biscotti.

## Materiali e Metodi

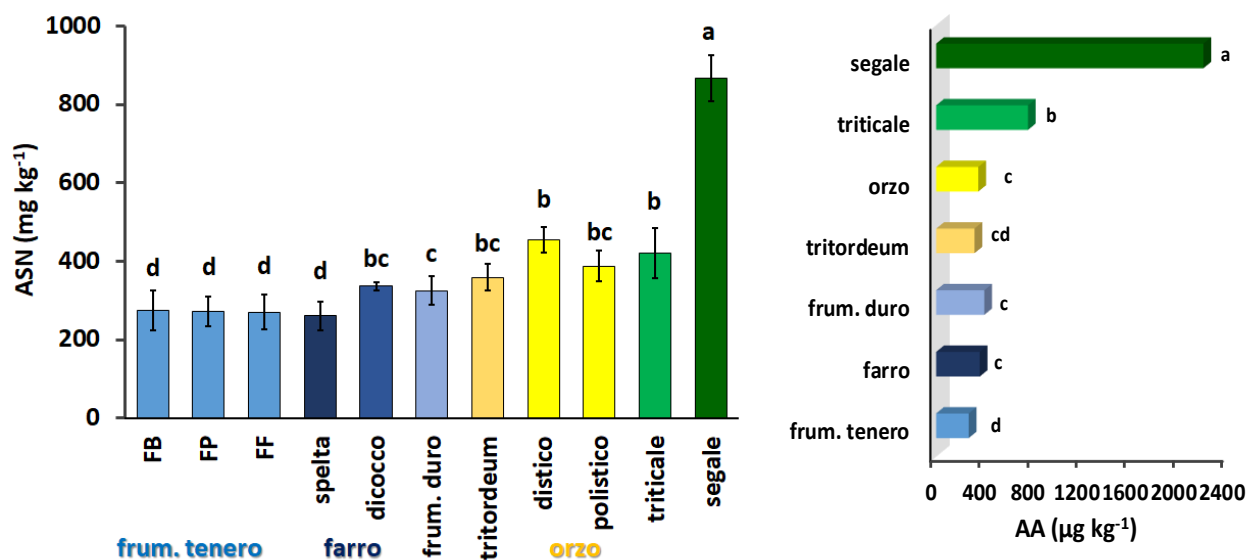
Campioni di granelle e farine (raffinate e integrali) sono stati raccolti nell'ambito di specifiche prove sperimentali di pieno campo condotte in Piemonte e da campionamenti del processo molitorio eseguiti presso un molino industriale e sono stati analizzati per il contenuto in ASN con un metodo enzimatico spettrofotometrico (KIT K-ASNAM, Megazyme). Il dettaglio di ciascuna sperimentazione è riportato di seguito, con la presentazione dei risultati.

Su una selezione dei campioni più rappresentativi sono stati realizzati dei biscotti, utilizzando una ricetta modello con olio di girasole, zucchero, sale, vanillina, bicarbonato di ammonio e di sodio ed acqua, con una cottura a 180°C per 27 min, e analizzati per la determinazione del contenuto in AA con un metodo QuEChERS LC-MS/MS.

I dati raccolti sono stati oggetto di analisi della varianza (test REGW-F,  $p \leq 0.05$ ).

## Risultati

L'influenza del genotipo e dell'ambiente sul contenuto di ASN è stata valutata nel 2020 e 2021 su 20 varietà di frumento tenero biscottiero, a confronto con 3 varietà panificabili e di forza, e di altri cereali minori quali segale, triticale, farro, frumento duro, orzo e tritordeum. La segale e il triticale hanno presentato i maggiori contenuti di ASN nelle farine e di AA nei biscotti, mentre in media i farri e i frumenti hanno fatto osservare i valori minori (Fig. 1).



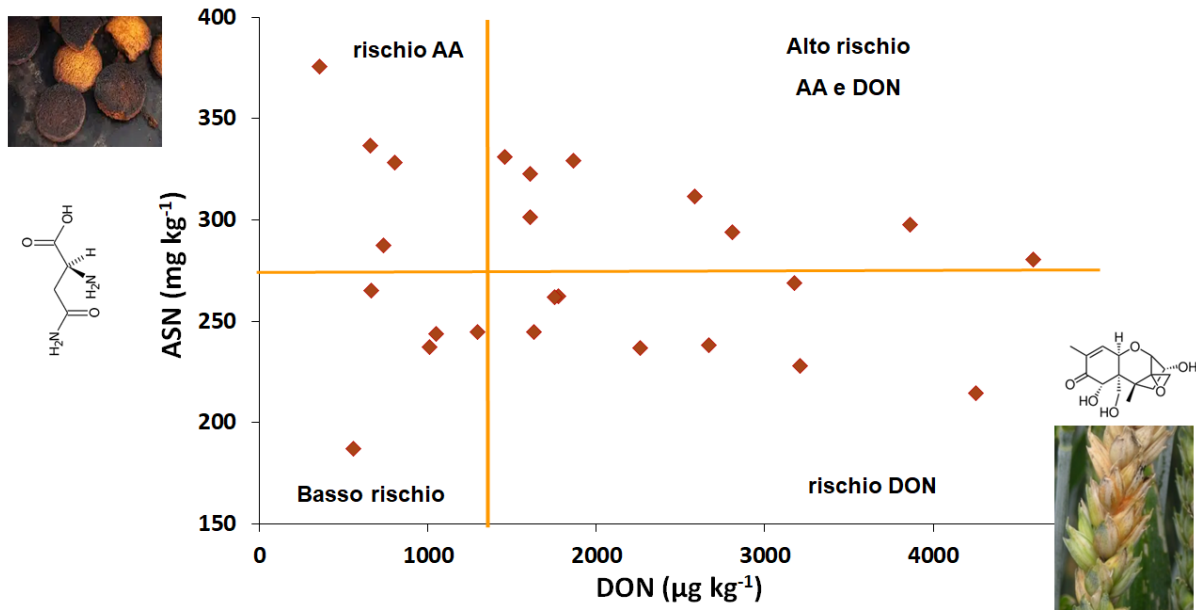
**Figura 1.** Confronto tra specie di cereali vernini per la concentrazione di asparagina libera (ASN) nella granella e per il contenuto in acrilamide (AA) in biscotti.

I dati di ASN riportati si riferiscono alla media di 2 anni (2020 e 2021), diverse varietà e 3 ripetizioni. Il numero di varietà a confronto è pari a 20 per i frumenti teneri biscottieri (FB), 4 per i frumenti teneri panificabili (FP), 2 per i frumenti di forza (FF), 1 farro dicocco, 1 farro spelta, 2 frumenti duri, 2 tritordeum, 1 orzo distico, 1 orzo polistico, 2 triticale, 2 segali.

I dati di AA si riferiscono a biscotti realizzati con la farina integrale di ciascun cereale, coltivati nel 2020. I valori riportati si riferiscono alla media di almeno 2 cultivar per ciascun cereale e 3 ripetizioni.

Lettere differenti si riferiscono a differenze statisticamente significative per  $p < 0,01$ .

Focalizzandosi in particolare sulle varietà di frumento tenero biscottiero, e prendendo in considerazione 20 varietà commerciali e di prossima commercializzazione coltivate nel 2020 e 2021 a Cigliano (VC), si sono individuate varietà con minori contenuti dell'amminoacido precursore in entrambi gli anni di coltivazione. Considerando però il rischio sanitario in maniera più olistica, ovvero prendendo in considerazione anche l'accumulo nelle farine della micotossina deossinivalenolo (DON), 5 varietà si sono caratterizzate per un basso accumulo di ASN e di DON (Fig. 2).



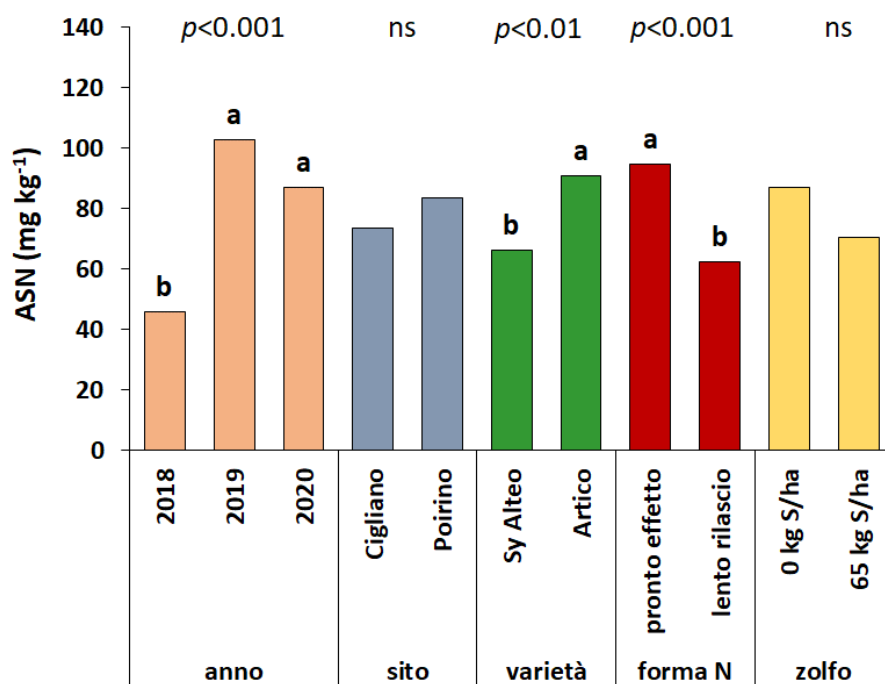
**Figura 2.** Contenuto di asparagina libera (ASN) e deossinivalenolo (DON) nella granella di varietà di frumento tenero da biscotto.

I dati per ciascuna varietà si riferiscono alla media di 2 anni (2020 e 2021) e 3 ripetizioni.

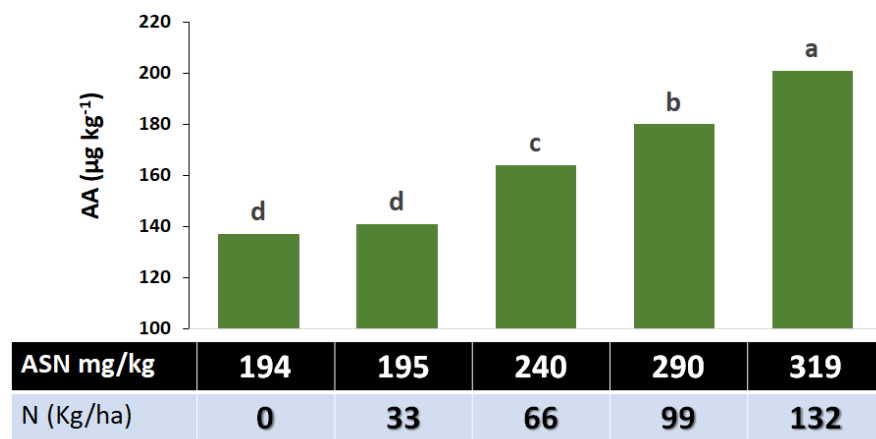
In una sperimentazione di campo triennale, sono stati confrontati in 2 località (Cigliano, su suoli sciolti e superficiali e Poirino, su suoli profondi e con una maggior dotazione di azoto) 2 varietà di frumento biscottiero (Sy Alteo e Artico) e differenti strategie di concimazione azotata, con un apporto complessivo di 130 kg N/ha. In particolare, sono stati confrontati con un disegno sperimentale fattoriale 2 tipologie di concimi (a pronto effetto, con un frazionamento di nitrato ammonico tra accestimento e levata e lento rilascio, con la distribuzione solo all'accestimento di azoto nitrico e ammoniacale stabilizzato con l'inibitore della nitrificazione 3,4 DMPP) e l'apporto contemporaneo di zolfo (S).

I fattori che hanno maggiormente influenzato il contenuto di ASN nella farina raffinata sono stati l'anno di coltivazione e la strategia di concimazione. (Fig. 3) In particolare l'impiego di un concime a lento rilascio ha ridotto il contenuto di ASN del 38% rispetto al più frequente intervento frazionato dell'azoto con concimi a pronto effetto. Un significativo effetto è stato confermato anche dal confronto varietale, mentre non si sono differenziate le località di coltivazione o l'impiego dello zolfo.

Nella località di Cigliano sono inoltre state confrontate 10 dosi di concimazione azotata, ripartite tra accestimento e levata, sulla varietà di frumento panificabile Aubusson. Il contenuto di ASN nella granella è aumentato significativamente con il crescere della dose di azoto distribuita in levata, mentre al contrario la concimazione in accestimento non ha evidenziato un effetto significativo. L'accumulo di ASN nelle farine a seguito di distribuzioni più elevate di azoto è stato confermato dalla maggior produzione di AA durante la realizzazione dei biscotti (Fig. 4).



**Figura 3.** Effetto dell'anno di coltivazione, della località, della varietà, e delle tipologie di concimi azotati (N) e solfatici (S) sul contenuto in asparagina libera (ASN) nella farina raffinata. Per ciascun fattore, i dati si riferiscono alla media degli altri fattori a confronto e 3 ripetizioni. Lettere differenti si riferiscono a differenze statisticamente significative. Il valore di significatività  $p$  è riportato in figura. ns: non significativo.



**Figura 4.** Effetto della dose di azoto (N) distribuita in levata sul contenuto di asparagina libera (ASN) nella granella e di acrilammide (AA) nei biscotti. I dati d si riferiscono alla media di 2 concimazioni in accrestimento (33 e 66 kg N/ha), 3 anni e 3 ripetizioni. Lettere differenti si riferiscono a differenze statisticamente significative per  $p < 0,001$ .

In un impianto industriale è inoltre stata studiata la distribuzione dell'ASN nelle frazioni molitorie a seguito di macinazione a cilindri di 2 lotti industriali di frumenti da biscotto. La farina raffinata (tipo 0) ha un contenuto di ASN inferiore di 2.7 volte rispetto alla granella di partenza (Tab. 1). Il germe ha presentato la più alta concentrazione di ASN, seguito da cruschetto e farinaccio. La

crusca, evidenzia un contenuto in ASN, ma anche di glucosio e saccarosio inferiori a cruschello e farinaccio, risultando un sottoprodotto molitorio con minor rischio della produzione di AA. Sebbene la maggiore concentrazione di ASN si sia ritrovata nel germe, questo sottoprodotto è caratterizzato da una bassa resa molitoria, e quindi contribuisce in modo limitato all'apporto totale di ASN (1%), che risulta maggiore nel cruschello (36%).

**Tabella 1.** Contenuto delle frazioni molitorie in asparagina libera (ASN) e in zuccheri riducenti.

<b>Frazione</b>	<b>Ceneri</b> (g/100g)	<b>Glucosio</b> (g/100g)	<b>Saccarosio</b> (g/100g)	<b>ASN</b> (mg/kg)	<b>Resa molitoria</b> (%)	<b>Bilancio di massa ASN</b> (%)
Farina	0,6 e	0,1 c	0,3 d	121 d	78,8	26
Crusca	6,4 a	0,7 b	1,7 c	1067 c	8,2	24
Cruschello	5,0 b	1,1 a	1,8 c	1408 b	9,4	36
Farinaccio	3,6 d	1,0 a	2,2 b	1308 b	3,6	13
Germe	4,7 c	0,5 b	10,3 a	4271 a	0,1	1

Le medie nella stessa colonna seguite da lettere diverse differiscono in modo significativo tra loro ( $p < 0.001$ ). I dati riportati si riferiscono alla media di 2 lotti industriali e 3 ripetizioni.

### Conclusione

Un approccio integrato di filiera che prenda in considerazione la scelta varietale, la gestione agronomica, soprattutto in merito alla dose e alla forma di azoto in levata e le opportune modalità di macinazione, in aggiunta alla formulazione ed all'ottimizzazione del processo tecnologico di trasformazione dei prodotti alimentari, risulta pertanto fondamentale per la corretta gestione di questo contaminante tecnologico, come già dimostrato per altre matrici alimentari.

### Bibliografia

EFSA 2015. Scientific Opinion on acrylamide in food. *EFSA Journal*, 13(6):4104, 1-321. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4104>

UE 2017. Regolamento della Commissione (UE) 2017/2158 del 20 novembre 2017 che istituisce misure di attenuazione e livelli di riferimento per la riduzione della presenza di acrilammide negli alimenti. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L304/24. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/HTML/?uri=CELEX:32017R2158&from=IT>



## Effetto delle condizioni ambientali e del genotipo sul contenuto e sulle caratteristiche molecolari degli arabinosilani dell'orzo e del malto

E. Bravi<sup>\*</sup>, G. Perretti<sup>2</sup>, V. Sileoni<sup>3</sup>, V. Alfeo<sup>1</sup>, O. Marconi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Università di Perugia, Centro di Ricerca per l'Eccellenza della Birra, via San Costanzo, 06126 Perugia (PG).

<sup>2</sup>Università di Perugia, Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Borgo XX Giugno, 06121 Perugia (PG).

<sup>3</sup>Universitas Mercatorum, Piazza Mattei 10, 00186 Roma (RM).

\*E-mail: [e\\_bravi@yahoo.it](mailto:e_bravi@yahoo.it)

### Abstract

This study evaluates the effects of the growth conditions, the cultivar, and the malting process, on the total (AX) and water extractable (WE) arabinosilans in barley and malt. Nine barley varieties from 2 different years were analyzed. In barley, AX ranged from 5.97 to 8.98 wt% dm, and WE-AX from 0.06 to 0.35 wt% dm. For barley, the Mn was between  $2.3 \times 10^5$  and  $12.6 \times 10^5$  Da, the polydispersity was  $1.1 < Mw/Mn < 4.3$ , and the conformation a stiff semiflexible coil. Most of the barley malt WE-AX showed a Mn over  $4.0 \times 10^5$  Da with a random coil conformation. Compared to barley, the malts show analogous content of AX and WE-AX, similar intrinsic viscosity, less rigid conformation, and higher Mw/Mn. The year influences the AX, the WE-AX and their Mw/Mn and conformation. The WE-AX positively correlates with germinative energy and kernel dimension and can be an index of the malting attitude of barley. The WE-AX content of malt was negatively related to the quality parameters, useful as indicator of malt modification, and positively related to the viscosity, indicating that lautering could be more affected by WE-AX rather than AX.

### Riassunto

Questo studio valuta gli effetti dei parametri ambientali, della cultivar e del maltaggio, sul contenuto di arabinosilani totali (AX) ed estraibili in acqua (WE) nell'orzo e nel malto. Sono state studiate 9 varietà di orzo di due annate. Nell'orzo, gli AX variano dal 5,97 all'8,98% (p/p ss), i WE-AX da 0,06 a 0,35%. Per l'orzo, il peso molecolare è compreso tra  $2,3 \times 10^5$  e  $12,6 \times 10^5$  Da, la polidispersità è compresa tra  $1,1 < Mw/Mn < 4,3$  e la conformazione a bobina rigida semiflessibile. La maggior parte degli AX-WE del malto hanno un Mn superiore a  $4,0 \times 10^5$  Da con una conformazione a gomito casuale. Rispetto all'orzo, i malti mostrano contenuto simile di AX e WE-AX, viscosità intrinseca simile, conformazione meno rigida e maggiore Mw/Mn. L'anno influenza il contenuto di AX e AX-WE, la loro Mw/Mn e conformazione. Il contenuto di AX-WE è positivamente correlato all'energia germinativa e alla dimensione della cariosside e può essere un indice dell'attitudine alla maltazione dell'orzo. Gli AX-WE del malto, correlati negativamente alla qualità, sono un utile indice di modificazione del malto, e positivamente alla viscosità, indicando una loro maggiore influenza sulla filtrazione rispetto ai AX.

### Introduzione

$\beta$ -glucani e arabinosilani (AX) sono i principali costituenti dei polisaccaridi non amidacei dell'orzo. Gli AX sono influenzati da fattori genetici, ambientali e loro reciproche interazioni (Machan *et al.*, 2014). La loro mancata degradazione durante il maltaggio causa una bassa resa in estratto, un'alta viscosità del mosto, un aumento dei tempi di filtrazione del mosto e la formazione del torbido nella birra finita (Malfliet *et al.*, 2013; Langenaeken *et al.*, 2020). L'enzima chiave nella degradazione degli AX è l'endo-1,4- $\beta$ -D-xilanasi (Malfliet *et al.*, 2013). La liberazione tardiva delle xilanasi endogene durante la germinazione spiega la minor degradazione degli AX rispetto ai  $\beta$ -glucani durante la maltazione (Malfliet *et al.*, 2013). Gli AX, nei cereali, sono



estraibili in acqua (AX-WE) e non estraibili in acqua (AX-WU). Il contenuto di AX-WE è inferiore al contenuto di AX-WU (Zhang *et al.*, 2014). Nell'orzo, gli AX-WE raggiungono il 2% (ss), mentre gli AX-WU il 25-26%. Il contenuto di AX e AX-WE in differenti malti d'orzo varia fra 0.49–0.69% e 6.40–6.93%. Un'alta viscosità è correlata a problemi di filtrazione di mosto e birra, tale viscosità è attribuita alla presenza dei  $\beta$ -glucani e AX (Malfliet *et al.*, 2013; Langenaeken *et al.*, 2020). Scopo del lavoro è studiare l'effetto delle condizioni di crescita e della cultivar su AX e AX-WE e loro caratteristiche molecolari in orzi di differenti cultivar ed annata. La conformazione molecolare degli AX-WE verrà inoltre correlata con l'attitudine alla maltazione. Si valuterà l'effetto della maltazione sul contenuto e solubilità degli AX e proprietà molecolari degli AX-WE. Tali parametri saranno correlati alla qualità del malto.

## Materiali e metodi

9 cultivar di orzo distico, 7 primaverili (Bambina, Belgravia, Concerto, Praga, Propino, Quench e Zeppelin) e 2 invernali (Scala e Violetta) sono state comparate in due esperimenti in campo in due differenti annate (stazione sperimentale, FIELDLAB, del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali dell'Università di Perugia) (Tomasi *et al.* in 2019).

**Analisi su orzo e malto:** umidità, peso di mille cariossidi (TKW), energia germinativa, proteine e sieving test, estratto, pH, viscosità, indice Kolbach (KI), FAN, friabilità, fermentabilità e potere diastatico (European Brewery Convention, 2007). **Determinazione AX nell'orzo e nel malto:** il contenuto di AX è stato determinato secondo i metodi di Bell (1985) ed Englyst *et al.* (1992) opportunamente modificati.

**Determinazione e caratterizzazione degli AX-WE:** Via HPSEC-TDA, fase mobile NaNO<sub>3</sub> 0.1M contenente lo 0.05% di NaN<sub>3</sub>, flusso 1 mL/min. La **maltazione** dei 9 orzi è stata effettuata secondo i parametri di processo da Tomasi *et al.* (2019).

## Risultati e discussione

Sia l'annata sia la cultivar non hanno influito in modo significativo sugli AX (Tab. 1). Il contenuto di AX-WE è inferiore (tra 0.06% e 0.35%). Il contenuto di AX e AX-WE non è significativamente influenzato né dalla cultivar né dall'annata.

**Tabella 1.** Influenza annata e cultivar su AX-TOT e -WE e loro solubilità negli orzi

	AX totali (% ss)		AX WE (% ss)		solubilità (%)	
	I annata	II annata	I annata	II annata	I annata	II annata
Bambina	6.27 <sup>Aa</sup>	5.97 <sup>Aa</sup>	0.12 <sup>Ab</sup>	0.10 <sup>Aa</sup>	1.95 <sup>Abc</sup>	1.68 <sup>Aa</sup>
Belgravia	6.50 <sup>Aa</sup>	8.06 <sup>Bd</sup>	0.15 <sup>Ab</sup>	0.21 <sup>Ac</sup>	2.36 <sup>Ad</sup>	2.61 <sup>Abc</sup>
Concerto	7.66 <sup>Ab</sup>	7.26 <sup>Abc</sup>	0.06 <sup>Aa</sup>	0.17 <sup>Bbc</sup>	0.77 <sup>Aa</sup>	2.39 <sup>Bb</sup>
Praga	7.81 <sup>Ab</sup>	7.89 <sup>Acd</sup>	0.13 <sup>Ab</sup>	0.35 <sup>Be</sup>	1.63 <sup>Ab</sup>	4.45 <sup>Be</sup>
Propino	8.48 <sup>Bbc</sup>	6.30 <sup>Aa</sup>	0.14 <sup>Ab</sup>	0.28 <sup>Bd</sup>	1.60 <sup>Ab</sup>	4.45 <sup>Be</sup>
Quench	8.98 <sup>Bc</sup>	7.15 <sup>Ab</sup>	0.06 <sup>Aa</sup>	0.16 <sup>Bb</sup>	0.69 <sup>Aa</sup>	2.24 <sup>Bb</sup>
Scala	7.67 <sup>Bb</sup>	6.21 <sup>Aa</sup>	0.23 <sup>Bc</sup>	0.18 <sup>Abc</sup>	3.00 <sup>Ae</sup>	2.86 <sup>Ac</sup>
Violetta	8.97 <sup>Bc</sup>	7.35 <sup>Abc</sup>	0.20 <sup>Ac</sup>	0.18 <sup>Abc</sup>	2.26 <sup>Acd</sup>	2.42 <sup>Ab</sup>
Zeppelin	8.11 <sup>Bbc</sup>	6.22 <sup>Aa</sup>	0.27 <sup>Bd</sup>	0.21 <sup>Ac</sup>	3.36 <sup>Ae</sup>	3.43 <sup>Ad</sup>
$p_{annata}$	0.0605		0.1370		0.0448*	
$p_{cultivar}$	0.4732		0.3943		0.3740	

I valori di  $p$  risultano dall'ANOVA fattoriale a due vie, \* $p < 0,05$  (significativo).

La S% è influenzata dell'annata. La massa molare numerale (Mn) (Tab. 2) non è influenzata né dall'annata né dalla cultivar. La polidispersità (Mw/Mn) è influenzata dall'annata.

L'α indica una conformazione a bobina casuale (0,65-0,85) e ad asta rigida (0,85-1,80), nessuna correlazione con l'annata e con la cultivar. Né la [η] né il Rh sono correlati all'annata o alla cultivar. Esiste correlazione positiva tra energia germinativa e contenuto di AX-WE (Tab. 3).

**Tabella 2.** Influenza annata e cultivar su peso molecolare e proprietà strutturali degli AX-WE

	Mn (10 <sup>5</sup> Da)		Mw/Mn		α		[η] (dL/g)		Rh (nm)	
	I annata	II annata	I annata	II annata	I annata	II annata	I annata	II annata	I annata	II annata
Bambina	6.7 <sup>Abc</sup>	7.2 <sup>Ab</sup>	1.32 <sup>Aab</sup>	2.58 <sup>Bb</sup>	0.91 <sup>Ba</sup>	0.57 <sup>Aa</sup>	5.94 <sup>Ade</sup>	5.58 <sup>Ae</sup>	41.8 <sup>Ade</sup>	45.7 <sup>Accd</sup>
Belgravia	6.9 <sup>Bbc</sup>	4.3 <sup>Aa</sup>	1.46 <sup>Ab</sup>	2.57 <sup>Bb</sup>	1.02 <sup>Aa</sup>	1.00 <sup>Ac</sup>	7.65 <sup>Bf</sup>	4.40 <sup>Accd</sup>	45.9 <sup>Ade</sup>	44.6 <sup>Accd</sup>
Concerto	2.8 <sup>Aa</sup>	3.5 <sup>Ba</sup>	1.08 <sup>Aa</sup>	2.55 <sup>Bb</sup>	0.54 <sup>Aa</sup>	0.88 <sup>Bbc</sup>	1.20 <sup>Aa</sup>	3.04 <sup>Bb</sup>	16.5 <sup>Aa</sup>	32.3 <sup>Bab</sup>
Praga	8.2 <sup>Accd</sup>	12.6 <sup>Bc</sup>	1.32 <sup>Aab</sup>	1.42 <sup>Aa</sup>	0.68 <sup>Aa</sup>	0.58 <sup>Aa</sup>	6.28 <sup>Be</sup>	5.12 <sup>Ade</sup>	45.6 <sup>Ade</sup>	49.4 <sup>Accd</sup>
Propino	5.3 <sup>Ab</sup>	11.7 <sup>Bc</sup>	1.18 <sup>Aab</sup>	1.79 <sup>Bab</sup>	1.31 <sup>Ba</sup>	0.71 <sup>Aab</sup>	3.67 <sup>Ab</sup>	5.24 <sup>Bde</sup>	32.3 <sup>Abc</sup>	52.4 <sup>Bd</sup>
Quench	9.3 <sup>Bd</sup>	2.6 <sup>Aa</sup>	1.11 <sup>Aa</sup>	2.43 <sup>Bb</sup>	1.06 <sup>Aa</sup>	0.76 <sup>Aabc</sup>	4.75 <sup>Bbcd</sup>	1.31 <sup>Aa</sup>	39.1 <sup>Bcd</sup>	22.2 <sup>Aa</sup>
Scala	2.3 <sup>Aa</sup>	3.9 <sup>Ba</sup>	1.32 <sup>Aab</sup>	2.56 <sup>Bb</sup>	0.84 <sup>Aa</sup>	0.62 <sup>Aab</sup>	4.52 <sup>Abc</sup>	5.03 <sup>Bde</sup>	27.1 <sup>Ab</sup>	38.5 <sup>Bbc</sup>
Violetta	8.3 <sup>Accd</sup>	3.9 <sup>Ba</sup>	1.33 <sup>Aab</sup>	2.56 <sup>Bb</sup>	0.81 <sup>Ba</sup>	0.62 <sup>Aab</sup>	6.76 <sup>Bef</sup>	5.03 <sup>Ade</sup>	50.5 <sup>Ae</sup>	38.5 <sup>Abc</sup>
Zeppelin	6.6 <sup>Bbc</sup>	2.6 <sup>Aa</sup>	1.23 <sup>Aab</sup>	4.34 <sup>Bc</sup>	0.89 <sup>Ba</sup>	0.60 <sup>Aa</sup>	5.00 <sup>Bcd</sup>	3.96 <sup>Abc</sup>	39.1 <sup>Bcd</sup>	32.2 <sup>Aab</sup>
p <sub>annata</sub>	0.7626		0.0015**		0.0570		0.2479		0.6440	
p <sub>cultivar</sub>	0.3972		0.5141		0.4117		0.1595		0.2588	

I valori p risultano dall'ANOVA fattoriale a due vie, \*p < 0,05 (significativo), \*\*p < 0,01 (molto significativo).

La frazione al sieving più alta è positivamente correlata agli AX-WE e alla S%. La resa è positivamente correlata alla Mw/Mn. La Mn è correlata positivamente con il Rh e [η].

**Tabella 3.** Coefficienti di correlazione tra parametri di qualità dell'orzo, AX TOT e AX-WE e loro proprietà molecolari

	Mn	Mw/Mn	α	[η]	Rh	AX	WE-AX	solubilità
Peso mille	-0.3697	0.1576	-0.1466	0.0818	-0.0846	-0.0464	0.2436	0.2251
E. germinativa	0.2988	-0.1059	-0.0179	0.4294	0.4991	0.0862	0.5593*	0.5179*
Proteine totali	-0.3548	0.3982	-0.3305	-0.0044	-0.0323	-0.1505	0.1799	0.1946
Sieving >2.5	-0.3125	0.4676	-0.1372	-0.1122	0.0040	-0.218	0.5129*	0.5339*
sieving 2.5-2.2	0.2894	-0.4609	0.1477	0.1013	-0.0218	0.2513	-0.5265*	-0.5592*
sieving <2.2	0.2484	-0.5596*	0.1912	0.0922	-0.0623	0.2935	-0.5057*	-0.5553*
Resa	-0.1183	0.7824***	-0.4289	-0.2405	0.0758	-0.4559	0.4399	0.5481*
Mn		-0.4334	0.0061	0.5536*	0.7891***	0.1534	0.3239	0.2922
Mw/Mn			-0.3751	-0.1940	-0.0953	-0.5348*	0.1165	0.2802
α				0.1127	0.0257	0.4441	-0.1698	-0.2697
[η]					0.8401***	-0.0805	0.1756	0.1881
Rh						-0.0406	0.3819	0.3861
AX							-0.0026	-0.2873
W-E AX								0.9501***

\*p : < 0,05 (significativo); \*\* p : < 0,01 (molto significativo); \*\*\* p : < 0,001 (altamente significativo)

Gli AX-WE sono un indice di valutazione dell'attitudine alla maltazione dell'orzo. Gli AX calano durante la maltazione, effetto dell'annata risulta statisticamente significativo. Inoltre, l'effetto dell'annata è altamente significativo sugli AX-WE. La S% ha valori maggiori rispetto all'orzo,

l'influenza dell'annata è significativa. Gli AX calano e gli AX-WE restano simili, ma aumenta la solubilità (Tab. 4). L'annata e la cultivar non influenzano la Mn.

Le Mw/Mn sono più alte rispetto agli orzi, nessuna influenza dell'annata e della cultivar rilevata (Tab. 5). Gli AX e gli AX-WE sono correlati negativamente con l'KI e i FAN, gli AX-WE sono correlati negativamente con friabilità e fermentabilità e positivamente con l'azoto totale. Gli AX-WE risultano un utile indicatore di modificazione del malto. Infine, gli AX-WE sono positivamente correlati alla  $[\eta]$  e alla viscosità del mosto (Tab. 6).

**Tabella 4.** Influenza annata e cultivar sul AX-TOT e -WE e loro solubilità nei malti

	AX totali (% ss)		AX WE (% ss)		Solubilità (%)	
	I annata	II annata	I annata	II annata	I annata	II annata
Bambina	5.35 Aa	7.27 Bcd	0.07 Ab	0.24 Ba	1.26 Abc	3.36 Ba
Belgravia	6.55 Ab	6.84 Ac	0.07 Ab	0.25 Bb	1.14 Ab	3.68 Bab
Concerto	5.64 Aa	7.28 Bcd	0.08 Abc	0.21 Ba	1.48 Acd	2.90 Ba
Praga	5.56 Aa	7.80 Be	0.19 Ae	0.26 Bb	3.46 Ae	3.31 Aa
Propino	5.41 Aa	7.40 Bde	0.05 Aa	0.25 Ba	0.91 Aa	3.37 Ba
Quench	5.66 Aa	5.63 Aa	0.05 Aa	0.31 Bb	0.94 Aa	5.58 Bc
Scala	5.54 Aa	6.22 Bb	0.21 Af	0.29 Bb	3.79 Ae	4.69 Bb
Violetta	6.50 Ab	7.05 Acd	0.09 Ac	0.21 Ba	1.41 Ad	3.00 Ba
Zeppelin	5.32 Aa	6.95 Bcd	0.13 Ad	0.22 Ba	2.36 Acd	3.13 Ba
P <sub>annata</sub>	0.0025**		0.0001***		0.0042**	
P <sub>cultivar</sub>	0.5930		0.1226		0.4417	

I valori di p risultano dall'ANOVA fattoriale a due vie, \*\*p < 0.01 (molto significativo), \*\*\*p < 0.001 (altamente significativo).

**Tabella 5.** Influenza annata e cultivar sulle proprietà molecolari degli AX-WE nel malto

	Mn (10 <sup>5</sup> Da)		Mw/Mn		$\alpha$		$[\eta]$ (dL/g)		Rh (nm)	
	I annata	II annata	I annata	II annata	I annata	II annata	I annata	II annata	I annata	II annata
Bambina	13.9 Af	16.8 Bd	1.45 Aa	18.95 Bb	1.13 Bbc	0.63 Abc	7.31 Bbcd	2.63 Aa	58.3 Abc	80.8 Bb
Belgravia	14.5 Af	16.7 Ad	1.27 Aa	5.56 Ba	1.04 Bb	0.26 Aa	6.11 Bbc	2.95 Aab	53.8 Abc	59.2 Aab
Concerto	10.1 Ad	13.7 Acd	1.43 Aa	3.34 Aa	0.61 Aa	0.87 Bd	10.10 Bd	5.00 Ad	57.7 Abc	70.3 Aab
Praga	9.5 Ad	13.8 Bcd	2.45 Aab	55.58 Bc	0.61 Aa	0.93 Bd	2.76 Aa	3.27 Aab	41.0 Aab	84.7 Bb
Propino	8.2 Ac	22.1 Be	4.32 Ab	1.48 Aa	0.50 Aa	0.79 Bcd	7.68 Bcd	2.91 Aab	67.5 Ac	222.9 Bc
Quench	12.1 Ae	12.0 Abc	2.31 Aab	5.24 Aa	0.50 Aa	0.39 Aab	8.89 Bcd	3.02 Aab	63.7 Abc	53.9 Aab
Scala	2.6 Aa	8.5 Bab	1.33 Aa	5.73 Ba	1.24 Bc	0.36 Aab	3.13 Aa	3.65 Abc	24.8 Aa	50.1 Bab
Violetta	10.1 Bd	5.8 Aa	1.31 Aa	1.82 Aa	0.55 Aa	0.76 Acd	7.15 Bbc	4.39 Acd	50.7 Abc	38.3 Aa
Zeppelin	5.3 Ab	6.4 Aa	4.97 Ab	3.02 Aa	0.64 Aa	0.54 Aab	4.62 Bab	2.55 Aa	44.3 Aabc	35.7 Aa
p <sub>annata</sub>	0.0819		0.5126		0.4059		0.0051**		0.1714	
p <sub>cultivar</sub>	0.1066		0.1698		0.9445		0.3014		0.2754	

\*\*p < 0.01 (very significant), \*\*\*p < 0.001 (highly significant).

**Tabella 6.** Coefficienti di correlazione tra parametri di qualità del malto, AX TOT e AX-WE e loro peso molecolare e proprietà strutturali.

	Mn	Mw/Mn	$\alpha$	$[\eta]$	Rh	WEAX	AX	solubilità
Viscosità	-	0.0645	-0.1925	-0.2959	-0.2446	0,4896*	0.1599	0,5011*
NTOT	-	0.1751	-0.0211	-0.3889	0.0127	0,5268*	0.3583	0.4662
NSOL	-	-0.2546	0.4138	0.2953	-0.1862	-0,4957*	-0,5108*	-0.3764
Kolbach	-	-0.3034	0.2449	0,4880*	-0.1336	-0,7084**	-0,5418*	-0,6024**
FAN	-	-0,4824*	0.2095	0,4989*	-0.2385	-0,7562***	-0,7174***	-0,6093**
Friabilità	0.2967	-0.077	0.0417	0.3135	0.1791	-0,4925*	-0.2118	-0,4847*
Fermentabilità	0.2688	-0.0639	0.1672	0.4009	0.3402	-0,6173**	-0.2248	-0,6253**
Mn		0.2047	-0.0393	-0.0784	0,7549***	0.1568	0,4931*	0.0061
Mw/Mn			0.1154	-0.2750	0.1247	0.3311	0,4968*	0.1921
$\alpha$				0.0336	0.0497	-0.2051	0.0568	-0.2351
$[\eta]$					-0.1271	-0,2591	-0.4469	-0,2224
Rh						0.1822	0.4393	0.0409
WE AX							0,4987*	0,9587***
AX								0.2414

\* $p < 0,05$  (significativo); \*\*  $p < 0,01$  (molto significativo); \*\*\*  $p < 0,001$  (altamente significativo)

Fattori genetici e ambientali influenzano gli AX, gli AX-WE, la S% e la  $[\eta]$  degli AX-WE nei malti. Il contenuto di AX e AX-WE nel malto è comparabile all'orzo, con comparabile  $[\eta]$ , conformazione meno rigida e maggiore Mw/Mn. Gli AX-WE del malto sono negativamente correlato ai parametri di modificazione. Il contenuto di AX-WE e la loro caratterizzazione molecolare possono essere un nuovo indice per valutare l'attitudine alla maltazione degli orzi e la qualità dei malti.

### Bibliografia

- Langenaeken N.A., Ieven P., Hedlund E.G., Kyomugasho C., van de Walle D., Dewettinck K. 2020. Arabinoxylan,  $\beta$ -glucan and pectin in barley and malt endosperm cell walls: a microstructure study using CLSM and cryo-SEM. *Plant Journal*, 103(4): 1477-1489.
- Machan P., Ehrenbergerova J., Cerkal R., Benesova K., Vaculova K. 2014. The Influence of Genotype and Environment on Arabinoxylan and Beta-Glucan Contents in Grain of Spring Barley (*Hordeum Vulgare L.*). *Acta Universitatis Agriculturae Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 62 (3): 553-560.
- Malfliet S., Just A., Crauwels S., Willems K., De Cooman L., Lievens B., Aerts G. 2013. Assessing the xylanolytic bacterial diversity during the malting process. *Food Microbiology*, 36 (2): 406-415.
- Tomasi I., Sileoni V., Marconi O., Bonciarelli U., Guiducci M., Marangoni S., Perretti G. 2019. Effect of growth conditions and genotype on barley yield and  $\beta$ -glucan content of kernels and malt *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67: 6324-6335.
- Zhang Z., Smith C., Li W. 2014. Extraction and Modification Technology of Arabinoxylans from Cereal by-Products: A Critical Review. *Food Research International*, 65: 423-436.
- Bell B.M. 1985. A rapid method of dietary fibre estimation in wheat products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(9): 815-821.
- Englyst H.N., Quigley M.E., Hudson G.J., Cummings J.H., 1992. Determination of dietary fibre as non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Analyst*, 117(11): 1707-1714.

## **Frumenti e mais pigmentati: selezione varietale, gestione colturale e molitoria per l'ottenimento di farine ricche in composti antiossidanti**

*C. Sardella<sup>1\*</sup>, F. Vanara<sup>1</sup>, B. Burešová<sup>2</sup>, P. Martinek<sup>3</sup>, M. Blandino<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Università di Torino, Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Largo Paolo Braccini 2, 10095, Grugliasco (TO).

<sup>2</sup>University of Life Sciences Prague, Department of Chemistry, Kamýcka 129, 16500, Prague, Czech Republic.

<sup>3</sup>Agrotest Fyto, Ltd., Havlíčkova 2787/121, 767 01, Kroměříž, Czech Republic.

\*E-mail: [claudia.sardella@unito.it](mailto:claudia.sardella@unito.it)

### **Abstract**

In recent years, pigmented cereals have been attracting researchers' and breeders' attention being valuable raw materials for the production of functional foods. Pigments within the kernel layers have showed, indeed, potent antioxidant properties that can add nutritional health benefits to the energy-rich cereal matrix. In the present contribution, the higher content in bioactive compounds of innovative pigmented varieties of bread wheat, tritordeum and corn have been verified. Furthermore, different agronomic practices have been applied to assess their agronomic and management features, as well as different milling strategies, aiming to preserve the bioactive compounds in the final flour. Some varieties of corn and wheat seem to be promising, having good yield and quality performances. Attention needs to be paid to the further genetic improvement of these varieties in terms of yield capacity and sanitary risks, in order to exploit them as functional foods on a large scale. Moreover, suitable milling strategies should be applied depending on the pigmented type and the bioactives that are aimed to be preserved.

### **Riassunto**

Negli ultimi anni, varietà cerealicole caratterizzate da granella colorata hanno conosciuto una crescente attenzione da parte della comunità scientifica in quanto materie prime interessanti per l'ottenimento di prodotti alimentari dal superiore valore funzionale. Innovative varietà pigmentate di frumento tenero, di tritordeum e di mais sono state valutate per quanto riguarda il loro contenuto in composti bioattivi rispetto a varietà di controllo. Diverse gestioni colturali sono state adottate per valutarne la competitività agronomica e gestionale, così come diverse strategie molitorie, al fine di valorizzare appieno il contenuto in composti antiossidanti delle granelle di partenza. Alcune varietà sia di mais sia di frumento, caratterizzate da un contenuto in composti bioattivi significativamente maggiore rispetto al controllo, sembrano essere promettenti per l'inserimento in filiere alimentari avanzate. L'attenzione maggiore deve essere rivolta all'ottenimento di varietà caratterizzate da una maggiore competitività agronomica e sanitaria e ad un'accorta valutazione delle strategie molitorie.

### **Introduzione**

I cereali sono la base dei regimi alimentari mondiali e possono contribuire in larga misura all'assunzione di composti antiossidanti e alla prevenzione dei processi di invecchiamento associati a stress ossidativo. Il miglioramento genetico ha selezionato varietà pigmentate di frumento e mais per la presenza di sostanze antiossidanti, come antociani e carotenoidi, che conferiscono diversa colorazione alla granella rispetto alle varietà convenzionali. Il successo nell'impiego in filiera di questi genotipi dipende dalla loro competitività agronomica e gestionale rispetto alle varietà convenzionali. In questo contributo sono state valutate innovative varietà pigmentate di frumento tenero, nuove specie, quali il tritordeum, e ibridi di mais ottenuti da germoplasma locale, per i parametri produttivi, qualitativi ed il contenuto in composti

antiossidanti nelle farine, considerando anche l'impatto della tecnica colturale e delle strategie molitorie.

### **Materiali e metodi**

In un primo studio, 12 varietà pigmentate di frumento tenero (6 viola, 3 blu, 2 nere e una gialla), una varietà di tritordeum e un frumento convenzionale come controllo sono state oggetto di confronto in 3 differenti scenari agronomici per quanto riguarda il contenuto in azoto del suolo (basso B, medio M, alto A), fornendo 3 livelli di concimazione azotata (0, 80, 160 kg di N/ha).

Il tritordeum è stato oggetto di un confronto varietale nelle annate agrarie 2019-20 e 2020-21, in cui le cultivar in esame sono state sottoposte alla medesima gestione agronomica. Complessivamente, 3 varietà di tritordeum sono state confrontate con 7 varietà di frumento tenero (2 cultivar di forza, 2 panificabili, 2 biscottiere, una vecchia varietà), 2 tipologie di farri (spelta e dicocco), 2 frumenti duri, 2 orzi, 2 triticale e 2 segali.

La prova relativa a mais destinato alla produzione di farine e *hominy grits* ha previsto un confronto agronomico e varietale di nuovi ibridi ottenuti a partire da germoplasma autoctono (Peila 48 e 08 ottenuti dal Pignoletto rosso) e sudamericano (Morello, caratterizzato da granella con pericarpo viola) con ibridi convenzionali di riferimento per la filiera. Il confronto agronomico è avvenuto in due località caratterizzate da una differente gestione del campo (biologica e convenzionale), adottando due diverse densità di semina (6,5 e 8 p.te/m<sup>2</sup>) e tre livelli di concimazione azotata (150, 225, 300 kg di N/ha).

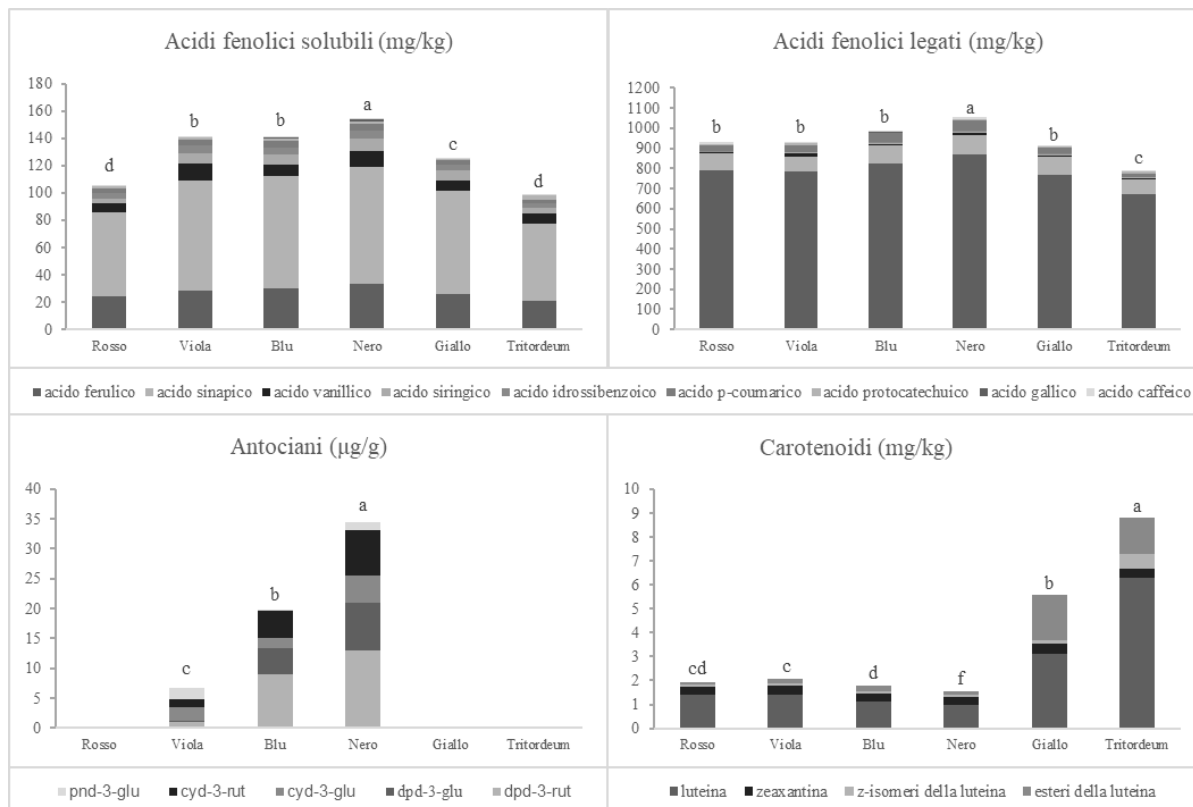
Tutte le varietà sono state oggetto di caratterizzazione agronomica e qualitativa. La resa è stata ottenuta per parcella e adeguata ad un valore di umidità della granella pari al 13%. Il macinato integrale è stato analizzato per quanto riguarda la capacità antiossidante (saggio FRAP, *ferric reducing antioxidant power*) e il contenuto e il profilo in composti bioattivi. L'estrazione e la quantificazione di acidi fenolici solubili e legati è avvenuta tramite cromatografia liquida ad alta prestazione con rilevatore a diodi (HPLC/DAD), come descritto da Giordano *et al.* (2019). Gli antociani sono stati estratti e quantificati tramite cromatografia liquida e spettrometro di massa (LC-MS/MS), come riportato da Šulc *et al.* (2017). Carotenoidi e tocoli sono stati estratti e quantificati rispettivamente tramite HPLC/DAD e HPLC con rilevatore a fluorescenza (FLD), come descritto da Burešová *et al.* (2021). I risultati sono espressi sul peso secco.

### **Risultati e discussione**

#### ***Selezione varietale e gestione colturale: frumenti pigmentati e tritordeum***

Sono stati osservati effetti significativi di tutte e tre le fonti di variazione in esame (genotipo, contenuto azotato del suolo e concimazione azotata) per quanto riguarda la produttività, seppur il contenuto azotato del suolo abbia spiegato una buona parte della variabilità osservata per questo parametro (54%). Tutte le varietà pigmentate oggetto di studio hanno mostrato capacità produttive inferiori rispetto alla varietà di controllo, che è stata scelta tra le più coltivate e produttive nel Nord Italia. Tuttavia, sono state osservate differenze significative tra le varie tipologie di colore e ampia variabilità entro lo stesso gruppo, con le rese più basse osservate nelle varietà a granella gialla (tritordeum -34%; frumento -27%) e capacità produttive simili al controllo da parte delle varietà a granella nera e viola, ancorché con differenze significative (-15%). L'analisi del potere antiossidante ha invece confermato valori maggiori per tutte le varietà pigmentate. In particolare, le varietà a granella nera si sono distinte per la più elevata capacità antiossidante, dato confermato da un elevato contenuto in acidi fenolici, sia solubili (+45% rispetto al controllo) che insolubili (+13%) e di antociani (Fig. 1). Il contenuto di questi ultimi è risultato essere 5 volte maggiore rispetto alle varietà a granella viola e 2 volte maggiore rispetto alle varietà a granella blu. Come atteso, la varietà di tritordeum e di frumento a granella gialla si sono distinte per valori significativamente elevati di carotenoidi (4 e 3 volte maggiori se paragonate al controllo, rispettivamente). La fertilità del suolo e la concimazione azotata hanno influenzato in misura

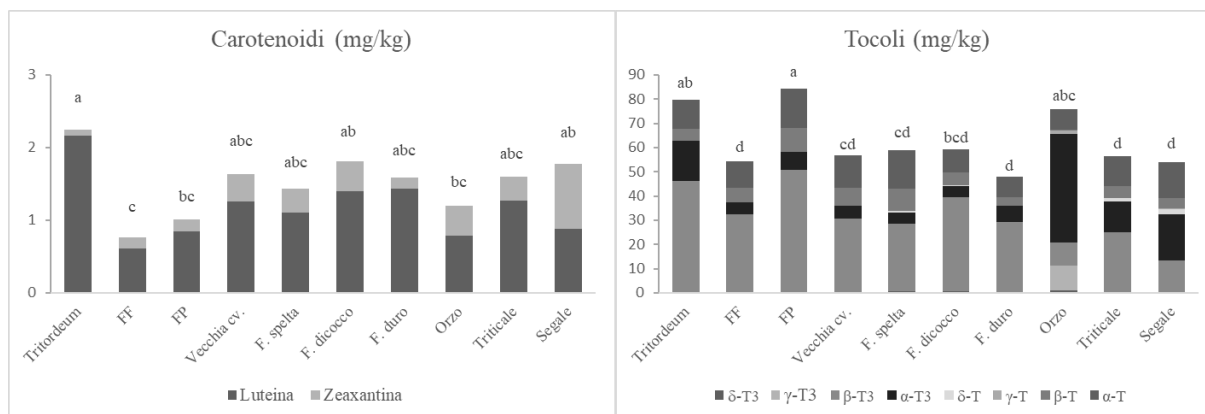
minore il contenuto in composti antiossidanti rispetto al genotipo. Tuttavia, il contenuto in acidi fenolici legati e antociani è risultato maggiore in parcelle provenienti dall'esperimento B (+19% e +135%, rispettivamente, se paragonati all'esperimento A) e da parcelle non concimate (+6% e +9%, rispettivamente, se paragonati al livello di concimazione maggiore). Il contenuto in acidi fenolici solubili ha seguito invece una tendenza opposta, con valori maggiori in parcelle provenienti dall'esperimento A (+14%, in media, rispetto al suolo meno fertile, B).



**Figura 1.** Contenuto in composti bioattivi in varietà di frumento tenero e tritordeum raggruppate sulla base del colore della granella. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative per  $p (F) < 0.05$ .

### **Selezione varietale: tritordeum e cereali minori**

Differenti varietà di tritordeum sono state messe a confronto con cultivar di frumento tenero, una vecchia varietà di frumento, farro dicocco e spelta, frumento duro, orzo, segale e triticale. I livelli produttivi di orzo sono risultati paragonabili a quelli del frumento tenero. Al contrario, frumento duro, triticale, segale, tritordeum e farro hanno presentato una produzione inferiore tra il 16% e il 47% rispetto al controllo (tritordeum -41%). Le varietà di tritordeum si sono distinte per un contenuto in carotenoidi superiore rispetto a tutte le altre varietà oggetto di confronto (Fig. 2). In particolare, il contenuto in carotenoidi è risultato essere mediamente 2 volte superiore rispetto al frumento tenero e maggiore anche rispetto al frumento duro (+42%). Anche l'analisi dei tocoli ha evidenziato come il tritordeum si distingua sia rispetto al frumento tenero (+19%), sia rispetto al frumento duro (+66%). Il più alti valori antiossidanti sono stati invece osservati negli orzi, seguiti da segali e tritordeum.

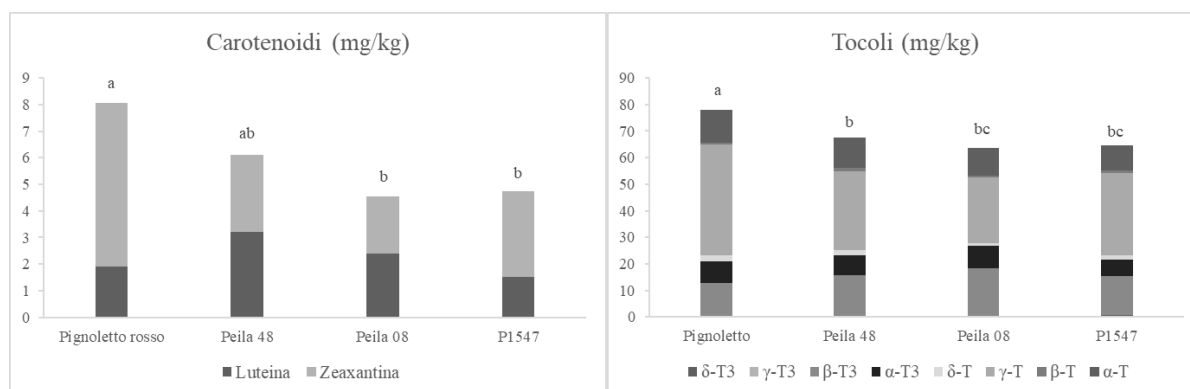


**Figura 2.** Confronto tra le specie di cereali vernini per il contenuto in carotenoidi e tocoli del macinato integrale. FF: frumento tenero di forza; FP: frumento tenero panificabile; F. spelta: farro spelta; F. dicocco: farro dicocco; F. duro: frumento duro. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative per  $p(F) < 0.05$ .

### Selezione varietale e gestione colturale: mais ibridi pigmentati

Per quanto riguarda il confronto agronomico, le nuove varietà ibride si sono caratterizzate per rese significativamente maggiori rispetto alla varietà a libera impollinazione Pignoletto rosso, ma inferiori rispetto all'ibrido di riferimento per la filiera alimentare, P1547. Tuttavia, queste varietà sono risultate maggiormente tolleranti ad alte densità di semina rispetto alla varietà autoctona. All'aumentare della densità di semina, gli ibridi Peila 48 e Peila 08 hanno incrementato la produttività del 15% e del 24%, rispettivamente, seppur le differenze siano state significative solo nel caso di Peila 08, che ha manifestato in media rese maggiori rispetto a Peila 48. La capacità antiossidante del macinato integrale di tali varietà è stata analizzata nei diversi ambienti e nelle diverse condizioni agronomiche. Maggiori valori sono stati osservati con alte densità di semina e nella località dove il campo è stato gestito in maniera biologica. Bassi e alti livelli di concimazione azotata hanno determinato i valori più alti di capacità antiossidante statisticamente non diversi tra loro.

I nuovi genotipi oggetto del confronto varietale si sono caratterizzati per un quantitativo maggiore di proprietà e composti antiossidanti e per migliori caratteristiche tecnologiche (*hardness* e resa molitoria). In particolare, i valori maggiori di capacità antiossidante sono stati osservati nell'ibrido Morello. Tra i due ibridi di Pignoletto, Peila 48 si è distinto per una maggiore capacità antiossidante rispetto a Peila 08. Pignoletto rosso si è distinto per un maggiore contenuto in carotenoidi e tocoli, seguito da Peila 48 (Fig. 3). Valori inferiori sono stati osservati per Peila 08, che non si è distinto significativamente dall'ibrido P1547.



**Figura 3.** Confronto tra le varietà di mais in esame per il contenuto in carotenoidi e tocoli del macinato integrale. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative per  $p(F) < 0.05$ .



### ***Gestione molitoria finalizzata all'ottenimento di farine ricche in composti antiossidanti***

Le strategie molitorie da adottare per ottenere farine ricche in composti antiossidanti devono essere idonee a valorizzare tali composti, che sono diversamente distribuiti nei vari strati della granella. La separazione degli strati cruscali, dove sono principalmente localizzati gli antociani, determina l'allontanamento di crusca colorata dalle elevate proprietà antiossidanti e l'ottenimento di farina raffinata dal limitato contenuto in composti bioattivi. È stato osservato come l'incorporazione di crusca in pane a pasta determini un miglioramento delle proprietà antiossidanti, ma non permetta di mantenere la specifica colorazione osservata nelle granelle di partenza. Tecniche di decorticatura progressiva attuate prima del processo di molitura hanno invece permesso di selezionare gli strati cruscali di maggiore interesse per la presenza del pigmento. Tali frazioni possono quindi essere incorporate in farina raffinata per ottenere alimenti dall'alto valore nutrizionale. Tra i carotenoidi, la luteina è il composto maggiormente presente nei cereali, principalmente presente nell'endosperma amilaceo. Tecniche di molitura convenzionali possono essere applicate a varietà a granella gialla al fine di ottenere farine raffinate ricche in xantofille e caratterizzate da un riconoscibile colore giallo. Per quanto riguarda il mais, il contenuto in composti con azione antiossidante è risultato più elevato nelle frazioni molitorie con minor granulometria, dove si sono concentrati però anche i contaminanti.

### **Conclusion**

Tutte le varietà innovative analizzate si sono distinte per un contenuto maggiore in composti antiossidanti rispetto alle varietà di controllo. Tuttavia, i livelli produttivi sono risultati inferiori, con differenze più o meno marcate a seconda della tipologia di cereale considerata. Alcune varietà sia di mais che di frumento si sono caratterizzate per una buona produttività e qualità e ciò che le rende interessanti per l'inserimento in filiere alimentari avanzate. Gli aspetti sanitari non sono stati inclusi nel presente contributo, ma sono di fondamentale importanza per considerazioni successive. L'ampia variabilità genetica che è stata osservata in tutte le prove offre spazio al miglioramento genetico e alla selezione di varietà migliorate e adattate a specifici ambienti colturali. Tali varietà innovative inoltre non necessitano di specifiche gestioni colturali rispetto alle varietà convenzionali; tuttavia, le strategie molitorie devono essere adeguate a mantenere il più possibile i vantaggi nutrizionali osservati nella granella di partenza, così come i processi successivi di trasformazione. Un approccio di filiera è quindi necessario per valorizzare appieno le potenzialità di questi genotipi innovativi e ottenere prodotti trasformati ad alto valore salutistico.

### **Bibliografia**

- Burešová B., Paznocht L., Kotíková Z., Giampaglia B., Martinek P., Lachman J. 2021. Changes in carotenoids and tocopherols of colored-grain wheat during unleavened bread preparation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 103: 104108.
- Giordano D., Reyneri A., Locatelli M., Coisson J. D., Blandino M. 2019. Distribution of bioactive compounds in pearled fractions of tritordeum. *Food Chemistry*, 301: 125228.
- Šulc M., Kotíková Z., Paznocht L., Pivec V., Hamouz K., Lachman J. 2017. Changes in anthocyanidin levels during the maturation of color-fleshed potato (*Solanum Tuberosum* L.) tubers. *Food Chemistry*, 237: 981-988.

## **Impiego di grani pigmentati per lo sviluppo di prodotti alimentari tracciabili ad alto valore aggiunto naturalmente ricchi di molecole bioattive: il progetto PIGRANI**

*P. De Vita<sup>1\*</sup>, S. Esposito<sup>1</sup>, S. Moscaritolo<sup>1</sup>, F. Sestili<sup>2</sup>, S. Palombieri<sup>2</sup>, M. Volpato<sup>3</sup>, F. Manni<sup>4</sup>, L. Tommasi<sup>5</sup>, L. Bonassisa<sup>5</sup>, E. De Maio<sup>5</sup>, M. C. Messia<sup>6</sup>, E. Marconi<sup>6,7</sup>*

<sup>1</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di Ricerca Cerealicoltura e colture Industriali (CREA-CI), SS 673 km 25+200, 71122 Foggia (FG).

<sup>2</sup>Università degli Studi della Tuscia, DAFNE, Via San Camillo de Lellis snc, 01100 Viterbo (VT).

<sup>3</sup>Grandi Molini SPA, Via Aldo Moro, 45100 Rovigo (RO).

<sup>4</sup>Promolog srl, Via Aldo Moro, 45100 Rovigo, Italia.

<sup>5</sup>Bonassisa BLAB BONASSISA BLAB S.S. 16 km. 684,300, Zona Incoronata A.S.I., 71122 Foggia (FG).

<sup>6</sup>Dipartimento Agricoltura, Ambiente e Alimenti (DiAAA), Università degli Studi del Molise, Via Francesco De Sanctis, 86100 Campobasso (CB).

<sup>7</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di Ricerca Alimenti e Nutrizione (CREA-AN), Via Ardeatina 546, 00178 Roma (RM).

\*E-mail: [pasquale.devita@crea.gov.it](mailto:pasquale.devita@crea.gov.it)

### **Abstract**

The Pigrani project involves the development of food products with high added value starting from a raw material "naturally" rich in bioactive compounds and optimizing the production and transformation process along the supply chain. The best lines of pigmented wheat, selected for the accumulation of anthocyanins and aptitude for industrial transformation, will be used for optimizing debranning and milling diagrams. On the basis of the results obtained, the best formulations capable of enhancing the organoleptic quality and nutritional characteristics of new functional products (pasta, bread, snacks, etc...) will be identified. For these new food products, nutritional and health labeling will be prepared, in accordance with current European legislation, to highlight the composition of the nutrients present. The Pigrani project also envisages the development of protocols to enhance derived food products, such as an advanced traceability system suitable both for certifying both the identity of the varieties of cereals used as raw material, and for assessing the presence of mycotoxigenic pathogens and mycotoxins at all stages of the supply chain, from farm to fork.

### **Riassunto**

Il progetto Pigrani prevede lo sviluppo di prodotti alimentari ad alto valore aggiunto partendo da una materia prima "naturalmente" ricca di composti bioattivi, ed ottimizzando il processo di produzione e trasformazione lungo la filiera. Le migliori linee di frumenti pigmentati, selezionate per accumulo di antociani ed attitudine alla trasformazione industriale, saranno utilizzate per la messa a punto e l'ottimizzazione di tecniche di decorticazione, molitura e di frazionamento dei frumenti pigmentati. Sulla base dei risultati ottenuti saranno individuate le migliori formulazioni in grado di esaltare la qualità organolettiche e le caratteristiche nutrizionali di nuovi prodotti funzionali (pasta, pane, snack, etc...). Per questi nuovi prodotti verrà predisposta una etichettatura nutrizionale e salutistica, ai sensi della normativa europea vigente, per evidenziare la composizione dei nutrienti presenti. Il progetto Pigrani prevede, inoltre, lo sviluppo di protocolli dedicati alla valorizzazione dei prodotti, riferibili a sistemi di tracciabilità/rintracciabilità avanzati sia per la certificazione dell'identità delle varietà dei cereali utilizzati come materie prime, sia per la valutazione della presenza di patogeni micotossigeni e di micotossine in tutte le fasi della filiera, dal campo alla tavola.

## **Introduzione**

Negli ultimi anni il crescente interesse da parte dei consumatori a favore di prodotti integrali a base di cereali ha favorito lo sviluppo di attività di ricerca e di sperimentazione dirette all'incremento del contenuto di sostanze a valenza nutrizionale come minerali, fibre alimentari e vitamine (Sestili *et al.*, 2019; Cimini *et al.*, 2022; Govindan *et al.*, 2022), per le quali è noto un loro coinvolgimento nella prevenzione di malattie degenerative (Kumar *et al.*, 2011). Tra i composti antiossidanti, carotenoidi e antociani, rivestono un ruolo di primaria importanza (Ficco *et al.*, 2014a). I carotenoidi sono responsabili del colore giallo degli sfarinati e dei prodotti derivati (Ficco *et al.*, 2014b) e sono distribuiti lungo la sezione trasversale della cariosside (Borrelli *et al.*, 2008), mentre gli antociani sono responsabili della colorazione rossa-violacea delle cariossidi e sono prevalentemente localizzati negli strati più esterni (Abdel-Aal and Rabalski, 2008; Ficco *et al.*, 2014b) di una particolare tipologia di grani pigmentati, che fino ad oggi non hanno avuto nessun riscontro commerciale. Le antocianine sono una classe di pigmenti appartenente alla famiglia dei flavonoidi, noti per essere direttamente coinvolti nei processi antiossidanti ed antinfiammatori. Esse rappresentano un gruppo molto eterogeneo in quanto la struttura di base può essere legata o meno ad un gruppo glicosidico (in assenza di gruppo glicosidico si parla più correttamente di antocianidine) e presenta un gruppo fenilico che può essere sostituito. Ciò rende estremamente complicata la determinazione qualitativa e quantitativa di questi composti che richiede un approccio multi-metodo per la determinazione contestuale del maggior numero di molecole target. Diversi studi sono stati condotti con l'obiettivo di individuare varietà di grano naturalmente ricche di composti nutrizionali e studiare l'effetto dei processi di trasformazione sul destino di questi composti per valorizzare le frazioni cruscali, allo scopo di individuare nuovi ingredienti per la produzione di alimenti funzionali (Ficco *et al.*, 2016; 2018; 2020). Sulla base di questi studi, il CREA di Foggia ha realizzato un programma di miglioramento genetico per lo sviluppo di linee e varietà ad alto contenuto di antociani. L'impiego di varietà di grano con pericarpo pigmentato, ricche di composti antocianici, rappresenta un elemento di innovazione che potrebbe avere importanti ripercussioni sulla filiera cerealicola alimentando il settore delle "speciality" ad alto valore aggiunto. Nella situazione attuale in cui il mercato delle materie prime (grano duro e tenero) dipende fortemente dall'andamento del commercio internazionale, caratterizzato da surplus ed estrema volatilità dei prezzi, il margine di operatività delle aziende agricole diventa sempre più esiguo, portando ad una progressiva riduzione della superficie investita ed aumentando la dipendenza dall'estero delle industrie di prima (molini) e seconda trasformazione (pastifici e panifici).

Pertanto, la caratterizzazione dei nuovi materiali genetici, l'ottimizzazione del processo di trasformazione, la progettazione di nuovi prodotti e la validazione di metodiche analitiche per la tracciabilità ed il controllo della qualità lungo la filiera consentirà in prospettiva futura di sviluppare nuovi prodotti di estremo interesse economico, nutrizionale, sensoriale e di servizio assicurando al comparto industriale di riferimento prestazioni competitive.

## **Materiali e metodi**

Il progetto è articolato in 9 obiettivi realizzativi (OR) ed ha come base di partenza una collezione di 50 varietà di frumento pigmentato duro e tenero derivate dal programma di miglioramento genetico del CREA di Foggia. L'impiego di questa tipologia di frumenti nel processo di trasformazione industriale per la produzione di prodotti arricchiti in composti bioattivi ed in particolare di antociani richiede la caratterizzazione e la standardizzazione dei parametri chimico-fisici, biochimici e nutrizionali della materia prima. A tal fine sono previste una serie di attività di caratterizzazione biochimica della granella per valutare le principali componenti della

cariosside (proteine, glutine, amido, fibre alimentari). Al termine del 1° anno, sulla base dei risultati ottenuti dall'attività di caratterizzazione qualitativa (OR1), agronomica (OR2) e molecolare (OR3), verranno selezionate 2-4 varietà di grano per ciascuna delle 2 specie di frumento. I materiali genetici selezionati serviranno per l'ottimizzazione dei processi di decorticazione/macinazione, per definire gli standard qualitativi dei nuovi sfarinati ottenuti (OR4-6) e per sviluppare un ricco paniere di nuovi prodotti funzionali (pasta, pane e prodotti da forno) ricchi di antociani con migliorate caratteristiche sensoriali e nutrizionali (OR7). La possibilità di ottimizzare i diagrammi di macinazione e di ottenere nuove formulazioni assicurerà alla materia prima di conservare intatte tutte le principali proprietà nutrizionali ed ai prodotti finali di esaltare il contenuto in composti ad alto valore nutritivo. Parallelamente, il progetto prevede la predisposizione di specifiche etichette nutrizionali in grado di comunicare il valore aggiunto dei nuovi prodotti (OR8) e la messa a punto e validazione di metodiche analitiche per il controllo della qualità e della tracciabilità (OR9).

Gli obiettivi realizzativi del progetto saranno perseguiti attraverso una partnership pubblico-privata in grado di assicurare la copertura di tutti i segmenti della filiera grano-pasta e grano-pane con un approccio multidisciplinare, sfruttando soluzioni tecnologiche e biotecnologiche. In particolare, il progetto prevede il coinvolgimento, in qualità di co-proponente, del più grande laboratorio di analisi privato del Centro-Sud Italia (Bonassisa Lab), della società la Promolog Srl che dedica particolare attenzione all'analisi del settore molitorio per la produzione di sfarinati di varie tipologie e del CREA, il più importante Ente di ricerca pubblico italiano impegnato nell'agro-alimentare.

### **Risultati e discussione**

I risultati attesi e l'articolazione del progetto inducono a ritenere che vi possano essere ricadute economiche particolarmente importanti sia sul partner richiedente (Bonassisa Lab) sia sui partner coinvolti (Promolog e CREA). Per quanto concerne il partner Bonassisa Lab, l'esperienza acquisita sulla messa a punto di nuovi formulati ad alto valore aggiunto ed il conseguimento di protocolli di analisi in grado di assicurare gli standard nutrizionali dichiarati in etichetta e la tracciabilità/rintracciabilità della materia prima determinerà un indubbio vantaggio competitivo potendo offrire ai propri clienti un immediato supporto tecnologico/analitico per la formulazione di prodotti innovativi a partire da cereali pigmentati ed un insieme di protocolli analitici appositamente messi a punto sulle matrici di interesse e validati secondo la norma UNI EN ISO 17025. L'acquisizione delle competenze tecnico-scientifiche, in un settore come quello agro-alimentare, caratterizzato sempre più da una crescente complessità e dinamicità dell'offerta di prodotti e servizi, permetterà al partner BonassisaLab oltre che di incrementare il fatturato dell'azienda, di presentarsi sul mercato con una posizione per garantire l'origine, la qualità della materia prima e dei processi necessari per sviluppare prodotti ad alto valore aggiunto. Per il co-proponente Promolog, le nuove conoscenze acquisite con il progetto PIGRANI, contribuiranno a migliorare l'efficienza del processo di lavorazione degli sfarinati, offrendo una concreta opportunità di differenziare il paniere di prodotti ad alto valore aggiunto. Come risultati indiretti si prevede di curare in maniera particolare la definizione della proprietà intellettuale dei materiali genetici in collaborazione con il CREA-CI oltre che valorizzare economicamente i risultati attraverso la gestione di un marchio specifico per la tipologia di prodotti derivati dai grani pigmentati.

## Conclusioni

Il progetto, quindi, partendo dalla materia prima, rivolge particolare attenzione allo sviluppo di tecnologie e prodotti innovativi che mirano sia al potenziamento della competitività dei sistemi produttivi delle aziende e delle imprese, con particolare riferimento al sistema socio-economico delle regioni meno sviluppate e in transizione, sia al miglioramento della qualità della vita, della salute, della sicurezza e del benessere dell'uomo. In particolare, il progetto PIGRANI propone soluzioni tecnologiche per l'industria italiana impegnata nella filiera cerealicola con l'obiettivo di i) rafforzare il settore sementiero nazionale ed assicurare la produzione di sementi ad alto valore aggiunto, ii) ottimizzare la gestione dei processi di trasformazione industriale per valorizzare le caratteristiche della materia prima, iii) migliorare gli standard di sicurezza igienico-sanitaria e la qualità dei prodotti trasformati; iv) predisporre metodiche e protocolli in grado di assicurare la tracciabilità/rintracciabilità della materia prima (identità varietale) e dei prodotti finiti; v) rafforzare la percezione del consumatore della qualità nutrizionale e salutistica dei prodotti alimentari a base di grano.

## Ringraziamenti

Le attività di ricerca sono state finanziate dal Ministero dello Sviluppo Economico (MISE) attraverso il progetto PIGRANI "Impiego di grani pigmentati per lo sviluppo di prodotti alimentari tracciabili ad alto valore aggiunto naturalmente ricchi di molecole bioattive" - Decreto n. 234768 del 15/09/2020 MISE - F/200072/01/X45.

## Bibliografia

- Abdel-Aal ESM., Rabalski I. 2008. Bioactive compounds and their antioxidant capacity in selected primitive and modern wheat species. *The Open Agriculture Journal*, 2: 7-14.
- Borrelli G.M., De Leonardis A.M., Platani C., Troccoli A. 2008. Distribution along durum wheat kernel of the components involved in semolina colour. *Journal of Cereal Science*, 48: 494-502.
- Cimini A., Sestili F., Moresi M. 2022. Environmental Profile of a Novel High-Amylose Bread Wheat Fresh Pasta with Low Glycemic Index. *Foods*, 11(20): 3199.
- Dwivedi S. L., Upadhyaya H. D., Chung I. M., De Vita P., Garcia-Lara S., Guajardo-Flores D., Gutiérrez-Urbe J.A., Serna-Saldívar S.O., Rajakumar G., Sahrawat K.L., Kumar J., Ortiz R. 2016. Exploiting phenylpropanoid derivatives to enhance the nutraceutical values of cereals and legumes. *Frontiers in Plant Science*, 7: 763.
- Ficco D. B., Mastrangelo A. M., Trono D., Borrelli G. M., De Vita P., Fares C., Beleggia R., Platani C., Papa R. 2014a. The colours of durum wheat: a review. *Crop and Pasture Science*, 65(1): 1-15.
- Ficco D.B.M., De Simone V., Colecchia S. A., Pecorella I., Platani C., Nigro F., De Vita P. 2014b. Genetic variability in anthocyanin composition and nutritional properties of blue, purple, and red bread (*Triticum aestivum* L.) and durum (*Triticum turgidum* L. ssp. *turgidum* convar. *durum*) wheats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(34): 8686-8695.
- Ficco D.B.M., De Simone V., De Leonardis A. M., Giovanniello V., Del Nobile M. A., Padalino L., Lecce L., Borrelli M.G., De Vita P. 2016. Use of purple durum wheat to produce naturally functional fresh and dry pasta. *Food Chemistry*, 205: 187-195.
- Ficco D.B.M., Borrelli G.M., Giovanniello V., Platani C., De Vita P. 2018. Production of anthocyanin-enriched flours of durum and soft pigmented wheats by air-classification, as a potential ingredient for functional bread. *Journal of Cereal Science*, 79: 118-126.
- Ficco D. B. M., Borrelli G. M., Miedico O., Giovanniello V., Tarallo M., Pompa C., De Vita P., Chiaravalle A. E. 2020. Effects of grain debranning on bioactive compounds, antioxidant capacity and essential and toxic trace elements in purple durum wheats. *LWT*, 118: 108734.

Govindan V., Singh RP., Juliana P., Mondal S., Bentley AR. 2022. Mainstreaming grain zinc and iron concentrations in CIMMYT wheat germplasm. *Journal of Cereal Science*, 103473.

Kumar P., Yadava R. K., Gollen B., Kumar S., Verma R. K., Yadav S. 2011. Nutritional contents and medicinal properties of wheat: a review. *Life Sciences and Medicine Research*, 22(1): 1-10.

Sestili F., Garcia-Molina M. D., Gambacorta G., Beleggia R., Botticella E., De Vita P., Savatin DV., Masci S., Lafiandra D. 2019. Provitamin A biofortification of durum wheat through a TILLING approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22): 5703.

## **Impronta del carbonio della *Pizza Napoletana Verace***

A. Falciano<sup>1</sup>, A. Cimini<sup>2</sup>, P. Masi<sup>1</sup>, M. Moresi<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Agraria, Università di Napoli Federico II, Via Università 100, 80055 Portici (NA).

<sup>2</sup>Dipartimento per l'Innovazione nei sistemi Biologici, Agroalimentari e Forestali, Università della Tuscia, Via San Camillo De Lellis snc, 01100 Viterbo (VT).

\*E-mail: [mmoresi@unitus.it](mailto:mmoresi@unitus.it)

### **Abstract**

In this study, the cradle-to-grave carbon footprint of the different versions of the *True Neapolitan Pizza* was estimated in accordance with the PAS 2050 standard method. By assuming the same specific greenhouse gas emissions associated to some life cycle phases in the case of a typical Neapolitan pizzeria (i.e., energy consumption, refrigerant gas leakage, detergent production, and wastewater treatment), the Marinara pizza carbon footprint was about 1.7 kg CO<sub>2e</sub>/kg, equal to about half of that of Margherita pizza topped with mozzarella cheese. By garnishing the latter with buffalo mozzarella cheese, its footprint would increase up to ~8.4 kg CO<sub>2e</sub>/kg. Such difference in their environmental impacts mainly derives from the use of condiments of only vegetable or even animal origin, these varying the protein and lipid contents and consequently the energy value of each pizza type.

### **Riassunto**

In questo studio si è stimata l'impronta di carbonio dalla culla alla tomba delle diverse versioni della *Pizza Napoletana Verace* conformemente al metodo standard PAS 2050. Assumendo gli stessi contributi emissivi riscontrati nel caso di una pizzeria tipica napoletana per alcune fasi del ciclo di vita (consumi energetici, perdite di gas refrigeranti, produzione di detersivi e trattamento delle acque reflue), il carbon footprint della pizza Marinara è risultato dell'ordine di 1,7 kg CO<sub>2e</sub>/kg, pari a circa la metà di quello della pizza Margherita guarnita con fiordilatte. Per quest'ultima, il condimento con mozzarella di bufala ne aumenterebbe l'impronta a ~8,4 kg CO<sub>2e</sub>/kg. Il diverso impatto ambientale deriva soprattutto dall'impiego di condimenti di origine solo vegetale od anche animale, che ne modificano i tenori proteico e lipidico e di conseguenza il valore energetico.

### **Introduzione**

La Pizza Napoletana Verace è uno dei prodotti italiani più apprezzati in tutto il mondo. Il Regolamento della Commissione Europea n. 97/2010 (EU, 2010) ha incluso la denominazione *Pizza Napoletana* nell'albo delle specialità tradizionali garantite (STG). Inoltre, l'UNESCO (2017) ha iscritto l'arte del pizzaiolo napoletano nella Lista Rappresentativa del Patrimonio Culturale Immateriale dell'Umanità.

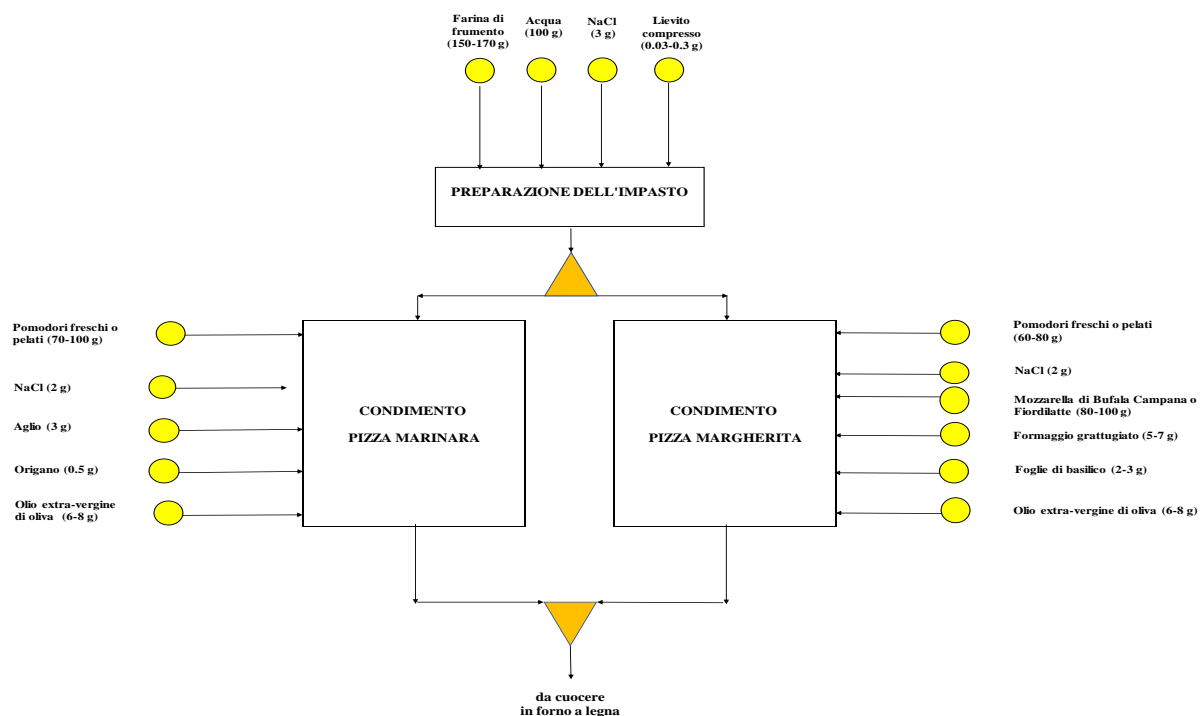
In Italia la produzione di pizza artigianale in ristoranti, pizzerie, bar o gastronomie copre circa l'80% del fatturato complessivo pari a ca. 15 miliardi di euro/anno, mentre il restante 20% è coperto dalla pizza surgelata (Anon., 2020). A fronte di un consumo pro-capite annuo pari a 7,6 kg, circa otto italiani su dieci scelgono la pizza margherita, marinara o capricciosa (UDiCon, 2020).

Nell'ambito delle attività del progetto di ricerca PRIN 2017 (*The Neapolitan pizza: processing, distribution, innovation and environmental aspects*), si è utilizzato il metodo standard *Publicly Available Specification* (PAS) 2050 (BSI, 2011) per calcolare l'impronta di carbonio dalla culla alla tomba (CF) di una Pizza Napoletana Verace sia servita ai tavoli di una pizzeria tipica di medie dimensioni, sia da asporto in scatole di cartone (Falciano *et al.*, 2022). A fronte di un CF medio

di ~4,69 kg CO<sub>2e</sub>/pizza consumata, si è riscontrato che la produzione degli ingredienti utilizzati ne rappresentava il 74% con un contributo della sola mozzarella di bufala campana DOP pari al 52% circa di CF. Il contributo delle bevande servite ai tavoli, dei materiali di imballaggio, dei trasporti e delle fonti di energia elettrica e termica variava tra il 6,8 e il 4,6% di CF. In detto studio, al fine di aiutare i ristoratori ad individuare la strategia di mitigazione più efficace, si era anche effettuata una simulazione per valutare il livello di mitigazione ottenibile ricorrendo a varie opzioni, quali una produzione più sostenibile di mozzarella di bufala, contenitori più leggeri e riutilizzabili per birra e acqua minerale e per le principali verdure fresche, furgoni diesel conformi ai nuovi target emissivi fissati dalla Commissione Europea (EU, 2019), forni elettrici in sostituzione dei tradizionali forni a legna ed uso di energia elettrica da fonti rinnovabili. Scopo di questo lavoro è stato quello di stimare l'impronta del carbonio delle due tipologie di Pizza Napoletana Verace (Marinara e Margherita) sulla base degli ingredienti previsti dal Disciplinare di produzione (EU, 2010), enucleando alcune emissioni di gas-serra (*greenhouse gases*, GHG) associate al ciclo di vita da quelle riscontrate nella pizzeria tipica sopra indicata (Falciano *et al.*, 2022).

### Metodologia

Per valutare il carbon footprint di una pizza Marinara o Margherita (unità funzionale), si è eseguito uno studio del tipo *business-to-consumer* conforme alle norme ISO 14040 (ISO, 2006a) e 14044 (ISO, 2006b). L'inventario degli ingredienti utilizzati è stato dedotto dalle specifiche del Regolamento EU (2010), come illustrato in Figura 1.



**Figura 1.** Quantità minime e massime degli ingredienti necessari per guarnire la Pizza Napoletana (STG) tipo Marinara o Margherita secondo il Regolamento EU (2010).



**Tabella 1.** Riepilogo delle unità di vendita (UV), del tipo e della massa del relativo imballaggio per ciascuna materia prima utilizzata nella preparazione della Pizza Napoletana Verace, nonché del rapporto ponderale imballaggio/materia prima confezionata (I/UV).

Materie prime	Unità di vendita (UV)	Imballaggio (I) tipo	massa [g]	I/UV
	[kg]			[g/kg]
Ciocchi di rovere	800	Pallet EPA	25000	31,25
Farina di frumento tenero	25	Sacchi di carta	115	4,60
Lievito compresso	0,025	Laminato	1	0,04
Pomodori pelati	0,4	Lattina	70	0,18
Mozzarella di bufala PDO	3	Vaschetta PS	161	53,67
Fiordilatte TSG	1	Busta PE	1	1,0
Grana Padano	2	Busta PE	3	1,5
Sale da tavola	1	Cartoncino	33	33,0
Olio extra-vergine di oliva	~5	Lattina	232	46,4
Origano	1	Barattolo PET	186	186,0
Aglione	0,1	Rete PE	1	10,0
Basilico	0,3	Vassoio PE	597	1990,0
Pizza box	-	Cartone laminato	168	-

In Tabella 1 si riporta per ciascuno degli ingredienti sia la quantità presente nell'unità di vendita (UV), sia la tipologia e la massa del relativo imballaggio (I) sì da evidenziare il contributo dei materiali di imballaggio per unità di ingrediente utilizzato.

Con riferimento a quanto dettagliato da Falciano *et al.* (2022), si è valutato il contributo del trasporto di tutte le materie prime ed imballaggi dai siti di produzione (PS) o dai centri di distribuzione regionali (RDC) al cancello del ristorante (RG) ipotizzando un percorso medio di 100 km a mezzo di veicoli commerciali leggeri, mentre per la legna da ardere si sono impiegati autocarri leggeri. I rifiuti post-consumo (umidi, indifferenziati e da imballaggi) sono stati conferiti al centro di raccolta (distanza media 50 km) tramite gli autocarri per la raccolta dei rifiuti urbani, ove sono stati smaltiti secondo lo scenario di gestione complessivo dei rifiuti solidi urbani italiani nel 2019 (Ronchi e Nepi, 2020). Infine, le acque reflue da sciacquoni, lavelli e lavastoviglie sono stati smaltiti nella rete fognaria comunale, assumendo che il loro volume fosse pari a quello del consumo complessivo di acqua potabile. Il carbon footprint degli ingredienti è stato dedotto sia dalla banca data SU-EATABLE LIFE, che riporta le emissioni di gas serra (valori medi, minimo e massimo, deviazione standard) associate alla produzione di diverse categorie di alimenti freschi a seguito di una meta-analisi effettuata da Petersson *et al.* (2021), sia dalla letteratura tecnica. In tal modo, si sono esclusi i sottosistemi legati alla coltivazione delle materie prime (grano tenero, pomodoro, aglio, origano, basilico, etc.) ed alla produzione di ingredienti principali, quali mozzarella, formaggio da grattugia, olio extra-vergine di oliva e sale da cucina.

## Risultati e discussione

In Tabella 2 si riportano le quantità minime e quelle massime, nonché il carbon footprint ( $CF_i$ ), degli ingredienti utilizzati per guarnire la Pizza Napoletana (STG) nelle versioni Marinara e Margherita secondo il Regolamento CE n. 97/2010 (EC, 2010), mentre in Tabella 3 i valori stimati delle emissioni GHG associate alle diverse fasi del ciclo di vita della pizza.

Come indicato in Tabella 3, il contributo emissivo dei soli ingredienti utilizzati per preparare una pizza Marinara varierebbe fra 208 e 266 g  $CO_{2e}$ . Per contro, le emissioni GHG associate alla formulazione di una pizza Margherita sarebbero comprese fra 945 e 1191 g  $CO_{2e}$  se guarnita con fiordilatte o fra 2883 e 3613 g  $CO_{2e}$  se condita con una pari quantità di mozzarella di bufala campana DOP. Come atteso, l'impronta del carbonio della pizza Marinara è risultata nettamente più contenuta, soprattutto se confrontata con quella della pizza Margherita condita con mozzarella di bufala.

**Tabella 2.** Quantità minime e massime degli ingredienti utilizzati per guarnire la Pizza Napoletana (STG) nelle versioni Marinara e Margherita (EC, 2010), unitamente al loro carbon footprint (CF<sub>i</sub>).

Pizza Ingrediente [g]	Marinara		Margherita		CF <sub>i</sub> kg CO <sub>2e</sub> kg <sup>-1</sup>
	Min	Max	Min	Max	
Farina di frumento 0 o 00	150	170	150	170	0.61±0.23
Lievito compresso	0.03	0.3	0.03	0.3	0.82±0
Acqua	100	100	100	100	0.0003±0
Pomodori pelati	70	100	60	80	1.28±0.04
Mozzarella di bufala DOP	-	-	80	100	32.7±0.10
Fiordilatte	-	-	-	-	8.5±1.4
Formaggio grattugiato	-	-	5	7	14.3±2.8
Sale da tavola	5	5	5	5	0.16±0
Olio di oliva extra-vergine	6	8	6	8	3.8±2.9
Origano	0.5	0.5	-	-	1.60±0
Basilico	-	-	2	3	1.60±0
Aglio	3	3	-	-	0.67±0.07
Massa totale [g]	335	387	408	473	-

**Tabella 3.** Contributo delle emissioni GHG delle diverse fasi del ciclo di vita della Pizza Napoletana Verace (STG) nelle versioni Marinara e Margherita (condita con fiordilatte, FL, o con mozzarella di bufala, MB).

Fasi del ciclo di vita	Impronta del carbonio [g CO <sub>2e</sub> /pizza]					
	Marinara		Margherita + FL		Margherita + MB	
	min	max	min	max	min	max
Produzione di ingredienti	208	266	945	1190	2883	3613
Produzione di imballaggi	33	47	40	55	58	77
Trasporto	66	77	80	94	81	95
Produzione di detersivi				5		
Consumo di elettricità				198		
Consumo di legna da ardere				15		
Perdite di gas refrigeranti				24		
Trattamento acque reflue				16		
Smaltimento rifiuti	9	10	15	19	20	25
Impronta del carbonio (CF) [g CO <sub>2e</sub> /pizza]	574	659	1339	1617	3300	4068
CF specifico [kg CO <sub>2e</sub> /kg]	1.72	1.70	3.28	3.42	8.09	8.60

Tale impatto è conseguenza del carbon footprint stimato da Berlese *et al.* (2019), che variava fra 29 e 34 kg CO<sub>2e</sub> per kg di mozzarella di bufala a seconda del metodo di allocazione (economico o fisico) prescelto. Gli stessi autori attribuivano una così elevata impronta del carbonio alla bassa produttività di latte bufalino riscontrata nelle 6 aziende zootecniche del Nord-Est prese in esame; tuttavia, ritenevano che potesse essere ridotta almeno del 40% qualora si riuscisse ad aumentare la produttività aziendale fino alle medie nazionali. D'altra parte, l'impronta del carbonio di una mozzarella biologica prodotta con latte di bufala in Brasile stimata da Alves *et al.* (2019) risultava non solo nettamente inferiore (8,2 kg CO<sub>2e</sub>/kg), ma anche dello stesso ordine di grandezza dell'impronta del fiordilatte (Tab. 2).

Tenendo conto che la massa di una pizza Marinara varia fra 335 e 387 g, mentre quella di una pizza Margherita fra 408 e 473 g (Tab. 2), il carbon footprint relativo ai soli ingredienti della pizza Marinara varierebbe fra 0,62 e 0,69 kg CO<sub>2e</sub>/kg, mentre quello di una pizza Margherita fra 2,3 e 2,5 kg CO<sub>2e</sub>/kg oppure fra 7,1 e 7,6 kg CO<sub>2e</sub>/kg se rispettivamente condita con fiordilatte o mozzarella di bufala. Tale diversità nelle emissioni GHG deriva dall'impiego di condimenti di sola origine vegetale od anche animale (mozzarella da latte di vacca o di bufala). In Tabella 3 si è anche ricalcolato il contributo emissivo della produzione degli imballaggi effettivamente impiegati per ogni ingrediente delle 3 tipologie di pizza in esame, del loro trasporto e dello smaltimento dei rifiuti organici e di imballaggio, assumendo per semplicità gli stessi contributi emissivi riscontrati nel caso della pizzeria tipica napoletana previamente studiata (Falciano *et al.*, 2022) per le altre fasi del ciclo di vita, quali consumo di energia termica ed elettrica, perdite di gas

refrigeranti dai frigoriferi e dai freezer, produzione di detersivi e trattamento delle acque reflue. I valori di carbon footprint dalla culla alla tomba della pizza Marinara e della pizza Margherita guarnita con fiordilatte concordano quelli (2,5-3,5 kg CO<sub>2e</sub>/kg) stimati da Stylianou *et al.* (2018) per caratterizzare l'impronta del carbonio della pizza nella dieta statunitense, ove sono stati identificati da 18 a 69 componenti diversi, principalmente verdure, cereali e formaggio. Nettamente diverso è risultato il carbon footprint della pizza Margherita condita con mozzarella di bufala, ammesso che il carbon footprint di quest'ultimo ingrediente sia effettivamente pari a quello stimato da Berlese *et al.* (2019).

In conclusione, è opportuno rilevare che i carbon footprint qui calcolati per le diverse versioni della *Pizza Napoletana Verace* non possano essere direttamente comparati non solo per la diversa massa unitaria, ma soprattutto per i diversi tenori proteico e lipidico che ne variano il relativo valore energetico.

### Ringraziamenti

Lavoro eseguito con contributo MIUR (Progetto PRIN 2017 - prot. 2017SFTX3Y\_001).

Gli autori sono grati al Sig. Enzo Coccia ed alla Pizzeria La Notizia 753 (NA) per aver fornito i dati basilari per questo studio.

### Bibliografia

Alves E.C., Soares B.B., de Almeida Neto J.A., Rodrigues L.B. 2019. Strategies for reducing the environmental impacts of organic mozzarella cheese production. *Journal of Cleaner Production*, 223: 226-237.

Anon. 2020. Pizza, un business che lievita anno per anno. <https://www.cna.it/pizza-un-business-che-lievita-anno-per-anno/>.

Berlese M., Corazzin M., Bovolenta S. 2019. Environmental sustainability assessment of buffalo mozzarella cheese production chain: A scenario analysis. *Journal of Cleaner Production*, 238: 117922.

BSI 2011. *PAS 2050: 2011. Specification for the assessment of the life cycle greenhouse gas emissions of goods and services*. British Standards Institution, London, UK.

EU 2010. Commission Regulation (EU) No. 97/2010, "entering a name in the register of traditional specialties guaranteed [Pizza Napoletana (TSG)]". *Official Journal of the European Union* L 34, 5.02.2010.

EU 2019. Regulation (EU) 2019/631 of the European Parliament and of the Council of 17 April 2019 setting CO<sub>2</sub> emission performance standards for new passenger cars and for new light commercial vehicles and repealing Regulations (EC) No 443/2009 and (EU) No 510/2011. *Official Journal of the European Union*, 111/13, 25.4.2019, p. 13-53.

Falciano A., Cimini A., Masi P., Moresi M. 2022. Carbon footprint of a typical Neapolitan pizzeria. *Sustainability*, 14(5): 3125.

ISO 2006a. *14040-Environmental Management e Life Cycle Assessment e Principles and Framework*. International Organization for Standardization, Genève, CH.

ISO 2006b. *14044-Environmental Management - Life Cycle Assessment - Requirements and Guidelines*. International Organization for Standardization, Genève, CH.

Petersson T., Secondi L., Magnani A., Antonelli M., Dembska K., Valentini R., Varotto A., Castaldi S. 2021. A multilevel carbon and water footprint dataset of food commodities. *Scientific Data*, 8: 127.

Ronchi E., Nepi M.L. 2020. *L'Italia del riciclo 2020*. Fondazione per lo sviluppo sostenibile, FISE UNICIRCULAR, Roma.

Stylianou K., Nguyen V.K., Fulgoni V.L., Jolliet O. 2018. Environmental impacts of mixed dishes: A case study on pizza. *The FASEB Journal*.

[https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fasebj.31.1\\_supplement.lb386](https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fasebj.31.1_supplement.lb386)

UDiCon 2020. *Giornata mondiale della Pizza: festa per i consumatori*. Unione per la Difesa dei Consumatori. <https://www.udicon.org/2020/01/17/giornata-mondiale-della-pizza-festa-per-i-consumatori/>.

UNESCO (United Nations Education, Scientific and Cultural Organization) 2017. *Decision of the Intergovernmental Committee: 12.COM 11.B.17*. <https://ich.unesco.org/en/decisions/12.COM/11.B.17>.

## **L'indirizzo interpretativo dell'Autorità Garante della Concorrenza e del Mercato sulle regole di etichettatura dell'alimento pasta**

*D. Monci\**

Dipartimento Agricoltura, Ambiente e Alimenti (DiAAA), Università degli Studi del Molise, Via Francesco De Sanctis, 86100 Campobasso (CB).

\*E-mail: [domenico.monci@unimol.it](mailto:domenico.monci@unimol.it)

### **Abstract**

The work takes as a basis some decisions taken by the Italian Competition Authority after a survey carried out in 2019 aimed at evaluating the transparency and non-deceptive information offered to the average consumer of the indications on the pasta supply chain. The Authority challenged some operators about the methods of presenting durum wheat semolina pasta to the consumer, both on the label and on the respective company websites, believing that these methods operated with words and images an emphatic reference to the Italian character of the product, arousing in the consumer the misleading idea that the entire pasta production chain was Italian while wheat of foreign origin is also used for the production. Through an in-depth analysis of jurisprudence and doctrine, the work traces the delicate theme of the search for the limit between the operator's duty to inform and the consumer's right to be informed, highlighting how in some cases there is the risk of expecting that there is a sort of category of "reinforced responsibility" in which the operator becomes a kind of legal guardian of a consumer, inexperienced, uninformed and almost inanimate.

### **Riassunto**

Il lavoro prende le mosse da alcune decisioni adottate dall'Autorità Garante della Concorrenza e del Mercato dopo un'indagine svolta nel 2019 finalizzata a valutare la trasparenza e la non ingannevolezza delle informazioni offerte al consumatore medio delle indicazioni sulla filiera della pasta. L'Autorità ha contestato ad alcuni operatori le modalità di presentazione al consumatore della pasta di semola di grano duro, sia in etichetta, sia sui rispettivi siti internet aziendali, ritenendo che tali modalità, operassero con parole e immagini un richiamo enfatico all'italianità del prodotto, suscitando nel consumatore l'idea ingannevole che l'intera filiera produttiva della pasta fosse italiana mentre per la produzione viene impiegato anche grano di origine estera. Attraverso una analisi approfondita della giurisprudenza e dottrina, il lavoro ripercorre il delicato tema della ricerca del limite tra il dovere dell'operatore di informare e il diritto del consumatore ad essere informato, evidenziando come in alcuni casi si corra il rischio di pretendere che esista una sorta di categoria di "responsabilità rinforzata" nella quale, l'operatore diventi una specie di tutore legale di un consumatore, sprovvisto, disinformato e quasi inanimato.

### **Introduzione**

L'Autorità Garante per la Concorrenza e il Mercato (d'ora in avanti AGCM o "Autorità") nel corso del 2019, ha avviato un'indagine finalizzata a valutare la trasparenza e la non ingannevolezza delle informazioni offerte su base volontaria, con riferimento al corretto trasferimento al consumatore medio delle indicazioni sulla filiera della pasta. L'Autorità ha contestato in alcuni casi le complessive modalità di presentazione al consumatore della pasta di semola di grano duro per come proposta, sia in etichetta, sia sui rispettivi siti internet aziendali. Le contestazioni si fondano sull'assunto che tali modalità, attraverso il richiamo enfatico all'italianità del prodotto operato con parole, immagini, strutturazione e posizionamento dei messaggi nella grafica del packaging, siano in grado di ingenerare nel consumatore l'idea

ingannevole che l'intera filiera produttiva della pasta, a partire dalla materia prima, sia italiana mentre, di contro, per la relativa produzione veniva (e viene) impiegato anche grano di origine estera. Alcuni operatori hanno optato per impegni a modificare l'etichetta. Per chi non lo ha fatto (uno, in realtà) l'AGCM ha precisato che si tratta di pratica commerciale scorretta ai sensi degli artt. 21 e 22 del Codice del Consumo e ne ha vietato la diffusione e continuazione, imponendo che sia modificata entro novanta giorni, nonché irrogando una sanzione amministrativa pecuniaria di un milione di euro.

### **Analisi della giurisprudenza e della dottrina**

La presentazione dell'alimento quale strumento necessario per consentire al consumatore di compiere un acquisto consapevole, passa essenzialmente attraverso le informazioni riportate sull'etichetta che accompagna l'imballaggio di qualsiasi prodotto alimentare immesso sul mercato o fornite con qualsiasi altro mezzo (Bruno 2017). Precisamente, il regolamento (UE) n. 1169/2011, riferendosi espressamente alle "informazioni sugli alimenti ai consumatori" ha mostrato il chiaro approccio del legislatore europeo di voler affrancare le scelte del consumatore, per il quale delinea una sorta di strumentario legale informativo "a vocazione formativa". Lo scopo del regolamento è infatti quello di costruire nel consumatore una coscienza consapevole ad un acquisto che sia il più possibile epurato dagli espedienti delle politiche commerciali concorrenziali e si introduce una regola generale di neutralità comunicativa che, attraverso la fornitura di informazioni doverose, renda la negoziazione dell'ignaro consumatore libera da qualsiasi ostacolo distorsivo che possa incidere sulla conformità dell'alimento alle proprie aspettative (Germanò 2010).

Il sistema di etichettatura delineato nel Regolamento (UE) n. 1169/2011 si confronta con la realtà del processo economico globale in cui la legittima vocazione competitiva esercitata dagli operatori, attraverso l'uso di leciti meccanismi di accattivante informazione, e le conoscenze aspecifiche del consumatore, ispirate spesso dalle esigenze sommarie di un'esistenza sociale frenetica, fanno sì che le promesse di trasparenza, oscillino tra gli interessi contrapposti della filiera: la lecita attitudine degli operatori a valorizzare la natura e la composizione dei propri prodotti e l'altrettanto lecita istanza di accesso ad informazioni certe da parte del consumatore (Masini 2019).

Tale tensione diviene estremamente apprezzabile in quel segmento della filiera nel quale il momento comunicativo appare connotato di una particolare portata per il valore che ad esso attribuiscono entrambi gli attori della transazione commerciale, ossia quello relativo alla provenienza geografica, atteso che, siffatta connotazione dell'alimento può divenire elemento qualificante e quasi discriminante, sia per gli operatori sia per coloro che si accingono a sceglierlo. La dinamica comunicativa in tale occasione si sviluppa in una sorta di *diabolico* reticolo di doveri nel quale, il dovere di informare si scontra con il dovere di non enfatizzare oltre modo le informazioni indispensabili e non correre il rischio di superare il limite sottile che separa la trasparenza informativa dalla pressione impropria sulla determinazione del consumatore per il quale, a sua volta, al diritto ad essere informato, fa tuttavia inevitabilmente da contraltare il dovere di discernere correttamente le informazioni messe a sua disposizione. Il tema passa attraverso la qualificazione che il sistema normativo europeo relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori, attribuisce alla nozione giuridica di paese d'origine e luogo di provenienza dell'alimento, in relazione altresì alle norme di livello nazionale che, coerentemente con il sistema multilivello di competenza in materia alimentare delineano le regole per l'esercizio delle pratiche commerciali e i criteri di tutela del consumatore.

La lettura combinata degli artt. 9, par. 1, lett. i), 16, parr. 1 e 2, e 26, del Regolamento (UE) n. 1169/2011, stabilisce che i prodotti alimentari preimballati devono recare l'informazione relativa all'origine o alla provenienza geografica.

L'art. 9, par. 1 lett. i), sancisce in via generale l'obbligo di indicare l'origine o la provenienza nei casi stabiliti dall'art. 26 del Regolamento. Quest'ultimo a sua volta prevede, al secondo paragrafo,

che tale obbligo sussiste quando *l'omissione di tale indicazione possa indurre in errore il consumatore in merito al paese d'origine o al luogo di provenienza reali dell'alimento, in particolare se le informazioni che accompagnano l'alimento o contenute nell'etichetta nel loro insieme potrebbero altrimenti far pensare che l'alimento abbia un differente paese d'origine o luogo di provenienza*. Il successivo paragrafo terzo del medesimo articolo 26, a sua volta, introduce alcune precisazioni di rilevante portata, a mente delle quali: quando il paese d'origine o il luogo di provenienza di un alimento pur essendo indicato (in etichetta), non è lo stesso di quello del suo ingrediente primario: a) *o deve essere precisamente indicato anche il paese d'origine o il luogo di provenienza dell'ingrediente primario*; b) *o, quanto meno, più genericamente, e pur senza ulteriori precisazioni, deve essere data l'informazione che l'origine e la provenienza dell'ingrediente primario sono diverse da quelle dell'alimento finito* (considerato nella sua interezza). Dunque, la norma non prevede l'obbligo di indicare l'origine di tutti gli ingredienti che compongono l'alimento, ma solo l'origine dell'ingrediente primario e solo qualora l'ingrediente primario sia originario di un paese diverso da quello dell'alimento finito. Ciò che è, dunque, fondamentale determinare nel composito quadro normativo di riferimento, è la modalità di corretta individuazione dell'origine di un alimento da un determinato paese o da una determinata area (Bruno, 2022). I requisiti per l'attribuzione dell'origine geografica, infatti, non sono specificati dal Regolamento (UE) n. 1169/2011, il quale richiama, a tal fine, il Regolamento (CEE) n. 2913/92, istitutivo del "codice doganale comunitario" e le norme di applicazione contenute nel Regolamento (CEE) n. 2454/93, oggi abrogato e sostituito dal Regolamento (UE) n. 952/2013, che istituisce il "codice doganale dell'Unione" (Albisinni, 2012). Ciò che sorprende, scrutando nel rinvio operato, sino ad aver suscitato perplessità sull'adeguatezza della scelta rispetto al contesto del diritto alimentare europeo, è che sulla base dei criteri fissati nei regolamenti richiamati, l'attribuzione dell'origine non dipende necessariamente da un forte legame con un determinato territorio geografico.

Entrambe le formulazioni contenute nei due regolamenti prima citati, a ben vedere, ai fini dell'attribuzione dell'origine di un prodotto, richiamano i medesimi due criteri ossia, il criterio *dei prodotti interamente ottenuti in un paese* e il *criterio dell'ultima trasformazione sostanziale*. Attualmente, la nozione di "paese d'origine" è stabilita nell'art. 2, paragrafo 3, del Regolamento (UE) n. 1169/2011, attraverso il rinvio all'art. 60 del codice doganale dell'Unione ai sensi del quale "le merci interamente ottenute in un unico paese o territorio sono considerate originarie di tale paese o territorio" e altresì che "le merci alla cui produzione contribuiscono due o più paesi o territori sono considerate originarie del paese o territorio in cui hanno subito l'ultima trasformazione o lavorazione sostanziale ed economicamente giustificata, effettuata presso un'impresa attrezzata a tale scopo, che si sia conclusa con la fabbricazione di un prodotto nuovo o abbia rappresentato una fase importante del processo di fabbricazione". Le norme non offrono chiarimenti tassativi su cosa debba intendersi per ultima trasformazione sostanziale e, per i prodotti alimentari, l'unico relativo riferimento è rinvenibile nel Regolamento (CEE) n. 2454/93, comprendente, al suo allegato 11, un elenco delle lavorazioni e/o trasformazioni attributive dell'origine non preferenziale, solo per alcuni prodotti alimentari. Tuttavia, la Corte di Giustizia con due sentenze chiarisce che *l'ultima trasformazione* può considerarsi *sostanziale* solo qualora il prodotto trasformato abbia composizione e proprietà specifiche nuove (c.d. *criterio tecnico*). Nelle argomentazioni decisionali dell'Autorità, il presupposto dell'ingannevolezza del messaggio comunicativo relativo alle confezioni di pasta commercializzate con i claims *Italiano* e *Combino* è rinvenibile nella mancanza di proporzionalità tra i riferimenti altamente evocativi l'italianità dell'alimento finale, posizionati nella parte centrale della confezione e l'informazione "defilata" sulla provenienza del grano, dato che l'indicazione sulla provenienza del grano (UE e non UE), sembrava essere collocata marginalmente, in una posizione non immediatamente visibile al consumatore. La questione nodale della vicenda è dunque, inevitabilmente, una questione di "campo visivo", la cui nozione si rinviene nell'art. 2, comma 2, lett. k, del Regolamento (UE) n.

1169/2011: “tutte le superfici di un imballaggio che possono essere lette da un unico campo visuale”. Il riferimento al campo visuale, in quanto nozione di carattere marcatamente anatomica, imporrebbe altresì, la necessità di individuare correttamente anche la nozione di “unico campo visuale”. Da tempo, la normativa nazionale di settore, in specie il Decreto 26 luglio 2017, relativo all’indicazione in etichetta dell’origine del grano duro per pasta e semola, nel suo art. 4, comma 2, prevede espressamente che le indicazioni sul paese di coltivazione del grano e sul paese di molitura dello stesso “sono apposte in etichetta in un punto evidente e nello stesso campo visivo in modo da essere facilmente visibili, chiaramente leggibili ed indelebili. Esse non sono in alcun modo nascoste, oscurate, limitate o separate da altre indicazioni scritte o grafiche o da altri elementi suscettibili di interferire”. Se però, nel caso specifico, per valutare l’origine dell’alimento finito, piuttosto che porre l’attenzione sul rapporto di origine tra ingrediente primario e alimento finito, si parte dalla valutazione della natura dell’alimento finito pasta, che è quella di “prodotto trasformato” alla cui produzione hanno partecipato due o più paesi o territori, il percorso valutativo potrebbe anche assumere una differente direzione.

Considerando la regola desumibile dall’art. 60, paragrafo 2 del codice doganale, “le merci alla cui produzione contribuiscono due o più paesi o territori sono considerate originarie del paese o territorio in cui hanno subito l’ultima trasformazione o lavorazione sostanziale ed economicamente giustificata, effettuata presso un’impresa attrezzata a tale scopo, che si sia conclusa con la fabbricazione di un prodotto nuovo o abbia rappresentato una fase importante del processo di fabbricazione” si nota come la norma sostanzialmente individua quattro criteri oggettivi sulla scorta della quale, con riferimento all’ultima trasformazione sostanziale, le merci, i prodotti, gli alimenti e/o gli ingredienti non originari del paese ma impiegati nell’ultimo paese di produzione, per poter conferire al prodotto finale l’origine dell’ultimo paese di produzione, devono essere stati sostanzialmente lavorati o trasformati.

Considerando inoltre l’art. 61 del codice doganale ai fini della prova dell’origine della pasta, per ultima trasformazione sostanziale si intende quella nella quale tutti i cereali e i loro derivati utilizzati per ottenere il prodotto finito, siano stati interamente ottenuti; quindi, l’origine sarà quella nel paese nel quale tutti i cereali impiegati sono stati prodotti ad esclusione però, si noti bene, del frumento duro e dei suoi derivati, ivi inclusa tra essi, ovviamente la semola in quanto suo derivato. Sicché, evidentemente, l’origine del grano duro non è rilevante ed è indifferente ai fini della prova e dunque della determinazione dell’origine del prodotto trasformato e finito pasta. Ne discende che la pasta prodotta in Italia grazie all’ultima trasformazione (decisamente) sostanziale, effettuata presso imprese attrezzate a tale scopo con le fasi tecnologiche di molitura del grano, miscelazione degli ingredienti (semola ed acqua), formazione dell’impasto, compressione-estrazione, trafilazione-taglio e essiccazione, sia un prodotto “nuovo” di origine pienamente italiana, anche ai fini della prova doganale della sua origine e indipendentemente dall’origine del grano impiegato per la sua preparazione. Se la pasta e, in particolare, quella di semola di grano duro oggetto del procedimento dell’Autorità è un prodotto di origine “normativamente”, tecnologicamente e tradizionalmente italiano, enfatizzarne la sua italianità allora non dovrebbe, in alcun caso, costituire una pratica commerciale sleale, tanto più se, come nel caso in esame, l’informazione sull’origine sia UE che non UE del grano duro impiegato per la sua produzione, è stata comunque chiaramente fornita al consumatore e non con altri mezzi ma nella medesima confezione nella quale sono (lecitamente) riprodotti i richiami alla italianità del prodotto.

### **Discussioni e Conclusioni**

Nel caso specifico della pasta, alimento tradizionalmente identitario di italianità a fronte di una comunque esistente “responsabilità del consumatore”, se si fornisce una lettura applicativa estremamente rigida dell’obbligo di informazione sull’origine dell’ingrediente primario, sino a “pretenderla quasi prevalente” rispetto a quella sull’origine del prodotto, si corre probabilmente il

rischio di sbilanciare l'equilibrio, perseguito dal legislatore europeo, nella interazione tra le istanze di protezione degli interessi dei consumatori e l'esigenza di tutelare la concorrenzialità nel mercato interno, terreno di confronto di interessi differenti e valori confliggenti, che necessita della garanzia che la logica della solidarietà non si pieghi al servizio delle esclusive ragioni economiche e che ci sia il giusto temperamento tra garanzie e cooperazione, da un lato, e negoziazione impari e conflittualità, dall'altro (Perlingieri, 2006). Si corre il rischio di esacerbare il ruolo del professionista e costruire una sorta di categoria di "responsabilità rafforzata dell'operatore alimentare", che non è più solo, doverosamente obbligato ad informare il consumatore della diversa origine del grano duro rispetto a quella della pasta, ma dal quale si pretende diventi una specie di tutore legale di un consumatore, soggetto profano, sprovvisto, disinformato e quasi inanimato. In definitiva, alla luce delle considerazioni svolte, la lettura applicativa delle norme sull'origine, tanto più se praticata da un organismo nazionale come l'Autorità, valutate nel loro insieme ed in una visione funzionalmente regolata sulle dinamiche di un mercato globale caratterizzato da una marcata "ambiguità geografica", spesso impropriamente adoperata quale strumento di subdola concorrenza ai prodotti italiani, nel caso di prodotti radicalmente identitari di un Paese come la pasta di semola di grano, dovrebbe condurre alla individuazione di un giusto grado di doverosità informativa sull'origine dell'ingrediente primario. Per meglio dire, nel caso di alimenti come la pasta, realizzati con ingredienti provenienti da più paesi ma tanto "caratteristici" di un determinato Paese di produzione, il dovere di specificare la diversa origine dell'ingrediente primario, valorizzando il concetto di ultima trasformazione sostanziale, dovrebbe o almeno potrebbe essere ritenuto sufficientemente assolto con l'indicazione dell'origine in etichetta, piuttosto che essere imprescindibilmente pretesa nello stesso campo visivo nel quale è indicata l'origine dell'alimento. In caso contrario, il pericolo è quello concreto di condurre il settore pastario italiano nell'ombra dell'italian sounding, di danneggiare l'immagine emblematica, anche culturale dell'italianità della pasta e soprattutto, generare il dubbio che in ossequio al rigoroso rispetto delle norme, la pasta debba essere immaginata come un alimento *made in aliunde*.

### **Bibliografia**

- Bruno F. 2017. Il diritto alimentare nel contesto globale: USA e UE a confronto. Wolters Kluwer, Milano, pp. 131 ss.
- Bruno F. 2022. Il diritto alimentare-sviluppo sostenibile e tutela della salute. Cedam, Padova, pp. 37 ss.
- Germanò A. 2010. Sull'etichetta degli alimenti. I ed., Rivista di diritto agrario, p. 64.
- Albisinni F. 2012. La comunicazione al consumatore di alimenti, le disposizioni nazionali e l'origine dei prodotti. I ed., Rivista di diritto agrario, p. 73.
- Masini S. 2019. Sulle fonti dell'obbligo di informazione degli alimenti, III ed., Rivista di diritto alimentare.
- Perlingieri P. 2006. Il diritto civile nella legalità costituzionale, III ed., Napoli.



## **Approcci biotecnologici per migliorare le proprietà nutrizionali e di texture di grano saraceno**

S. Iametti\*, M. Gardella, M. Rollini, A. Barbiroli, M. Di Nunzio, A. Marti

DeFENS, Università degli Studi di Milano, Via G. Celoria 2, 20133 Milano (MI).

\*E-mail: [stefania.iametti@unimi.it](mailto:stefania.iametti@unimi.it)

### **Abstract**

Buckwheat is a pseudocereal rich in functional compounds, that very often display low bioavailability. Consumption of buckwheat may have a great effect on lipid and polysaccharide metabolism. Buckwheat is also a gluten-free ingredient and a sustainable crop. These aspects make buckwheat a good candidate for developing novel processes/products. In this investigation we explore the application of biotechnological treatments with the aim to improve both bioavailability of bioactive compounds and to increase the amount of soluble fiber. Fermentation and treatment with exogenous enzymes were tested, but short sprouting represented the process best suited to the aims of the study. Short sprouting results in a decrease of the anti-nutritional factors and of species able to sequester micronutrients. Sprouting improved the ratio of free-to-bound polyphenols, with an increase in antioxidant properties. The protein pattern is also modified by sprouting, improving properties required for network formation and – consequently - food structure. Sprouted grains were then used for production of cous-cous with good sensory properties.

### **Riassunto**

Il grano saraceno è uno pseudocereale ricco di componenti funzionali (spesso non facilmente biodisponibili), il cui consumo comporta effetti benefici nel metabolismo dei lipidi e dei carboidrati. Il grano saraceno rappresenta anche un ingrediente gluten-free e una coltura sostenibile, costituendo quindi un ottimo candidato per sviluppare nuovi processi/prodotti di interesse per consumatori sensibili a queste problematiche. In questo studio abbiamo applicato diversi trattamenti biotecnologici per migliorare sia la biodisponibilità di composti bioattivi ed incrementare la quantità di fibra solubile. Il trattamento di germinazione limitata è risultato il più adatto allo scopo rispetto alla fermentazione od all'uso di enzimi esogeni. La germinazione comporta un decremento del contenuto di fattori anti-nutrizionali e di composti chelanti i micronutrienti ed un incremento nel rapporto tra polifenoli liberi e associati a macromolecole con conseguente aumento della proprietà antiossidanti. Anche il pattern proteico risulta modificato, con caratteristiche che lo rendono potenzialmente più adatto alla formazione di network, fondamentali per la struttura di un alimento. Il materiale germinato è stato infine utilizzato per la produzione di cous cous che è risultato mantenere le proprietà derivanti dalla germinazione ed una buona accettabilità sensoriale.

### **Introduzione**

Il grano saraceno (*Fagopyrum esculentum*) è uno pseudocereale che rappresenta una coltura sostenibile in quanto richiede per la sua crescita una quantità molto limitata sia di acqua che di nutrienti dal suolo rispetto a molte altre colture ed appare pertanto un ottimo candidato per sviluppare nuovi processi/prodotti e offrire nuove possibilità al mercato ed ai consumatori (Chettry *et al.*, 2021). Questo pseudocereale completa il suo ciclo vitale in tre/quattro settimane ed ha una buona adattabilità al clima con preferenza verso una stagione estiva fresca. Per queste caratteristiche - nell'area mediterranea - è coltivato in zone montane dove frumento e/o mais non riescono a crescere. In Italia, la coltivazione del grano saraceno è caratteristica di aree marginali quali quelle montane. Dal punto di vista nutrizionale il grano saraceno, oltre ad avere proteine con un buon contenuto di amminoacidi essenziali, è ricco in vitamine, minerali e componenti bioattivi

(fibra, polifenoli, carboidrati a lenta digeribilità) con alcune proprietà funzionali benefiche per la salute umana (Mota *et al.*, 2016; Dziedzic *et al.*, 2018; Capraro *et al.*, 2021). Inoltre, il grano saraceno rappresenta un valido ingrediente per la produzione di alimenti gluten-free in quanto nelle sue proteine non sono contenute le sequenze tossiche coinvolte nella malattia celiaca e/o nelle patologie legate alla sensibilità al glutine (Mariotti *et al.*, 2008; Zanoletti *et al.*, 2017).

Questo lavoro intende definire trattamenti biotecnologici sostenibili in grado di migliorare le proprietà nutrizionali di grano saraceno. Gli obiettivi principali dei trattamenti sono: migliorare la biodisponibilità dei micronutrienti; accrescere il contenuto in composti bioattivi e la loro varietà; ottenere un incremento della quantità di fibra. Sono stati identificate e verificate tre tipologie di trattamento: 1) enzimi esogeni di tipo idrolitico; 2) processi di tipo fermentativo; 3) processi di germinazione limitata.

## **Materiali e Metodi**

La granella di grano saraceno impiegata per questo studio è stata fornita dal Molino Filippini SRL (Teglio, Italia). La stessa granella viene utilizzata dal Molino Filippini per la propria produzione industriale. I trattamenti enzimatici e fermentativi sono stati condotti su sfarinati ottenuti con macinino da laboratorio provvisto di sistema di raffreddamento (IKA Universalmühle M20). Per i trattamenti enzimatici, lo sfarinato (10 g) è stato risospeso in 10 ml di acqua, addizionato di 0.01 ml di cellulasi PCL5 (Genencor, USA) e lasciato in agitazione per 10 h a 25 °C. Per le prove di fermentazione, 100 g di sfarinato sono stati risospesi nella stessa quantità di acqua, inoculati con *Lactobacillus brevis* o *Lactobacillus plantarum* (circa 8 log CFU/g) e la sospensione è stata lasciata in agitazione per 48 h a 25 °C. Al termine delle prove enzimatiche o di fermentazione il campione è stato liofilizzato prima di essere utilizzato per le diverse determinazioni.

La germinazione è stata condotta impiegando un germinatoio da laboratorio (Constant Climate Chambre HPPECo110). Alla granella è stata aggiunta acqua in rapporto 1/3 (w/w) e - dopo 16 h di imbibizione a 25°C - la granella è stata germinata per 72 h a 25°C. La granella germinata è stata quindi essiccata a 55°C e macinata. Il contenuto totale di polifenoli e la capacità antiossidante dei vari materiali e dei prodotti finiti descritti in quanto segue sono stati determinati come descritto in Di Nunzio *et al.* (2013). Il profilo proteico e la proprietà di idrofobicità superficiale sono stati caratterizzati come descritto in Mariotti *et al.* (2008). Il contenuto di fattori antinutrizionali, di microelementi – così come le attività enzimatiche endogene - sono stati determinati come descritto in Marengo *et al.* (2017). Le “pasting properties” sono state determinate con il ViscoQuick di Brabender.

## **Risultati e discussione**

La caratterizzazione delle proprietà molecolari, fisiche e reologiche dei materiali ottenuti ha indicato come il trattamento con enzimi esogeni e la fermentazione non comportino modificazioni significative rispetto al campione non trattato (risultati non mostrati). Perciò, verranno presentati e descritti solo i risultati relativi alla granella germinata. Il trattamento di germinazione del grano saraceno è stato condotto per diversi tempi, osservando che 72 h rappresentano il valore ottimale per ottenere le modificazioni desiderate in termini di rimozione di composti antinutrizionali e di incremento nelle componenti con valore salutistico.

Nei campioni germinati si osserva infatti un decremento del contenuto di fattori anti-nutrizionali quali inibitori enzimatici e di composti chelanti i micronutrienti (fitati in particolare, vedi Tab. 1), e un incremento della quantità di metalli biodisponibili. Nello specifico si osserva un incremento della quantità di ferro e calcio libero pari a circa il 20 e 40% rispettivamente. Un incremento si osserva anche nel rapporto tra polifenoli liberi e associati a macromolecole con conseguente aumento della proprietà antiossidanti (Tab. 1).

**Tabella 1.** Variazione di alcune proprietà nutrizionali in grano saraceno germinato.

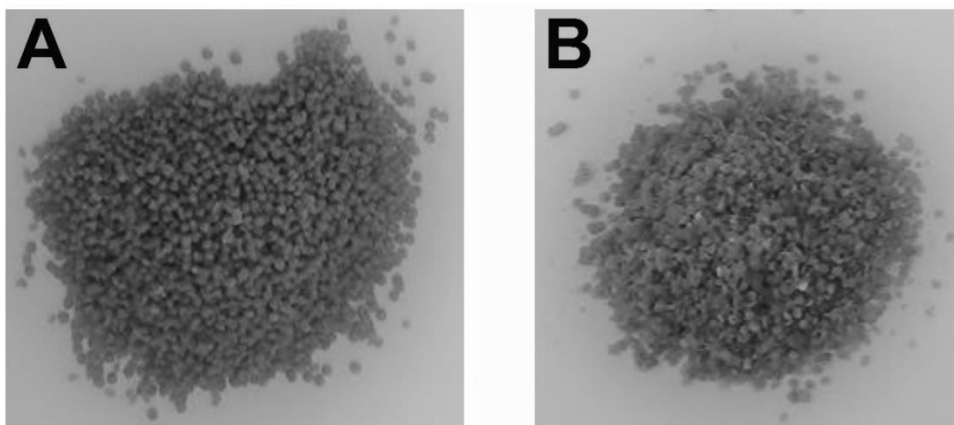
Campioni	Polifenoli solubili (mg FAE * g <sup>-1</sup> )	Capacità antiossidante ( $\mu$ mol TE * g <sup>-1</sup> )	Fitati (g*100g <sup>-1</sup> )
non trattato	12 $\pm$ 0.31	28 $\pm$ 4.1	1.33 $\pm$ 0.03
germinato 72 h	23 $\pm$ 0.42	50 $\pm$ 3.2	1.14 $\pm$ 0.03

Anche il pattern proteico nei campioni germinati risulta modificato. In particolare, si osserva un incremento dell'attività proteolitica endogena (circa cinque volte maggiore rispetto al campione non germinato) che si traduce in un aumento della quantità di peptidi di circa il doppio rispetto a quella contenuta nel campione non trattato (dati non mostrati). Oltre alla formazione di peptidi, le proteine mostrano una struttura meno compatta, come evidenziato dalle proprietà di idrofobicità superficiale (Tab. 2). Quest'ultima caratteristica le rende potenzialmente più adatte alla formazione di network stabilizzati da legami non covalenti, fondamentali per la texture di alcuni specifici alimenti.

**Tabella 2.** Variazione delle proprietà di idrofobicità superficiale in grano saraceno germinato

Campioni	Kd ( $\mu$ M)	Fluorescenza massima a 460 nm	PSH (mM) <sup>-1</sup>
non trattato	526 $\pm$ 18	185 $\pm$ 7.5	0.35
germinato 72 h	909 $\pm$ 25	71 $\pm$ 3.4	0.08

Il trattamento di germinazione comporta anche delle modificazioni dell'organizzazione complessiva delle macromolecole, ed in particolare della componente amido. Le modificazioni a carico dell'amido si traducono in una modifica delle "pasting properties" come evidenziato dai tracciati viscoamilografici (non mostrati).



**Figura 1.** Cous-cous da grano saraceno non germinato (A) e con aggiunta del 50% di grano saraceno germinato (B) per 72 h a 25°C.

Il materiale ottenuto è stato utilizzato per la produzione di cous-cous da grano saraceno non trattato, ricorrendo ad integrazioni significative (25 e al 50%) con grano saraceno germinato. Il prodotto ottenuto (Fig. 1) ha evidenziato buone proprietà sensoriali. Una ulteriore caratterizzazione del prodotto ha verificato che le proprietà nutrizionali caratterizzanti il materiale germinato non vengano compromesse dal processo tecnologico applicato. Sono in corso indagini

per valutare l'impiego di grano saraceno trattato in alimenti complessi quali pane e/o prodotti a base cereali.

### **Ringraziamenti**

Il presente studio si inquadra nell'ambito del progetto MIND FoodS HUB (Milano Innovation District FoodSystem Hub): "Innovative concept for the eco-intensification of agricultural production and for the promotion of dietary patterns for human health and longevity through the creation in MIND of a digital Food System Hub" cofinanziato da POR FESR 2014-2020\_BANDO Call HUB Ricerca e Innovazione, Regione Lombardia. Si ringrazia il Molino Filippini S.r.l., via Piazzola, 2, 23036 Teglio (SO), per la produzione di cous cous.

### **Bibliografia**

- Capraro J., Benedetti S., Heinzl G.C., Scarafoni A., Magni C. 2021. Bioactivities of pseudocereal fractionated seed proteins and derived peptides relevant for maintaining human well-being. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7): 3543. <https://doi.org/10.3390/ijms22073543>
- Chetry U., Chrungoo N.K. 2021. Beyond the cereal box: breeding buckwheat as a strategic crop for human nutrition. *Plant Foods for Human Nutrition*, 76(4): 399-409.
- Di Nunzio M., Toselli M., Verardo V., Caboni M.F., Bordonni A. 2013. Counteraction of oxidative damage by pomegranate juice: influence of the cultivar. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93: 3565-3573.
- Dziedzic K., Górecka D., Szewiel A., Sulewska H., Kreft I., Gujska E., Walkowiak J. 2018. The content of dietary fibre and polyphenols in morphological parts of buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(1): 82-88.
- Marengo M., Carpen A., Bonomi F., Casiraghi M.C., Meroni E., Quaglia L., Iametti S., Pagani M.A., Marti A. 2017. Macromolecular and Micronutrient Profiles of Sprouted Chickpeas to Be Used for Integrating Cereal-Based Food. *Cereal Chemistry*, 94(1): 82-88.
- Mariotti M., Lucisano M., Pagani M.A., Iametti S. 2008. Macromolecular interactions and rheological properties of buckwheat-based dough obtained from differently processed grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(11): 4258-4267.
- Mota C., Santos M., Mauro R., Samman N., Matos A.S., Torres D., Castanheira I. 2016. Protein content and amino acids profile of pseudocereals. *Food Chemistry*, 193: 55-61.
- Zanoletti M., Marti A., Marengo M., Iametti S., Pagani M.A., Renzetti S. 2017. Understanding the influence of buckwheat bran on wheat dough baking performance: Mechanistic insights from molecular and material science approaches. *Food Research International*, 102: 728-737.

## **Nuovi approcci metodologici allo studio delle interazioni tra proteine in matrici complesse: applicazioni al network proteico di cereali**

*D. Emide\*, A. Barbiroli, F. Bonomi, S. Iametti*

DeFENS, Università degli Studi di Milano, Via G. Celoria 2, 20133 Milano (MI).

\*E-mail: [davide.emide@unimi.it](mailto:davide.emide@unimi.it)

### **Abstract**

The properties of gluten are affected by the nature and number of interactions that occur between gliadins and glutenins proteins. However, the peculiar chemistry behind the interaction within these protein families makes it difficult to clearly and completely identify the molecular events at the basis of gluten network formation. Improving the understanding of the protein-protein interactions and of the geometrical characteristics of the resulting network could allow a better knowledge of the reticulation process, as well as of the impact of the technological treatments and – in more general terms - of the structure-function relationship in complex matrices. The present work reports on the development of new approaches - based on protein chemistry - to study the molecular determinants of the gluten network development and of the protein-protein interactions in food matrices, with a focus on the role of cysteine thiols in disulfide exchange reactions.

### **Riassunto**

Le proprietà del glutine sono influenzate dalla natura e dal numero di interazioni che avvengono tra le proteine coinvolte. Le caratteristiche intrinseche di gliadine e glutenine rendono tuttavia difficile una chiara e completa identificazione degli aspetti molecolari che sono alla base della formazione del network glutinico. La descrizione delle interazioni proteina-proteina e delle caratteristiche geometriche del reticolo risultante potrebbe consentire di ottenere una migliore comprensione dell'evoluzione del processo di reticolazione, del ruolo dei trattamenti tecnologici, e del rapporto struttura funzione per questa matrice complessa.

Lo scopo del presente lavoro è di sviluppare approcci basati sulla chimica delle proteine per ottenere informazioni in merito ai determinanti molecolari che sono alla base delle interazioni tra le proteine di una matrice alimentare, con particolare riferimento al ruolo dei gruppi tiolici cisteinici nella formazione di legami covalenti e nelle reazioni di “*disulfide exchange*”.

### **Introduzione**

Il glutine origina dall'interazione tra le proteine di riserva del frumento, in particolare gliadine (monomeriche) e glutenine (polimeriche). Fisiologicamente queste proteine, che si trovano depositate nell'endosperma amidaceo del seme (Shewry *et al.*, 2002), rappresentano la principale riserva di azoto per l'embrione in germinazione (Bietz & Simpson, 1992). Le proteine del glutine rappresentano l'80% delle proteine del frumento ed hanno un ruolo fondamentale nel definire le qualità e l'attitudine alla trasformabilità dei prodotti (D'Ovidio & Masci, 2004). Durante la lavorazione (nella produzione di pasta o nella panificazione), le proteine del glutine subiscono - dopo una prima solvatazione - riarrangiamenti strutturali dovuti all'azione meccanica legata alla fase d'impastamento. Le modificazioni geometriche che si verificano in questo step sono alla base della formazione delle interazioni inter- e intra-molecolari che portano allo sviluppo e stabilizzazione del network glutinico. Nel network risultante, le proteine interagiscono tra loro tramite interazioni non covalenti (per lo più idrofobiche) e legami disolfuro intermolecolari covalenti, che originano da reazioni di “*disulfide exchange*” tra cisteine libere e legami disolfuro preesistenti (Bonomi *et al.*, 2013; Bonomi, Ferranti e Mamone, 2014). La relativa rilevanza delle interazioni covalenti e non covalenti negli impasti è funzione sia delle caratteristiche del materiale di partenza (Jazaeri *et al.*, 2015; Quayson *et al.*, 2018) che delle condizioni utilizzate per la

preparazione di impasti, inclusa l'aggiunta di altre componenti alle formulazioni (Huschka *et al.*, 2012)

Dato il ruolo centrale delle reazioni di “*disulfide exchange*”, valutare l'evoluzione e le modificazioni strutturali che avvengono in seguito ai processi di trasformazione aggiungerebbe un tassello alla comprensione del processo di formazione del glutine, oltre a chiarirne l'impatto sulle proprietà macroscopiche dei prodotti finiti. A parte le differenze compositive in termini di specie e varietà, le caratteristiche strutturali delle proteine (in termini di quantità, posizione, distribuzione e accessibilità dei legami disolfuro "nativi" e dei gruppi tiolici liberi) controllano il riarrangiamento molecolare ottenuto durante la lavorazione. Mentre le caratteristiche delle singole proteine nel frumento sono ben note (Bartels *et al.*, 1986; Shewry *et al.*, 2002), le caratteristiche molecolari e le proprietà geometriche del network glutinico sono ancora poco studiate, principalmente perché le proteine coinvolte sono insolubili in acqua e intrinsecamente disordinate. Ciò rende difficile l'applicazione delle tecniche tradizionalmente utilizzate per studiare le caratteristiche strutturali delle proteine e la loro modificazione nei processi biotecnologici (Bonomi *et al.*, 2013). Un ulteriore livello di complessità in questi sistemi è legato alla presenza di altri componenti (lipidi, altre proteine, zuccheri semplici e complessi, ecc.), che influenzano a diversi livelli gli eventi molecolari che portano alla formazione del glutine in conseguenza di diverse tipologie di processo.

## **Materiali e metodi**

### ***Marcatura fluorescente***

Il protocollo di marcatura fluorescente è stato sviluppato partendo da quanto descritto in Iametti *et al.* (2013). Le albumine e le globuline nel campione (50 mg di farina da *T. aestivum* o semola da *T. durum*, da masterbatch industriali) vengono rimosse per estrazione (1h, 25°C) in tampone salino (50 mM fosfato, 0.1 M NaCl, pH 7.0), agitando la sospensione per 1 h e successivamente centrifugando a 10,000 ×g per 10 min a 25°C. Le frazioni insolubili (gliadine e glutenine) nella fase precipitata vengono risospese in 1 mL di tampone salino (condizioni native), in presenza di 4 M urea o 2% SDS (condizioni denaturanti) quando indicato. Le varie frazioni proteiche sono poi trattate per 2 h al buio con 5-(iodoacetamide) fluoresceina (5-IAF, 5 mM in dimetilformammide) per consentire la reazione del marcatore 5-IAF con tioli liberi e accessibili. L'eccesso di marcatore viene infine bloccato con ditiotreitolo 0.25 mM (DTT, 1 h, 25°C), prima dell'analisi SDS-PAGE.

### ***Separazione elettroforetica delle proteine (SDS-PAGE)***

I campioni per SDS-PAGE sono stati preparati in tampone denaturante (Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8, glicerolo 50% (p/v), SDS 1.7% (p/v), 0.01 % Blu di bromofenolo (p/v)) contenente l'1% (v/v) di 2-mercaptoetanololo (2-ME) quando indicato, e corsi a pH 8.3 (0.025 M Tris-HCl, 0.192 M glicina, 0.1% (p/v) SDS), in un apparato Miniprotein II (Bio-Rad). Le immagini fluorescenti degli spot proteici corrispondenti alle proteine marcate con 5-IAF e la mappa proteica totale (colorazione con Coomassie Blue) sono state acquisite tramite un sistema di analisi delle immagini (VersaDoc™, Bio-Rad) e analizzati con il software ImageLab (Bio-Rad, rev.6.0.1).

## **Risultati e discussione**

### ***Caratterizzazione tiologica dei sistemi***

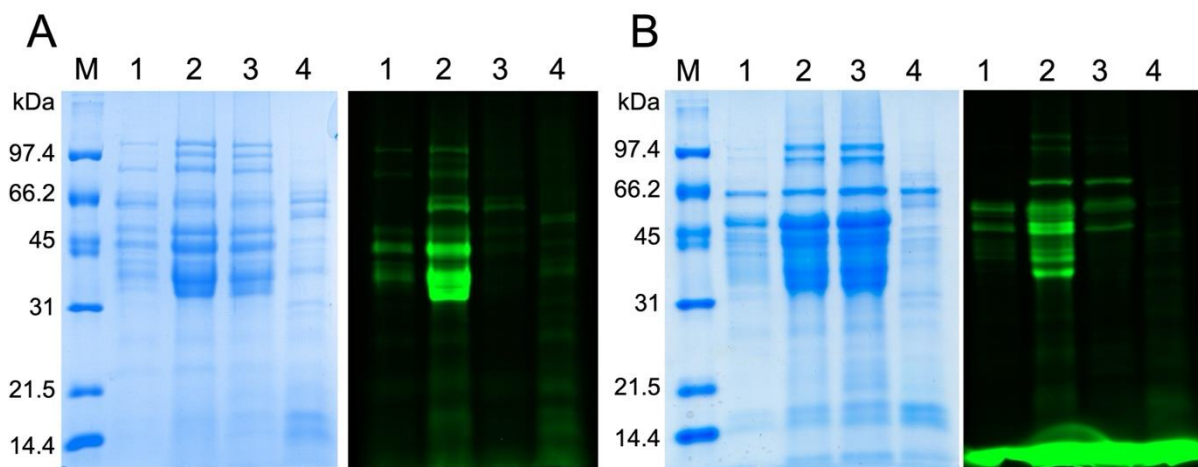
Le caratterizzazioni che vengono comunemente realizzate su cereali e prodotti derivati, basate principalmente sulla quantificazione delle proteine e su caratterizzazioni reologiche, forniscono un numero limitato d'informazioni in merito alle caratteristiche molecolari del glutine ed al suo sviluppo. Da qui la necessità di metodi idonei a indagare la struttura delle proteine nei sistemi complessi e la sua modificazione nei processi, per meglio comprendere la relazione struttura-funzione nei sistemi alimentari anche in sistemi dove approcci di tipo spettroscopico sono di

difficile applicazione e dove procedure di tipo separativo comportano una alterazione irreversibile delle singole strutture e perturbano gran parte delle interazioni che conferiscono al sistema le sue proprietà.

La marcatura dei residui tiolici in proteine con sonde fluorescenti come la 5-IAF (Gorman, 1987; Toseland, 2013) è stata sviluppata nel settore dei cereali da Iametti *et al.* (2013) - cui si deve anche la denominazione di “tiolomica” - facendone uno strumento utile ad indagare le caratteristiche strutturali delle proteine del frumento (*T. aestivum* e *T. durum*), sia nelle materie prime (farine e semole) sia in funzione del processo di trasformazione, consentendo di differenziare anche matrici apparentemente simili, come diverse linee di frumento tenero.

La combinazione dei risultati tiolomici e delle comuni caratterizzazioni biochimiche (solubilità differenziale e quantificazione dei residui tiolici mediante titolazione con DTNB), può quindi fornire informazioni dettagliate sull'intero sistema, nonché sull'evoluzione strutturale di questo. L'obiettivo principale dell'approccio tiolomico è di valutare la gerarchia di accessibilità e la distribuzione dei residui tioli nella struttura proteica. Per questi motivi la marcatura delle proteine del glutine con 5-IAF è stata eseguita usando come agente destrutturante sia 4M urea (un caotropo non polare) che 2% (p/v) SDS (un tensioattivo anionico).

L'accessibilità ai tioli (evidenziata dalla presenza di proteine marcate con la sonda fluorescente) risulta aumentata dalla presenza di urea e SDS, entrambi in grado di indebolire le interazioni idrofobiche. Urea e SDS mostrano la stessa capacità di solubilizzare le proteine del glutine, ma proprietà diverse nel consentire l'accessibilità dei tioli (Fig.1). Infatti, dal confronto in SDS-PAGE dei pattern relativi alle proteine con tioli esposti (evidenziati dal legame di 5-IAF) e alle proteine totali (evidenziate dalla colorazione con Coomassie Blue), si possono osservare differenze nell'accessibilità dei residui tiolici, la quale risulta maggiore quando la marcatura viene realizzata in presenza di 4 M urea.



**Figura 1** Marcatura fluorescente delle proteine di farina (*T. aestivum*, pannello A) e semola (*T. durum*, pannello B) con 5-IAF. In ciascun pannello, la mappa proteica totale (colorazione con Coomassie Brilliant Blu) è presentata sulla sinistra, mentre a destra sono riportate le immagini ottenute in fluorescenza. M) Marker pesi molecolari; 1) “frazione glutinica” marcata in condizioni non-destrutturanti (tampone salino); 2) “frazione glutinica” marcata in 4M urea; 3) “frazione glutinica” marcata in presenza di 2% SDS; 4) frazione albumine/globuline, marcate in condizioni non-destrutturanti.

In particolare, la quantità di proteine solubilizzate in presenza di agenti dissocianti è minore per *T. aestivum* (panello A) rispetto a *T. durum* (panello B), mentre la quantità di albumine e globuline risulta essere simile per entrambe le specie (lane 4), in accordo con quanto descritto da Žilić *et al.* (2011). Sebbene le frazioni albuminiche e globuliniche rappresentino principalmente proteine con funzioni metaboliche o strutturali, è generalmente accettato con che queste frazioni

siano coinvolte assieme alle proteine del glutine nello sviluppo e stabilizzazione del network glutinico (Veraverbeke & Delcour, 2002; Quayson *et al.*, 2018).

Dall'analisi delle lane relative alle proteine del glutine (tracciati 1-3) è possibile osservare come sia stato possibile solubilizzare le frazioni polimeriche (glutenine ad alto peso molecolare, HMW-GS, nella regione attorno a 97.4 kDa) usando sia 4M urea che 2% SDS. Le frazioni gliadiniche (visibili nella regione compresa tra 45-30 kDa) non consentono una chiara identificazione delle proteine solubilizzate, a causa della evidente sovrapposizione di una pluralità di bande individuali. Come atteso, condizioni non-destrutturanti non consentono di solubilizzare (o marcare con IAF) nessuna delle proteine rilevanti per la formazione di glutine.

Grazie all'approccio tiolomico è possibile studiare la diversa organizzazione strutturale delle proteine delle matrici alimentari, in questo caso particolare di *T. aestivum* e *T. durum*, riuscendo così ad evidenziare differenze e similitudini nell'organizzazione strutturale delle proteine. Questa informazione complementa ed integra a livello molecolare le informazioni – spesso di carattere puramente quantitativo o fatte “a posteriori” sulla base del comportamento reologico o di altre caratteristiche applicative - sulle caratteristiche delle proteine e delle loro interazioni reciproche in questi sistemi (Bonomi *et al.*, 2013).

### **Applicazioni e prospettive future**

L'approccio tiolomico descritto rappresenta uno strumento utile a chiarire gli eventi molecolari alla base dello sviluppo del network glutinico, consentendo di evidenziare differenze e similitudini tra matrici nel caso di prodotti quali farine e semole. Questi approcci sembrano rappresentare uno strumento molto versatile per poter chiarire, in combinazione con altri approcci basati su misure spettroscopiche dirette o indirette, anche il possibile effetto matrice esercitato da altri componenti della matrice, quali ad esempio un diverso rapporto amilosio/amilopectina (come frumenti waxy o ad alto contenuto di amilosio). Lo stesso approccio appare di potenziale grande interesse anche per altri studi in questa area, come ad esempio l'analisi delle cinetiche di deposizione delle proteine glutiniche in funzione di variabili agronomiche o genetiche od il ruolo di proteine minoritarie nei processi di trasformazione.

Un'altra applicazione della “tiolomica” è rappresentata dallo studio dell'impatto dei processi di trasformazione a carico delle interazioni intra- e intermolecolari, per esempio in seguito a impastamento e cottura. In questo ambito, l'approccio tiolomico consente di evidenziare l'evoluzione strutturale delle singole proteine coinvolte nella formazione e stabilizzazione del network in seguito al processo di trasformazione (come durante la panificazione).

Infine, la peculiare reattività dei tioli proteici può anche essere sfruttata basandosi sulla capacità di nanoparticelle d'oro di formare legami covalenti con questi gruppi. Nel complesso contesto della matrice glutine, si sono avviati studi sull'utilizzo di nanoparticelle di diverse dimensioni (comprese tra i 2 e i 200 nm) per valutare l'accessibilità dei gruppi tiolici in funzione delle caratteristiche geometriche del reticolo glutinico (Marengo *et al.*, 2019) in materie prime e semilavorati. Come presentato in questo studio, effettuando la marcatura con nanoparticelle doro anche in presenza di agenti dissocianti diversi per modalità di azione e grazie all'eventuale utilizzo di riducenti non tiolici, sarà possibile anche ottenere informazioni sul ruolo delle interazioni idrofobiche nella stabilizzazione del reticolo glutinico non interessate alla formazione di legami covalenti.

### **Bibliografia**

Bartels D., Altosaar I., Harberd N.P., Barker R.F., Thompson R.D. 1986. Molecular analysis of  $\gamma$ -gliadin gene families at the complex Gli-1 locus of bread wheat (*T. aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 72(6): 845-853.



- Bietz J.A., Simpson D.G. 1992. Electrophoresis and chromatography of wheat proteins: available methods, and procedures for statistical evaluation of the data. *Journal of Chromatography A*, 624(1-2): 53-80.
- Bonomi, F., Iametti, S., Mamone, G., Ferranti, P. 2013. The Performing Protein: Beyond Wheat Proteomics?. *Cereal Chemistry*, 90(4): 358-366.
- Bonomi F., Ferranti P., Mamone G. 2014. Wheat flour: chemistry and biochemistry. In: *Bakery Products: Science and Technology*. Hui Yiu Hin et al., eds. John Wiley & Sons, 2008, pp. 55-74.
- D'Ovidio R., Masci S. 2004. The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. *Journal of Cereal Science*, 39(3): 321-339.
- Gorman J.J. 1987. Fluorescent labeling of cysteinyl residues to facilitate electrophoretic isolation of proteins suitable for amino-terminal sequence analysis. *Analytical Biochemistry*, 160(2): 376-387.
- Huschka B., Bonomi F., Marengo M., Miriani M., Seetharaman K. 2012. Comparison of lipid effects on structural features of hard and soft wheat flour proteins assessed by front-face fluorescence. *Food Chemistry*, 113(3): 1011-1016.
- Iametti S., Marengo M., Miriani M., Pagani M.A., Marti A., Bonomi F. 2013. Integrating the information from proteomic approaches: A “thiolomics” approach to assess the role of thiols in protein-based networks. *Food Research International*, 54(1): 980-987.
- Jazaeri S., Bock J.E.; Bagagli M.P., Iametti S., Bonomi F., Seetharaman K. 2015. Structural modifications of gluten proteins in strong and weak wheat dough during mixing. *Cereal Chemistry*, 92(1): 05-113.
- Marengo M., Mamone G., Ferranti P., Polito L., Iametti S., Bonomi F. 2019. Topological features of the intermolecular contacts in gluten-forming proteins: Exploring a novel methodological approach based on gold nanoparticles. *Food Research International*, 119: 492-498.
- Quayson E.T., Marti A., Morris C.F., Marengo M., Bonomi F., Seetharaman K., Iametti S. 2018. Structural consequences of the interaction of puroindolines with gluten proteins. *Food Chemistry*, 253: 255-261.
- Shewry P.R., Halford N.G., Belton P.S., Tatham A.S. 2002. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 357(1418): 133-142.
- Toseland C.P. 2013. Fluorescent labeling and modification of proteins. *Journal of Chemical Biology*, 6(3): 85-95.
- Veraverbeke W.S., Delcour J.A. 2002. Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1, 42(3): 179-208.
- Žilić S., Barać M., Pešić M., Dodig D., Ignjatović-Micić D. 2011. Characterization of proteins from grain of different bread and durum wheat genotypes. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(9): 5878-5894.

## Studio dei fenomeni coinvolti nella lievitazione degli impasti per pizza

C. Covino<sup>1\*</sup>, A. Sorrentino<sup>2\*</sup>, P. Di Pierro<sup>1,2</sup>, P. Masi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Agraria, Università di Napoli Federico II, Via Università 100, 80055 Portici (NA).

<sup>2</sup>Centro di Ateneo per l'Innovazione e lo Sviluppo dell'Industria Alimentare, Università di Napoli Federico II, Via Università 133, 80055 Portici (NA).

\*E-mail: [clelia.covino@unina.it](mailto:clelia.covino@unina.it); [angela.sorrentino@unina.it](mailto:angela.sorrentino@unina.it)

### Abstract

The target of the study is to understand how the pizza dough structure evolves during proofing and which biochemical phenomena can be correlated to the rheological proprieties. Doughs were prepared with flour, salt, yeast and the 60.5% of water, and then proofed at selected times (0, 4, 8, 16, 24 h) at 22°C and 80% RH. Leavening kinetics was monitored during 24 h by digital image acquisition, from which proofed loaves volume was obtained. Moreover, the levels of digestible and resistant starch were also determined in order to assess a correlation with the digestibility and glycemic index of the cooked pizza. Results demonstrated that the dough leavened for 24 h showed a reduction in the elastic modulus ( $G'$ ), compared to all the other doughs, in the cooling interval, indicating that the gluten network formed after cooking has fewer interactions. These findings are confirmed by the obtained biochemical results. Therefore, it can be hypothesized that a long leavening of the pizza dough may improve the extensibility of the pizza disc by facilitating the action of the pizza maker during the forming phase and moreover, it could improve the digestibility, as digestion enzymes have an easier time acting on proteins and starch due to the breakdown of structure in the dough with long leavening.

### Riassunto

L'obiettivo di questo studio è rivolto alla comprensione dell'evoluzione della struttura dell'impasto per pizza durante la lievitazione, e dei fenomeni biochimici che possono essere correlati alle proprietà reologiche. Gli impasti sono stati preparati con farina, sale, lievito e il 60.5% di acqua, e poi sottoposti a lievitazione ai tempi selezionati (0, 4, 8, 16, 24 h) a 22°C e 80% UR. La cinetica di lievitazione è stata monitorata durante 24 h tramite acquisizione di immagini digitali, da cui si è ottenuto il volume dei panetti lievitati. Sono stati determinati i livelli di amido digeribile e resistente in modo da poter valutare una correlazione con la digeribilità e l'indice glicemico della pizza cotta. I risultati hanno evidenziato che l'impasto lievitato per 24 h ha mostrato una riduzione del modulo elastico ( $G'$ ) rispetto a tutti gli altri impasti, indicando che la maglia glutinica formata dopo la cottura ha un minor grado di interazioni. Queste valutazioni sono supportate anche dai risultati biochimici. Pertanto, si può ipotizzare che una lunga lievitazione dell'impasto per pizza possa migliorare l'estensibilità del disco della pizza facilitando l'azione del pizzaiolo durante la fase di formatura. Inoltre, potrebbe migliorare la digeribilità, in quanto gli enzimi digestivi agiscono più facilmente sulle proteine e sull'amido a causa della destrutturazione dell'impasto con una lunga lievitazione.

### Introduzione

Pur essendo un prodotto di larghissimo consumo, la pizza, è stata raramente oggetto di studi scientifici. La pizza napoletana, con la denominazione di specialità tradizionale garantita "STG", è considerata un'arte e, il 7 dicembre 2017, ha ricevuto il riconoscimento dell'UNESCO (Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Educazione, la Scienza e la Cultura) come "patrimonio culturale immateriale" ed è stata aggiunta alla Lista Rappresentativa del Patrimonio Culturale Immateriale dell'Umanità; tale evento ha reso la pizza di importanza globale.

L'impasto, formato da farina, acqua, sale e lievito, è una miscela complessa e viscoelastica in cui la sua composizione gioca un ruolo importante per quanto riguarda la lavorabilità dell'impasto, la capacità di trattenere i gas nel corso della fermentazione e le prestazioni di cottura (Janssen *et al.*, 1996). La fase di lievitazione degli impasti è un insieme di processi enzimatici che scindono progressivamente le strutture più complesse, proteine e amidi, in elementi più semplici, ovvero aminoacidi e zuccheri fermentabili per i lieviti (*S. cerevisiae*). Durante il corso della lievitazione, il metabolismo del lievito passa dalla respirazione alla fermentazione, convertendo gli zuccheri fermentabili in etanolo, anidride carbonica e altri metaboliti. L'aumento di CO<sub>2</sub> da parte dei lieviti, si riflette in un aumento del volume dell'impasto nel tempo di lievitazione, in quanto gli alveoli che si sono formati durante la fase di miscelazione degli ingredienti si espandono. Ciò comporta a un cambiamento della struttura dell'impasto, in particolare, ad alti tempi di lievitazione, causa l'allungamento della rete della maglia glutinica, nella quale le molecole di amido sono intrappolate. La digeribilità dell'amido e il suo grado di idrolizzabilità dipendono dal tempo di lievitazione e quindi dal cambiamento della struttura degli impasti. La frazione RDS rappresenta l'amido che viene digerito rapidamente in 20 min nel tratto gastrointestinale, con conseguente rapido aumento del glucosio plasmatico postprandiale (Ronda *et al.*, 2012), e quindi può essere associato all'aumento dell'indice glicemico (IG). L'analisi reologica è comunemente utilizzata per valutare le proprietà dell'impasto e per acquisire conoscenze sulle funzioni degli ingredienti e della struttura dell'impasto (Song e Zheng, 2007). A tale scopo, si utilizza il reometro dinamico oscillatorio che descrive la struttura molecolare dell'amido e del glutine durante la cottura e il raffreddamento. Pertanto, lo scopo del nostro studio è stato quello di indagare il cambiamento della struttura degli impasti per pizza durante la lievitazione e la cottura attraverso analisi fisico-chimiche e di correlare la struttura degli impasti a tempi di lievitazione selezionati (0, 4, 8, 16, 24 h) con la digeribilità delle pizze cotte nel forno a legna.

## **Materiali e metodi**

### ***Preparazione degli impasti per pizza***

L'impasto per pizza è stato preparato miscelando farina (1600 g, Caputo rossa), acqua al 60.5% (rispetto alla farina), sale (50 g) e lievito fresco (1 g, Lievital). Dopo l'impasto, l'intera massa è stata lasciata riposare per 20 minuti, per poi essere sottoposta alla fase di "staglio", con formazione e modellazione di panetti da 250 g che, successivamente, sono stati messi a lievitare, per i tempi selezionati (0, 8, 16, 24 h), in una cella a temperatura e umidità controllata (22°C, 80% UR). Trascorse le rispettive ore di lievitazione, i panetti sono stati lavorati e modellati dal "pizzaiolo" fino ad ottenere un disco di forma circolare ed in seguito cotti nel forno a legna ad una temperatura di circa 485°C per 80 secondi. In seguito, le pizze sono state lasciate raffreddare, congelate e liofilizzate per le successive analisi.

### ***Cinetica di lievitazione***

La cinetica di lievitazione è stata monitorata durante 24 h mediante acquisizione di immagini digitali ogni 30 minuti. Il volume dei panetti per pizza è stato calcolato mediante elaborazione delle immagini con il software Image J. La variazione del volume è stata espressa come indice  $V_t/V_0$ , dove  $V_t$  è il volume misurato al tempo  $t$  e  $V_0$  è il volume iniziale del panetto.

### ***Determinazione delle frazioni di amido digeribile e resistente***

L'amido digeribile e resistente, su campioni di impasti e di pizza liofilizzati, è stato determinato seguendo il metodo enzimatico AOAC 2017.16 (mediante il kit "Digestibile and Resistant Starch Assay Kit", Megazyme Ltd, Irlanda). L'amido rapidamente digeribile (RDS, %) è la percentuale di amido idrolizzato entro 20 min di incubazione con amilasi pancreatica ed

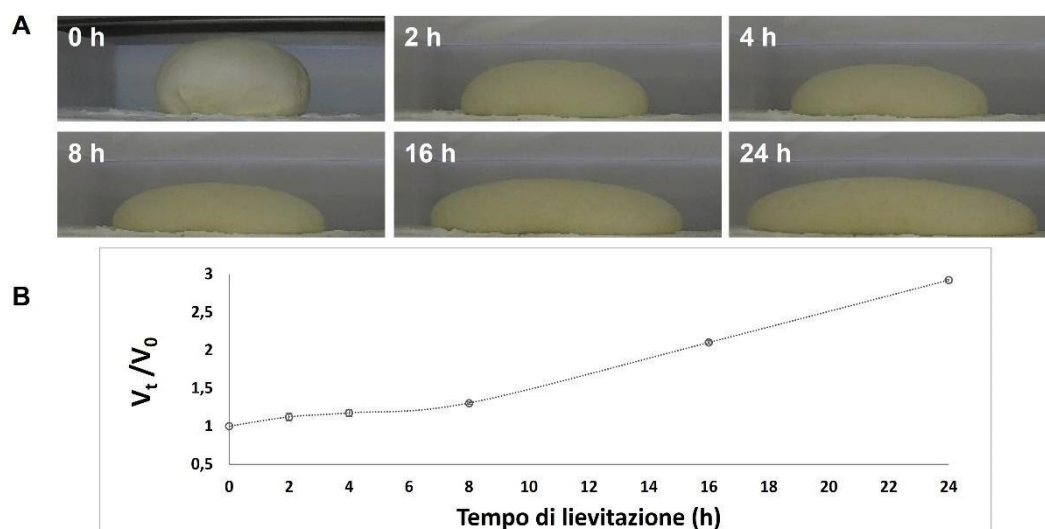
amiloglucosidasi (AMG) in un bagnetto termostato a 37°C. L'amido lentamente digeribile (SDS, %) è la percentuale di amido idrolizzato nei successivi 100 minuti di incubazione nelle stesse condizioni. Infine, l'amido resistente (RS) è la frazione di amido che non viene digerita nelle suddette condizioni, ma necessita di ulteriori trattamenti enzimatici. I valori sono espressi rispetto alla sostanza secca (dm) per evitare l'influenza del contenuto di acqua sui risultati delle frazioni di amido determinate. Ogni misurazione è stata effettuata in triplicato.

### **Determinazione del modulo elastico**

Gli impasti ai vari tempi di lievitazione sono stati analizzati per la determinazione del modulo elastico, eseguendo il test dinamico-meccanico, utilizzando il reometro rotazionale (Haake™Mars™, Thermo Fisher Scientific, USA) a stress controllato con geometria a piatti piani e paralleli di 80 mm. La distanza tra i due piatti (gap) è stata fissata a 2 mm e sono state effettuate 3 repliche per ciascun campione. Il modulo elastico ( $G'$ ) è stato misurato utilizzando una frequenza di oscillazione pari a 1 Hz e uno "strain" di 0.1%. I campioni sono stati riscaldati da 30 a 90°C e poi raffreddati da 90 a 30°C con una variazione di 10°C/min.

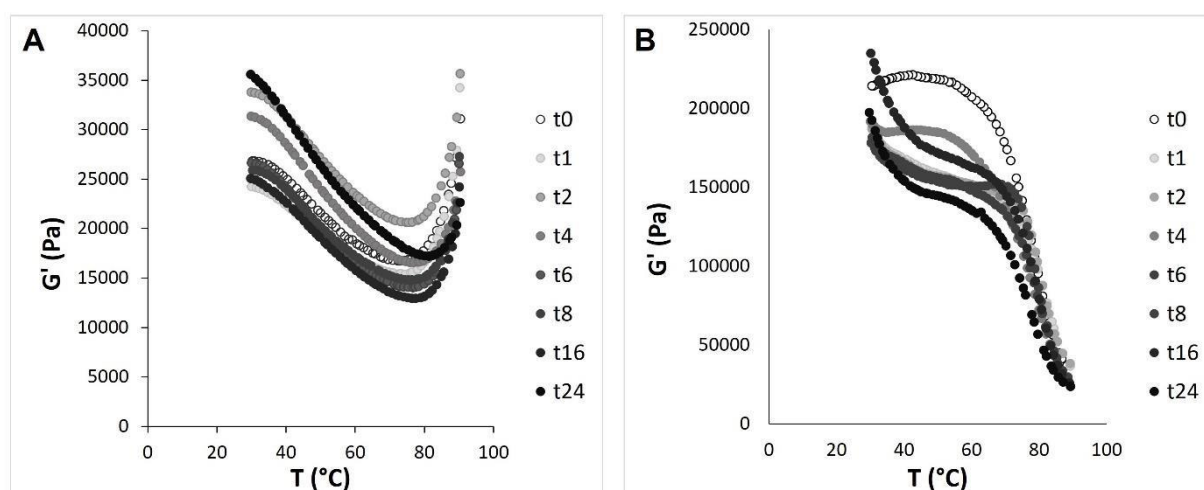
### **Risultati e discussione**

L'impasto per pizza ad alta idratazione è stato studiato durante una cinetica di lievitazione (Fig. 1). Nel corso della lievitazione, è stato calcolato l'aumento di volume dei panetti per effetto della CO<sub>2</sub> prodotta dall'azione metabolica dei lieviti. L'indice volumetrico determinato fino a 24h è riportato in Figura 1-B. Durante la fermentazione, gli zuccheri presenti nell'impasto vengono convertiti dal lievito (*S. cerevisiae*) principalmente in CO<sub>2</sub> ed etanolo. La quantità di CO<sub>2</sub> prodotta dipende dai substrati fermentescibili presenti nell'impasto (Pylar e Gorton, 2009). Il contenuto di zuccheri fermentescibili liberi nella farina di frumento è troppo basso per supportare un potere di gassificazione ottimale da parte delle cellule di lievito. Gli zuccheri che vengono consumati durante la fermentazione sono generati da idrolisi enzimatica dell'amido danneggiato (Struyf *et al.*, 2017). Infatti, aumentando il tempo di lievitazione degli impasti per pizza fino a 24 h si può avere una maggiore idrolisi dell'amido. L'analisi delle immagini mostra un iniziale innalzamento dell'altezza del panetto nelle prime ore, man mano che aumenta la CO<sub>2</sub>, seguito da un progressivo appiattimento e allargamento della base. Questo comportamento è tipico dei materiali viscoelastici, come gli impasti, che si rilassano nel corso della lievitazione, per effetto di fenomeni di destrutturazione della maglia glutinica.



**Figura 1.** Immagine dei panetti per pizza (A) e variazione dell'indice di volume ( $V_t/V_0$ ) (B) nel corso della lievitazione (0 ÷ 24 h).

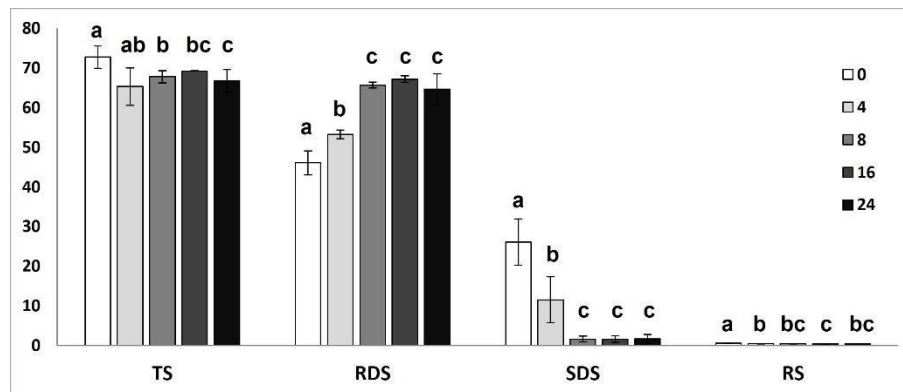
Per una valutazione delle proprietà reologiche sono stati condotti esperimenti di viscosimetria su campioni di impasti per pizza a diversi tempi di lievitazione. Il riscaldamento dell'impasto comporta un consolidamento dei legami tra le proteine e di conseguenza è possibile notare nella Figura 2 che durante la fase di raffreddamento, i campioni sottoposti a lievitazione per 16 e 24 h, mostrano una riduzione del modulo elastico ( $G'$ ); ciò indica che la maglia del glutine che si forma dopo la cottura è più "larga" ovvero presenta un minor numero di legami e quindi interazioni, di quella dell'impasto iniziale e di tutti gli altri campioni. L'allungamento della rete di glutine comporterebbe la deformazione delle regioni proteiche (Ooms *et al.*, 2015). Bernklau *et al.* (2017), hanno concluso che il livello di gruppi SH liberi (accessibili) e l'idrofobicità di superficie delle proteine sono i principali determinanti della rete co-proteica con il glutine durante il riscaldamento. L'indebolimento della maglia glutinica può essere attribuito alla perdita di alcune proteine del glutine dalla rete glutinica.



**Figura 2.** Modulo elastico ( $G'$ ) degli impasti per pizza a vari tempi di lievitazione durante la fase di riscaldamento (A) e di raffreddamento (B).

L'amido digeribile (DS) e l'amido resistente (RS) nelle pizze sono stati determinati mediante digestione *in vitro* con l'amilasi pancreatica, con lo scopo di studiare come il grado di idrolizzabilità dell'amido varia all'aumentare dei tempi di lievitazione. I risultati ottenuti dai campioni di impasti hanno mostrato una maggiore quantità di amido rapidamente digeribile (RDS) rispetto alla quantità di amido lentamente digeribile (SDS). Mentre, la quantità di amido resistente (RS) è risultata quasi trascurabile per tutti i campioni (Fig. 3). Si può notare una differenza significativa tra il tempo 0 e 4 h di lievitazione, con aumento di RDS e diminuzione di SDS. Dal tempo 8 h in poi si ha un evidente aumento di RDS a discapito di SDS. Questo fenomeno può essere spiegato considerando le variazioni del modulo elastico  $G'$  registrate per gli impasti. Infatti, la diminuzione di questo parametro negli impasti a lunga lievitazione (16 e 24 ore) indica che la struttura fisica dell'impasto risulta essere "aperta" per l'estensione della rete proteica dovuta all'aumento della  $CO_2$  prodotta dai lieviti durante la fermentazione. La modifica della struttura fisica dell'impasto, si fissa durante la cottura e, contemporaneamente, l'amido gelifica. L'allargamento delle maglie della rete glutinica, permette agli enzimi digestivi un più facile accesso alla matrice, con conseguente aumento della velocità di idrolisi delle molecole di amido. I risultati ottenuti della digeribilità dell'amido concordano col fatto che la pizza è un alimento ad alto indice glicemico (IG); infatti, dopo la cottura tutto l'amido diventa rapidamente digeribile ai lunghi tempi di lievitazione (8, 16, 24 h), mentre il valore di SDS è presente in quantità quasi nulle a differenza dei campioni di impasti dove i livelli di SDS risultano essere pressoché simili ai valori di RDS (dati non mostrati). L'aumento di RDS e la

diminuzione di SDS nelle pizze cotte rispetto agli impasti è anche associato a un aumento della risposta glicemica (Ronda *et al.*, 2012).



**Figura 3.** Amido digeribile e resistente in campioni di pizza ai tempi di lievitazione selezionati (0, 4, 8, 16 e 24 ore). Le lettere i campioni dello stesso gruppo indicano la differenza statistica con test ANOVA one-way. TS, amido totale; RDS, amido rapidamente digeribile (20 min); SDS, amido lentamente digeribile (120 min); RS, amido resistente.

In conclusione, è possibile affermare che una lunga lievitazione degli impasti per pizza può migliorare l'estensibilità del disco di pizza facilitando l'azione del pizzaiolo durante la fase di formatura. Inoltre, le variazioni a carico della struttura degli impasti, per tempi più lunghi di lievitazione, possono influenzare positivamente anche la digeribilità della pizza, favorendo l'azione degli enzimi della digestione nei processi di idrolisi di proteine e amido.

### Ringraziamenti

Questa ricerca è stata finanziata dal MIUR (PRIN 2017 -2017SFTX3Y- La pizza napoletana: lavorazione, distribuzione, innovazione e aspetti ambientali).

### Bibliografia

- Bernklau I., Neußer C., Moroni A.V., Gysler C., Spagnoletto A., Chung W., Jekle M., Becker T. 2017. Structural, textural and sensory impact of sodium reduction on long fermented pizza. *Food Chemistry*, 234: 398-407.
- Janssen A.M., Van Vliet T. and Vereijken J.M. 1996. Fundamental and empirical rheological behaviour of wheat flour doughs and comparison with bread making performance. *Journal of Cereal Science*, 23(1): 43-54.
- Ooms N., Delcour J.A 2015. How to impact gluten protein network formation during wheat flour dough making. *Current Opinion in Food Science*, 25: 88-97.
- Pylar E.J., Gorton L.A. 2009. *Baking Science & Technology: Fundamentals and Ingredients*. 4th Ed. Kansas City: Sosland Publishing Co, 1.
- Ronda F., Rivero P., Caballero P.A., Quilez J. 2012. High insoluble fibre content increases in vitro starch digestibility in partially baked breads. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(8): 971-977.
- Song Y., Zheng Q. 2007. Dynamic rheological properties of wheat flour dough and proteins. *Trends Food Science and Technology*, 18: 132-138.
- Struyf N., Verspreet J., Verstrepen K.J., Courtin C.M. 2017. Investigating the impact of  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and glucoamylase action on yeast-mediated bread dough fermentation and bread sugar levels. *Journal of Cereal Science*, 75: 35-44.



## Miglioramento delle caratteristiche nutrizionali del pane attraverso l'aggiunta di farina di ceci maltati

A. Cimini, A. Poliziani\*, M. Moresi

Dipartimento per la Innovazione nei sistemi Biologici, Agroalimentare e Forestale, Università della Tuscia, Via S. C. de Lellis, 01100 Viterbo (VT).

\*E-mail: [alessandro.poliziani@gmail.com](mailto:alessandro.poliziani@gmail.com)

### Abstract

In this work, the reduction in the anti-nutritional compounds of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) was attempted by resorting to the malting process. The seeds were immersed in water at 24 °C for as long as 24 h. After just 5 h, their moisture content reached a value close to 50% w/w, sufficient to start the metabolic processes of germination. This step was performed in a laboratory-scale prototype at 24 °C up to 96 h. After 48 h the initial phytic acid and  $\alpha$ -galactoside contents in the germinating seeds reduced by 34% and 90%, respectively. Final drying at ~50 °C for 24 h gave rise to a pale chickpea malt. After removing the roots and shoot, the cotyledons were ground to obtain a malted chickpea flour. The bread-making tests using type 1 soft wheat flour enriched with malted chickpeas in a ratio 70/30 and mother yeast revealed a further phytic acid reduction up to 69% with respect to that initially present. At 5% probability level, the malted chickpea enriched bread practically exhibited the same phytic acid content ( $0.12\pm 0.03$  g/100 g ss) of the reference bread made of type 1 soft wheat flour ( $0.07\pm 0.03$  g/100 g ss), but about 23% greater raw protein content.

### Riassunto

In questo lavoro si è verificata la riduzione dei fattori anti-nutrizionali presenti in ceci (*Cicer arietinum* L.) sottoposti ad un processo di maltazione. Durante la macerazione i chicchi sono stati immersi in acqua a 24 °C per ~24 h. Dopo appena 5 h il loro contenuto di umidità raggiungeva un valore prossimo al 50% p/p, sufficiente per avviare i processi metabolici di germinazione. Detta fase è stata eseguita in un prototipo in scala di laboratorio a 24 °C per 96 h. Dopo 48 h il contenuto iniziale di acido fitico e  $\alpha$ -galattosidi nei semi si riduceva, rispettivamente, del 34% e del 90%. I ceci germinati sono stati infine essiccati a ~50 °C per 24 h, ottenendo un malto chiaro di ceci. Dai cotiledoni, rimossi il germoglio e le radici, si ricavava per macinazione una farina di ceci maltati. I test di panificazione con farina di frumento tenero tipo 1 arricchita al 30% con detta farina e lievito madre rilevavano un'ulteriore riduzione fino al 69% dell'acido fitico inizialmente presente. Ne risultava, al livello di confidenza del 95%, lo stesso tenore in acido fitico ( $0,12\pm 0,03$  g/100 g ss) di quello ( $0,07\pm 0,03$  g/100 g ss) riscontrato nel pane ottenuto con la sola farina di frumento tenero tipo 1, ma un contenuto proteico superiore del 23% circa.

### Introduzione

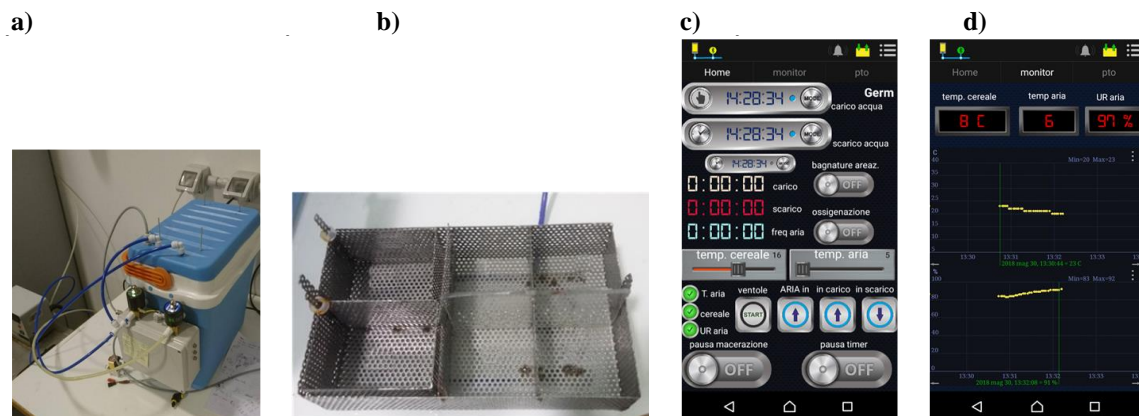
I legumi sono considerati un'alternativa vegetale ai prodotti carnei grazie non solo al loro profilo nutrizionale, ma anche per i bassi costi di coltivazione e per il ridotto impatto ambientale (Brummer *et al.*, 2015; Coles *et al.*, 2016). Nonostante il loro relativamente alto contenuto proteico, si rileva una carenza di aminoacidi solforati (Zia-Ul-Haq *et al.*, 2007) e la presenza di fattori anti-nutrizionali, quali acido fitico, acido tannico, polifenoli e  $\alpha$ -galattosidi (zuccheri non riducenti a basso peso molecolare come stachioso e raffinoso, che causano flatulenza: El-Adawy, 2002; Gilani *et al.*, 2005). Questi composti subiscono una parziale degradazione a seguito di bagnatura e di una cottura prolungata (Han *et al.*, 2006). Per contro, il processo di maltazione non solo ne riduce il contenuto, ma soprattutto ne migliora le caratteristiche sensoriali (Nkhata *et al.*, 2018).

Il processo di maltazione consta in genere di tre diverse fasi: macerazione, germinazione ed essiccazione. Durante la macerazione, i semi vengono immersi in acqua perché ne assorbano una quantità sufficiente ad attivarne la germinazione. L'essiccazione blocca dette attività enzimatiche. Avendo studiato l'effetto della temperatura sulla cinetica di idratazione dei ceci (Cimini *et al.*, 2021), scopo di questo lavoro è stato quello di rilevare l'eventuale riduzione di fattori anti-nutrizionali in ceci (*Cicer arietinum* L.) maltati e in pane arricchito in farina di ceci maltati.

## Materiali e metodi

L'impianto da banco, appositamente progettato per alloggiare fino ad 1 kg di semi, consisteva di una camera coibentata (Fig. 1a), munita di un cestello in acciaio inox forato per contenere i semi in bagnatura (Fig. 1b). Un sensore CJMCU-1080 HDC1080 permetteva di rilevare l'umidità relativa (UR) e la temperatura dell'aria nella camera con precisione, rispettivamente, di  $\pm 2\%$  e  $\pm 0.2$  °C. Un altro sensore tipo DS18B20, posto a contatto dei semi, permetteva di rilevare e regolare in continuo la temperatura con accuratezza di  $\pm 0.5$  °C tramite l'accensione/ spegnimento di 2 ventole Arctic F12 di diametro 120 mm atte ad erogare un flusso d'aria di  $\sim 90$  m<sup>3</sup>/h a temperatura controllata tramite un radiatore alimentato con acqua termo-refrigerata. Quest'ultima veniva anche utilizzata per la bagnatura dei ceci tramite un dispersore collocato all'interno della camera coibentata. Il controllo delle elettrovalvole, il monitoraggio e la registrazione dei dati avveniva tramite un microcontrollore Geekreit® ATmega328P Nano V3, ed avveniva da remoto con un'apposita applicazione (Virtuino) (Fig. 1cd).

La fase di germinazione avveniva in un'altra vasca in grado di alloggiare 2 cestelli forati in acciaio inox della capacità di 500 g di semi imbibiti ciascuno; inoltre, 2 ugelli provvedevano a nebulizzare acqua ad intervalli regolari al fine di mantenere un'umidità relativa  $>95\%$  durante tutta la germinazione.



**Figura 1.** Foto dell'impianto prototipale di bagnatura e germinazione (a), dei cestelli forati (b) e dell'applicazione Virtuino (c) installata su uno smartphone con i tasti funzione per il monitoraggio (d) dei parametri del processo di idratazione.

La sperimentazione è stata effettuata su campioni di ceci biologici prodotti e confezionati in sacchetti da 500 g dall'Azienda Agricola Monte Castello (Serravalle di Chienti, MC), aventi un tenore proteico ed un'umidità rispettivamente del 23,2% e dell'11% p/p.

Con riferimento ai test preliminari di bagnatura effettuati a temperatura compresa fra 12 e 36 °C (Cimini *et al.*, 2021), si è replicata 3 volte la cinetica di idratazione a 24 °C. Dopo un lavaggio preliminare dei semi con acqua corrente, si immetteva nella vasca acqua a 24 °C, la quale veniva scaricata *in toto* dopo 12 h e sostituita da un egual quantitativo sempre a 24 °C. Dopo altre 12 h, i campioni di semi venivano prelevati per determinarne l'umidità. Si è ripetuto il processo di bagnatura a 24 °C per sole 5 h, essendo questa durata sufficiente a portare l'umidità dei semi all'incirca al 50% p/p. Dopodiché, i ceci sono stati immessi nelle vasche di germinazione e

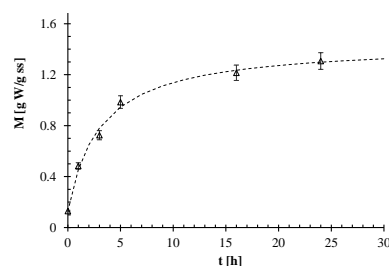


mantenuti a 24 °C per 96 h, effettuando un ricambio di aria della durata di 1 min ogni 10 min. I semi venivano rimescolati manualmente ogni 12 h per omogenizzarne la temperatura e l'umidità. I campionamenti venivano effettuati ad intervalli di 24 h prelevando 100 semi, che venivano suddivisi in 4 classi a seconda della lunghezza della radice: semi non germinati (NG), semi appena germinati con radice appena visibile (G) e semi con radice lunga meno ( $G_{L<1,5}$ ) o più ( $G_{L>1,5}$ ) di 1,5 cm. Parte dei semi veniva utilizzata per la determinazione dell'umidità, mentre la parte restante veniva essiccata in stufa a 80 °C e poi macinata in un mulino a martelli per determinare il tenore in acido fitico ed in  $\alpha$ -galattosidi utilizzando rispettivamente i saggi enzimatici *Phytic Acid* e *Raffinose/Sucrose/D-Glucose* (Megazyme Ltd, Bray, Irlanda). Le prove di germinazione sono state condotte in triplicato. Una volta germinati, i semi venivano essiccati a 50 °C per 48 h in presenza di una leggera ricircolazione di aria, ottenendo un malto di ceci chiaro (*pale*).

Il pane arricchito con farina di ceci maltati è stato ottenuto utilizzando un pre-impasto come starter. Le farine di frumento tenero di tipo 1 e di ceci maltati venivano mescolate nel rapporto 70:30 g/g. Il pre-impasto veniva ottenuto miscelando la pasta madre con un'umidità del 48% p/p, il mix di farine e l'acqua di rete in pari proporzione (1:1:1). L'impasto principale si otteneva aggiungendo 700 g di acqua e 150 g di pre-impasto a 1000 g di farina di tipo 1 o del mix di farine anzidetto. Dopo aver fatto riposare l'impasto per 30 min, si aggiungevano 20 g di sale da tavola e 50 g di acqua fino ad ottenere un impasto omogeneo. Questo veniva conservato a 24 °C (*bulk fermentation*) e sottoposto a 2 serie di pieghe *stretch and fold* a distanza di 30 min l'una dall'altra. Dopo aver fatto maturare l'impasto a 4 °C per 8 h, si preformavano i filoni. Dopo altri 30 min, si conferiva la forma finale ai filoni da 500 g prima di lasciarli lievitare in appositi cestini a 26 °C per 4 h. I filoni venivano infine cotti in un forno a gas, eseguendo una cottura in caduta a 230 °C per 10 min, a 210 °C per 15 min ed infine a 200 °C per 20 min a valvola aperta. Infine, il tenore di azoto totale nelle farine e nel pane è stato determinato con il metodo Kjeldahl, utilizzando un fattore di conversione per l'azoto totale di 6,25 (Mariotti *et al.*, 2008).

### Cinetica di idratazione dei ceci

Si riporta in Fig. 2 la cinetica di idratazione alla temperatura di 24 °C dei campioni di ceci esaminati. Dopo 16 h di bagnatura, i ceci raggiungevano un tenore di umidità pressoché stabile ( $54.9 \pm 0.9$  % p/p). Comunque, dopo sole 5 h pervenivano ad un'umidità media del  $50 \pm 3$  % p/p, equivalente ad un rapporto ponderale M di  $1.0 \pm 0.1$  g di acqua per g di sostanza secca (ss). Detto rapporto è stato ritenuto empiricamente più che sufficiente per attivare la germinazione dei ceci.



**Figura 2.** Effetto del tempo (t) sul rapporto ponderale dell'acqua (M) durante la bagnatura a 24 °C. La linea tratteggiata è stata tracciata utilizzando il modello empirico di Peleg come descritto da Cimini *et al.* (2021).

### Grado di omogeneità della germinazione

Dopo una serie di prove preliminari, il processo di germinazione è stato effettuato a 24 °C ed UR > 95%, verificando l'uniformità di germinazione dei ceci. Dopo le prime 24 h, il 35% dei semi non era ancora germinato. Dopo 48 h, detta percentuale si riduceva al 5%, mentre il 93% dei semi presentava una radice di lunghezza inferiore a 1,5 mm. Dopo 96 h, il 98% dei semi risultava germinato con radici appena visibili (10%) oppure lunghe più (46%) o meno (42%) di 1,5 mm.

### Cinetica di degradazione dei fattori anti-nutrizionali durante la germinazione

Durante il processo di germinazione a 24 °C, il rapporto ponderale dell'acido fitico riferito alla sostanza secca, inizialmente pari a 1,27±0,12 g/100 g ss, si riduceva del 26% dopo 24 h, del 34% dopo 48 h e del 40,9% dopo 96 h di germinazione (0,75±0,09 g/100 g ss).

Durante la fase di bagnatura a 24 °C, si osservava una riduzione degli  $\alpha$ -galattosidi da 2,17±0,09 a 1,72±0,09 g/100 g ss. Nella successiva fase di germinazione, detti oligosaccaridi subivano un'ulteriore riduzione a 1,17±0,24 g/100 g ss dopo 24 h, a 0,21±0,08 g/100 g ss dopo 48 h e a 0,11±0,16 g/100 g ss dopo 96 h. Nonostante l'ampia variabilità riscontrata, si potrebbe ritenere appropriato un processo di germinazione di circa 48 h, visto che il tenore iniziale di detti oligosaccaridi si riduceva di oltre un fattore 10 e che la cinetica di degradazione dell'acido fitico subiva un netto rallentamento tra le 48 e le 72 h.

### Essiccazione e macinazione dei ceci germinati

I ceci germinati sono stati infine essiccati a 50 °C per 24 h fino ad ottenere un'umidità residua del 5% p/p circa. Sul prodotto macinato si è rilevato che l'acido fitico si era ridotto a 0,83±0,16 g/100 g ss, mentre non si rilevavano residui né di  $\alpha$ -galattosidi, né di glucosio. Per contro, il tenore di saccarosio era pari a 5,68±0,35 g/100 g ss.

### Test di panificazione e conclusioni

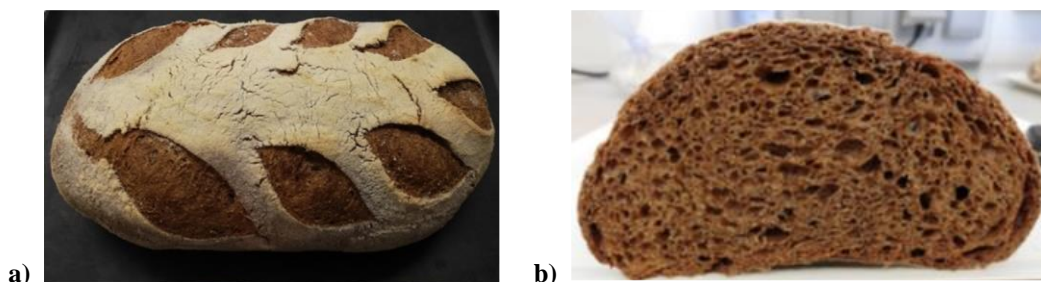
La quantità e la qualità proteica di un pane a fermentazione naturale è stata migliorata aggiungendo un 30% p/p di uno sfarinato di ceci maltati (FCM) ad una farina di frumento tenero tipo 1 (F1), tipicamente a ridotto contenuto di acido fitico e  $\alpha$ -galattosidi (Tabella 1).

**Tabella 1.** Tenore glucidico e di acido fitico in sfarinati di frumento o ceci sia tal quali che maltati e pani a fermentazione naturale.

Prodotto		Glucosio	Saccarosio	$\alpha$ -galattosidi	Acido fitico	Proteine	Umidità
		[g/100 g ss]	[g/100 g ss]	[g/100 g ss]	[g/100 g ss]	[% p/p]	[% p/p]
Farina tipo 1	(F1)	0,00±0,16	0,37±0,02	0,24±0,01	0,20±0,14	12 <sup>+</sup>	11,0±0,5
Farina di ceci	(FC)	0,03±0,02	2,50±0,09	2,17±0,09	1,27±0,12	20,72±0,45	5,0±0,6
Farina di ceci maltati	(FCM)	0,00±0,00	5,68±0,35	0,00±0,00	0,83±0,16	21,73±0,55	5,0±0,5
F1+FCM		0,01±0,02	1,90±0,25	0,16±0,05	0,39±0,14	17,40±0,02	9,0±0,3
Pane con F1		0,05±0,01	0,06±0,01	0,03±0,04	0,07±0,03	14,00±0,03	5,0±0,5
Pane con F1+ FC	(70/30)	0,47±0,22	0,17±0,02	0,55±0,01	0,19±0,02	16,40±0,51	5,0±0,4
Pane con F1+FCM	(70/30)	0,23±0,03	0,24±0,04	0,00±0,00	0,12±0,03	17,30±0,31	5,0±0,5

\*non determinato, <sup>+</sup> valore estratto dell'etichetta nutrizionale.

Al contrario della farina di ceci tal quale (FC) che ne è particolarmente ricca, la farina di ceci maltati (FCM) risultava priva di  $\alpha$ -galattosidi (Tabella 1). Mescolando F1 con FCM in rapporto 70:30 (F1+FCM), l'apporto di oligosaccaridi e di acido fitico derivava rispettivamente da F1 e da FCM. Il tenore di acido fitico su base secca nei prodotti panificati cotti risultava sempre inferiore rispetto a quello presente negli sfarinati a causa sia del processo di cottura (essendo parzialmente instabile a temperature >100 °C: Atasoy and Hendek Ertop, 2017) che dell'azione del lievito madre. Dalla Tabella 1, che riporta il tenore su base secca dei glucidi e dell'acido fitico nei tre pani realizzati con farina tipo1 (F1), tal quale oppure arricchita al 30% con farina di ceci tal quali (FC) o di ceci maltati (FCM), si evince chiaramente l'effetto positivo della maltazione. Infatti, l'aggiunta di FCM porta ad una concentrazione praticamente nulla di  $\alpha$ -galattosidi, mentre quella di ceci tal quali (FC) porta ad un livello di 0,55 g/100 g ss. Infine, l'aggiunta di FCM conferisce al pane un tenore proteico (17,3 % p/p) maggiore del 23% rispetto a quello (14 % p/p) del pane di riferimento con F1. Come illustrato in Fig. 3, il pane ottenuto con F1 arricchita al 30% con ceci maltati chiari risulta del tutto simile ad un pane ottenuto al 30% in farina di ceci non maltati senza alcuna netta differenza di gusto.



**Figura 3.** Foto del pane a fermentazione naturale arricchito al 30% con farina di ceci maltati chiari: a) vista dall'alto e b) sezione trasversale.

### Ringraziamenti

Questo lavoro è stato effettuato nell'ambito del progetto di ricerca GeCoWEB A0375-2020-36511 della Regione Lazio nell'ambito dell'Avviso Pubblico "Gruppi di ricerca 2020" - POR FESR Lazio 2014-2020 - Azione 1.2.1 approvato con Determinazione n. G08487 del 19/07/2020 - pubblicato sul BURL N. 93 del 23/07/2020 - modificato con Determinazione n. G10624/2020 - pubblicata sul BURL n. 116 del 22/09/2020.

### Bibliografia

- Atasoy R., Hendek Ertop M. 2017. Thermal heat processing effects on phytic acid content and mineral bioavailability of Siyez wheat. Presented at Congress on Food Quality and Safety and Health and Nutrition.  
[https://www.researchgate.net/publication/324507128\\_THERMAL\\_HEAT\\_PROCESSING\\_EFFECTS\\_ON\\_PHYTIC\\_ACID\\_CONTENT\\_AND\\_MINERAL\\_BIOAVAILABILITY\\_OF\\_SIYEZ\\_WHEAT](https://www.researchgate.net/publication/324507128_THERMAL_HEAT_PROCESSING_EFFECTS_ON_PHYTIC_ACID_CONTENT_AND_MINERAL_BIOAVAILABILITY_OF_SIYEZ_WHEAT).
- Brummer Y., Kaviani M., Tosh S.M. 2015. Structural and functional characteristics of dietary fibre in beans, lentils, peas and chickpeas. *Food Research International*, 67: 117-125.
- Cimini A., Poliziani A., Moresi M. 2021. Effect of temperature on the hydration kinetics of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and yellow soybean (*Glycine max*). *Chemical Engineering Transactions*, 87: 31-36.
- Coles G.D., Wratten S.D., Porter J.R. 2016. Food and nutritional security requires adequate protein as well as energy delivered from whole-year crop production. *Peer J*, 4: e2100.
- El-Adawy T.A. 2002. Nutritional composition and antinutritional factors of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) undergoing different cooking methods and germination. *Plant Foods Hum Nutr*, 57: 83-97.
- Gilani G.S., Cockell K.A., Sepehr E. 2005. Effects of antinutritional factors on protein digestibility and amino acid availability in foods. *Journal of AOAC International*, 88(3): 967-987.
- Han I.H., Baik B.K. 2006. Oligosaccharide content and composition of legumes and their reduction by soaking, cooking, ultrasound. and high hydrostatic pressure. *Cereal Chemistry*, 83(4): 428-433.
- Mariotti F., Tomé D., Mirand P.P. 2008. Converting nitrogen into protein-beyond 6.25 and Jones' factors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(2): 177-184.
- Nkhata S.G., Ayua E., Kamau E.H., Shingiro J.B. 2018. Fermentation and germination improve nutritional value of cereals and legumes through activation of endogenous enzymes. *Food Science and Nutrition*, 6(8): 2446-2458.
- Zia-Ul-Haq M., Iqbal S., Ahmad S., Imran M., Niaz A., Bhanger M.I. 2007. Nutritional and compositional study of Desi chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars grown in Punjab, Pakistan. *Food Chemistry*, 105(4): 1357-1363.

## **Pani funzionali di grano duro ottenuti mediante parziale sostituzione della semola con sfarinati integrali di cereali minori e legumi**

A. Spina<sup>1\*</sup>, P. De Vita<sup>2</sup>, L. Padalino<sup>3</sup>, V. Giannone<sup>4</sup>, L. Lecce<sup>3</sup>, M.A. Del Nobile<sup>3</sup>, V. Giovanniello<sup>2</sup>, M. Canale<sup>1</sup>, D. B. M. Ficco<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali (CREA-CI), Corso Savoia 190, 95024 Acireale (CT).

<sup>2</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali (CREA-CI), S.S. 673 km 25.200, 71122 Foggia (FG).

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Agrarie, degli Alimenti e dell'Ambiente Università degli Studi di Foggia Via Napoli, 25, 71122 Foggia (FG).

<sup>4</sup>Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali, Università degli Studi di Palermo, Viale delle Scienze, Ed. 4, 90128 Palermo (PA).

\*E-mail: [alfio.spina@crea.gov.it](mailto:alfio.spina@crea.gov.it)

### **Abstract**

The aim of this study was to develop fortified durum wheat breads by partially replacing and integrating the semolina (GD) with white sorghum (SB), or yellow pea (PP) or using a natural mixture of rye and durum wheat (GS). The main physico-chemical and rheological parameters were determined about the various flours and about the mixes, while about the loaves obtained the total fibers, the glycaemic index and the main qualitative and sensorial traits, were examined. The PP flour showed twice the protein level and a yellow index similar to 100% GD, while that of GS showed more than three times the dietary fibre. At the rheological tests, the different mix formulations showed less strength, stability and P/L ratio.

However, the addition of SB and PP, had a negative impact about loaf volume, crumb, crust and sensory acceptance. Breads fortified with PP were more appreciated (in terms of lower glycaemic index, better total fibre content, crumb colour and overall acceptability scores).

### **Riassunto**

Scopo di questo studio è stato quello di sviluppare pani fortificati mediante parziale sostituzione e integrazione della semola di grano duro (GD) con sfarinati di sorgo bianco (SB), o pisello proteico (PP), oppure usando un miscuglio naturale di grano duro e segale, chiamato grano segalato (GS), costituito prevalentemente da quest'ultima. Sui vari sfarinati e sui mix realizzati sono stati determinati i principali parametri chimico-fisici e reologici, mentre sui pani ottenuti sono state rilevate le caratteristiche qualitative, le fibre totali, l'indice glicemico e le proprietà sensoriali. Rispetto a GD 100%, lo sfarinato di PP ha mostrato valori doppi di proteine e un indice di giallo simile, mentre GS ha evidenziato valori più che tripli di fibre. Alle prove reologiche, le diverse formulazioni d'impasto hanno evidenziato una minore forza e stabilità e un rapporto fra tenacità ed estensibilità inferiore. Tuttavia, l'aggiunta di PP, ma soprattutto di SB, ha avuto un impatto negativo su volume, mollica, crosta e sull'accettazione sensoriale del pane. I pani con PP sono risultati migliori in termini di più basso indice glicemico, migliore contenuto in fibre totali, colore della mollica e profilo sensoriale.

### **Introduzione**

In tutto il mondo il pane è un componente essenziale della dieta alimentare quotidiana e rappresenta un alimento ideale per veicolare sostanze a valenza nutrizionale e nutraceutica (Ficco *et al.*, 2019). Attualmente, vi è sempre più una maggiore richiesta di prodotti a base di cereali ricchi di composti bioattivi che possono essere ottenuti mediante l'impiego di sfarinati integrali, o frazioni di essi, da usare in combinazione con sfarinati di altra natura, derivanti da legumi o da altri vegetali (Ficco *et al.*, 2018). Lo scopo di questo studio è stato quello di sviluppare pani

fortificati ad elevato contenuto di fibra e con ridotta risposta glicemica valutata in vitro, ottenuti mediante parziale sostituzione (10%, 15%, 20% e 30%) della semola rimacinata con sfarinati integrali di cereali minori senza glutine (sorgo bianco), o con legumi (pisello proteico), o impiegando grano segalato.

## Materiali e metodi

Partendo da semola rimacinata di qualità impiegata nella produzione del pane “DOP Pagnotta del Dittaino”, ottenuta dalla macinazione del grano duro prodotto dai soci della Cooperativa Agricola Valle del Dittaino” di Assoro (EN), sono state aggiunte delle differenti percentuali d’integrazione (10%, 15%, 20% e 30%) di sorgo bianco, pisello proteico, ed è stato impiegato un miscuglio naturale di grano e segale (grano-segalato), costituito prevalentemente da quest’ultima. Sugli sfarinati di partenza e sulle relative miscele sono state determinate le principali caratteristiche chimico-fisiche e le proprietà reologiche degli impasti, mentre sui pani ottenuti sono state determinate le principali caratteristiche qualitative, il contenuto in fibre, seguendo le metodologie ufficiali AACC, norme UNI, AOAC, l’indice glicemico con digestione in vitro dei pani (Wolter *et al.*, 2013, modificato) e successiva analisi dell’amido digerito (Goni *et al.*, 1997). Infine, sui pani è stata effettuata la valutazione sensoriale, secondo Previtali *et al.* (2014).

## Risultati e discussione

Rispetto alla semola 100%, lo sfarinato di pisello proteico ha presentato valori doppi di proteine e lo sfarinato di grano segalato ha mostrato valori quasi tre volte maggiori di fibre (dati non mostrati).

Per quanto riguarda le valutazioni fisiche e reologiche degli impasti, le diverse formulazioni hanno mostrato, in generale, una minore stabilità degli impasti, una minore forza ed una riduzione del rapporto tenacità/estensibilità dello stesso.

**Tabella 1.** Caratteristiche fisiche e reologiche delle diverse formulazioni d’impasto (dati presentati come media ± deviazione standard).

Campione	Alveografo			Farinografo	
	W (J x 10 <sup>-4</sup> )	P/L	Assorbimento idrico (%)	Stabilità dell’impasto (min)	Grado di rammollimento (U.B.)
<b>Controllo (semola 100%)</b>	225±5,66a	2,42±0,07b	62,5±0,00b	5,5±0,00c	45±1,41d
<b>grano segalato integrale</b>	74±2,83de	0,53±0,03d	49,4±0,28e	1,9±0,00f	152±2,83a
<b>semola + 10% sorgo bianco</b>	152±4,24b	2,21±0,04b	58,9±0,14c	4,1±0,14d	44±4,24d
<b>semola + 15% sorgo bianco</b>	125±3,54c	2,46±0,08b	59,0±0,28c	4,4±0,14d	47±2,83d
<b>semola + 20% sorgo bianco</b>	89±4,24d	2,47±0,13b	58,1±0,14c	7,5±0,28b	37±1,47d
<b>semola + 30% sorgo bianco</b>	63±4,24ef	2,90±0,10a	54,7±0,14d	12,7±0,42a	13±0,00e
<b>semola + 10% pisello proteico</b>	117±4,24c	0,87±0,04d	63,4±0,14a	4,1±0,00d	71±1,41c
<b>semola + 15% pisello proteico</b>	50±2,83fg	1,46±0,06c	62,5±0,14ab	4,2±0,14d	74±2,83c
<b>semola + 20% pisello proteico</b>	53±2,83fg	1,39±0,04c	62,5±0,28ab	3,1±0,14e	110±4,24b
<b>semola + 30% pisello proteico</b>	36±1,41g	1,58±0,03c	62,6±0,14ab	2,3±0,28ef	114±2,83b

Differenti lettere indicano una differenza significativa ( $p \leq 0,001$ ), secondo l’ANOVA, seguita dal test di Tukey.

L’aggiunta di sorgo bianco e di pisello proteico ha avuto, però, un certo impatto negativo sul volume del pane, sulle caratteristiche della mollica e della crosta (Tab. 2) e, come vedremo infine, anche sull’accettazione sensoriale (Fig. 2).

**Tabella 2.** Proprietà fisiche dei pani con differenti percentuali di integrazione di sfarinati di sorgo bianco e pisello proteico (dati presentati come media  $\pm$  deviazione standard).

Campione	Volume (cm <sup>3</sup> )	Altezza (mm)	Peso (g)	Porosità (1-8)	Struttura interna (1-2)
<b>Controllo (semola 100%)</b>	430,0 $\pm$ 14,14a	75,5 $\pm$ 0,71a	147,9 $\pm$ 0,23a	5	1
<b>semola + 10% sorgo bianco</b>	386,3 $\pm$ 5,30bcde	73,0 $\pm$ 1,41ab	145,2 $\pm$ 0,78abc	5	1
<b>semola + 15% sorgo bianco</b>	411,3 $\pm$ 5,30bcde	74,0 $\pm$ 2,12ab	147,1 $\pm$ 0,45a	4	1
<b>semola + 20% sorgo bianco</b>	380,0 $\pm$ 14,14bcde	73,0 $\pm$ 2,83ab	145,1 $\pm$ 1,00 abc	5	1
<b>semola + 30% sorgo bianco</b>	358,8 $\pm$ 5,30e	64,5 $\pm$ 2,12cde	143,5 $\pm$ 0,81abc	6	2
<b>semola + 10% pisello proteico</b>	410,0 $\pm$ 3,54abc	70,0 $\pm$ 0,00abc	145,2 $\pm$ 0,05abc	5	1
<b>semola + 15% pisello proteico</b>	406,3 $\pm$ 1,77abcd	67,3 $\pm$ 1,06bcd	145,5 $\pm$ 0,33abc	6	2
<b>semola + 20% pisello proteico</b>	373,8 $\pm$ 1,77cde	64,0 $\pm$ 1,41cde	146,7 $\pm$ 2,17ab	6	2
<b>semola + 30% pisello proteico</b>	370,0 $\pm$ 0,00de	61,8 $\pm$ 0,35de	142,4 $\pm$ 0,25bc	7	2
<b>grano segalato integrale</b>	310,0 $\pm$ 3,54f	56,8 $\pm$ 1,06e	141,3 $\pm$ 0,50c	8	1

Differenti lettere indicano una differenza significativa ( $p \leq 0,001$ ), secondo l'ANOVA, seguita dal test di Tukey.

Tuttavia, tali andamenti sono stati controbilanciati da una maggiore quantità di fibre, sia solubile sia insolubile, riscontrata soprattutto nei pani di grano segalato e in quelli integrati al 20% e 30% con pisello proteico (Tab. 3).

**Tabella 3.** Valutazione del contenuto di fibra (dati presentati come media  $\pm$  deviazione standard).

Campione	Fibra insolubile (%)	Fibra solubile (%)	Fibra totale (%)
Controllo (semola 100%)	8.01 $\pm$ 1.11bc	1.38 $\pm$ 0.22bc	9.39 $\pm$ 0.89cd
Semola + 10% sorgo bianco	5.60 $\pm$ 0.99c	1.51 $\pm$ 0.99abc	7.11 $\pm$ 1.28d
Semola + 15% sorgo bianco	5.82 $\pm$ 0.35c	1.31 $\pm$ 0.99c0.05bc	7.13 $\pm$ 0.30d
Semola + 20% sorgo bianco	6.88 $\pm$ 0.57c	1.24 $\pm$ 0.20bc	8.12 $\pm$ 0.30d
Semola + 30% sorgo bianco	9.37 $\pm$ 0.88abc	0.82 $\pm$ 0.03c	10.19 $\pm$ 0.85bcd
Semola + 10% pisello proteico	9.56 $\pm$ 0.44abc	1.63 $\pm$ 0.44abc	11.19 $\pm$ 0.79abcd
Semola + 15% pisello proteico	9.84 $\pm$ 0.32abc	1.82 $\pm$ 0.33abc	11.66 $\pm$ 0.01abc
Semola + 20% pisello proteico	11.40 $\pm$ 1.61ab	2.18 $\pm$ 0.36ab	13.57 $\pm$ 1.24ab
Semola + 30% pisello proteico	12.40 $\pm$ 0.09a	2.67 $\pm$ 0.09a	15.07 $\pm$ 0.18a
grano segalato integrale	12.80 $\pm$ 0.95a	2.27 $\pm$ 0.95ab	15.07 $\pm$ 1.04a

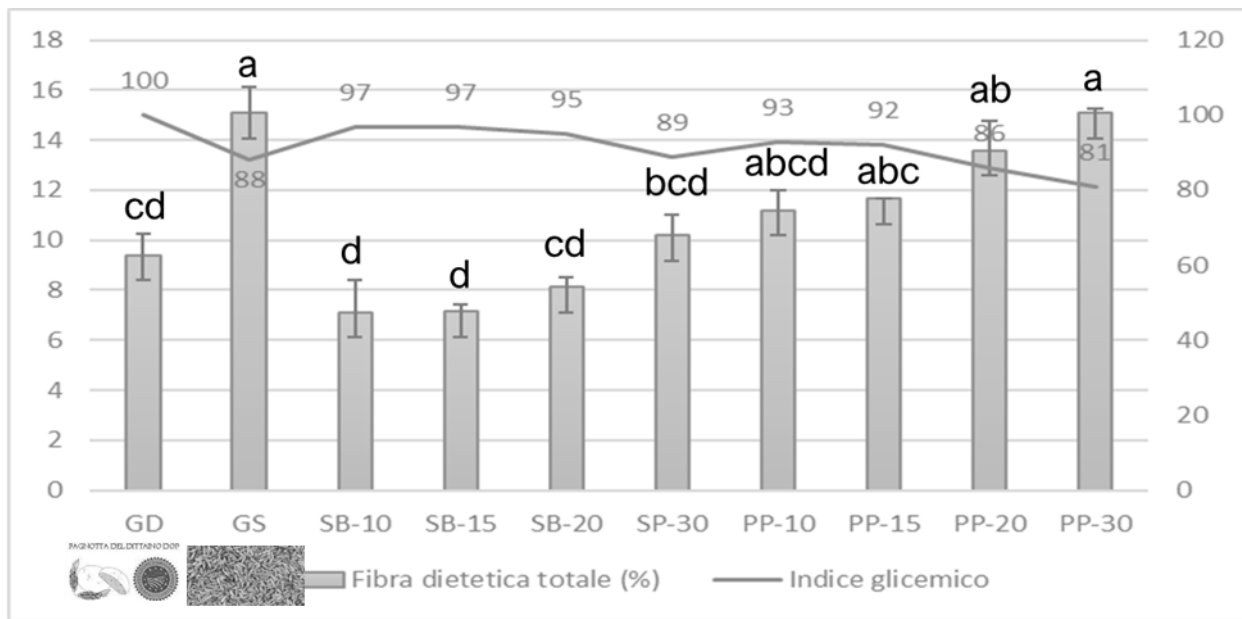
Differenti lettere indicano una differenza significativa ( $p \leq 0,001$ ), secondo l'ANOVA, seguita dal test di Tukey.

Posto uguale a 100 l'indice glicemico del pane di controllo, i pani con pisello proteico integrati al 20% e 30%, quelli di grano segalato e i pani con sorgo bianco integrati al 30% hanno fatto registrare i valori più bassi di indice glicemico (Tab. 4).

**Tabella 4.** Risposta glicemica in vitro dei pani (dati presentati come media  $\pm$  deviazione standard).

Campione	Indice glicemico
Controllo (semola 100%)	100 $\pm$ 0.6a
semola + 10% sorgo bianco	97 $\pm$ 1.7ab
semola + 15% sorgo bianco	97 $\pm$ 2.3ab
semola + 20% sorgo bianco	95 $\pm$ 0.6b
semola + 30% sorgo bianco	89 $\pm$ 1.3c
semola + 10% pisello proteico	93 $\pm$ 1.7b
semola + 15% pisello proteico	92 $\pm$ 2.3b
semola + 20% pisello proteico	86 $\pm$ 0.6c
semola + 30% pisello proteico	81 $\pm$ 1.3d
grano segalato integrale	88 $\pm$ 2.7c

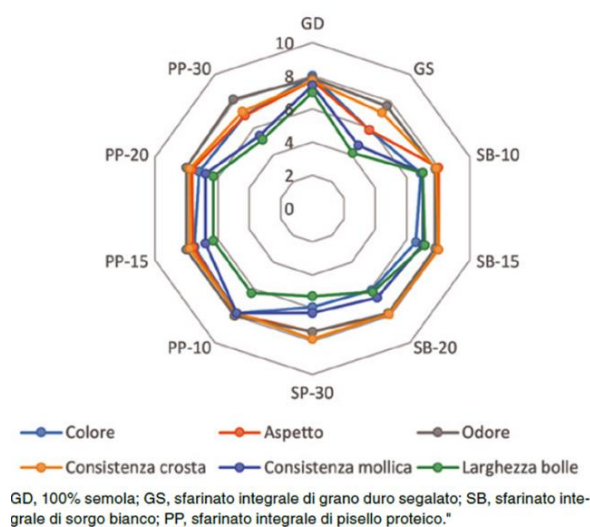
Differenti lettere indicano una differenza significativa ( $p \leq 0,001$ ), secondo l'ANOVA, seguita dal test di Tukey.



GD, 100% semola rimacinata; GS, sfarinato integrale di grano duro segalato; SB, sfarinato integrale di sorgo bianco; PP, sfarinato integrale di pisello proteico.  
 I dati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard.  
 Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative (test di Tukey,  $p \leq 0,01$ ).

**Figura 1.** Rapporto tra fibra dietetica totale ed indice glicemico sulle differenti formulazioni di pani.

La Figura 1 riporta l'effetto delle diverse formulazioni dei pani sul contenuto in fibra e sull'indice glicemico in vitro. La fibra è risultata più elevata nel pane prodotto con GS, rispetto al pane controllo (GD). L'aggiunta di PP, a diverse percentuali di integrazione, ha comportato anche un incremento di fibre, soprattutto alle percentuali di integrazioni più elevate (20%, 30%). Lo stesso trend è stato ottenuto con l'aggiunta di SB. In particolare, il pane prodotto con PP-30 ha presentato valori di fibra quasi doppi rispetto al pane controllo.



**Figura 2.** Analisi sensoriale dei pani ottenuti con le diverse formulazioni d'impasto (dati presentati come media  $\pm$  deviazione standard).

Dal punto di vista sensoriale (Fig. 2), rispetto al pane controllo (GD 100%), il pane GS ha presentato una valutazione complessiva più scarsa, in termini di colore, aspetto e consistenza della mollica, oltre che di dimensioni degli alveoli. Ciò è dovuto, verosimilmente, all'elevato contenuto in fibra di GS, che ha interferito con la già debole maglia glutinica a scapito della qualità panificatoria. Per quanto riguarda l'integrazione con PP, i pani ottenuti sono stati quelli con caratteristiche più simili al controllo (GD), ad eccezione di alcuni attributi per i pani di pisello proteico al 30% (consistenza della mollica e dimensione degli alveoli).

I dati riportati nel presente studio hanno dimostrato che è possibile ottenere pani biofortificati di semola rimacinata di grano duro mediante l'integrazione con sfarinati integrali di cereali minori e legumi. Tra i pani fortificati, quelli con pisello proteico ad elevata percentuale d'integrazione presentano le migliori caratteristiche salutistiche, soprattutto in termini di indice glicemico. Inoltre, questi pani sono risultati migliori in termini di accettabilità sensoriale e di colore della mollica. Ulteriori indagini durante il processo di cottura sugli effetti delle interazioni fibre-proteine-amido, e quindi anche fra glutine e zuccheri fermentescibili, sulle *performance* dei prodotti finiti e sui meccanismi associati ai cambiamenti nella struttura di questi componenti, sono fortemente auspicabili in quanto di particolare interesse.

### **Bibliografia**

- Goni I., Garcia-Alonso A., Saura-Calixto F. 1997. A starch hydrolysis procedure to estimate glycaemic index. *Nutrition Research*, 17: 427-437.
- Ficco D.B.M., Muccilli S., Padalino L., Giannone V., Lecce L., Giovanniello V., Del Nobile M.A., De Vita P., Spina A. 2018. Durum wheat breads 'high in fibre' and with reduced glycaemic response obtained by partial semolina replacement with minor cereals and pulses. *Journal of Food Science and Technology* 55(11): 4458-4467.
- Ficco D.B.M., Muccilli S., Padalino L., Giannone V., Lecce L., Giovanniello V., Del Nobile M.A., De Vita P., Spina A. 2019. Pani fortificati di grano duro con aggiunta di cereali minori e pisello proteico. *Tecnica Molitoria* vol. LXX, 4: 46-62.
- Previtali M.A., Mastromatteo M., De Vita P., Ficco D.B.M., Conte A., et al. 2014. Effect of the lentil flour and hydrocolloids on baking characteristics of wholemeal durum wheat bread. *International Journal Food Science and Technology*, 49: 2382-2390.
- Wolter A., Hager A.S., Zannini E., Arendt E.K. 2013. In-vitro starch digestibility and predicted glycaemic indexes of buckwheat, oat, quinoa, sorghum, teff and commercial gluten-free bread. *Journal of Cereal Science*, 58(3): 431-436.



## **Valutazione qualitativa e nutrizionale di pani funzionali, arricchiti con estratti essiccati di *Portulaca oleracea* L. e *Opuntia ficus indica* Mill.**

F. Sciacca<sup>\*</sup>, N. Virzì<sup>1</sup>, M. Palumbo<sup>1</sup>, S. Licciardello<sup>1</sup>, A. Pesce<sup>1</sup>, E. Li Puma<sup>1</sup>, A. Leonardi<sup>1</sup>, V. Di Stefano<sup>2</sup>, M. G. Melilli<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di Ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali (CREA-CI), Laboratorio di Acireale - Corso Savoia, 190, 95024 Acireale (CT).

<sup>2</sup>Università degli Studi di Palermo, Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, STEBICEF, Viale delle Scienze, Ed. 16, 90128 Palermo (PA)

<sup>3</sup>Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR). Istituto per la BioEconomia, Sede Secondaria di Catania - Via Paolo Gaifami, 18 -95126 Catania (CT).

\*E-mail: [fabiola.sciacca@crea.gov.it](mailto:fabiola.sciacca@crea.gov.it)

### **Abstract**

In recent decades there has been a growing interest from consumers and the world of research for good nutrition, with a consequent increase in the consumption of functional foods. Addition of functional ingredients to breads could have effects on preventing cardiovascular diseases, cancers and inflammation. The aim of this work was to evaluate the technological, nutritional and sensory characteristics of functional breads, made with durum wheat semolina and the addition of dried extracts of *Portulaca oleracea* L. and *Opuntia ficus-indica* Mill. Three formulations of mixtures have been developed: at 5-10-15%. The content of fatty acids present in bread enriched with purslane was higher in the 5% mixture. In fact, contrary to what was expected, the increase in the replacement percentage to 10 and 15% did not lead to an increase in linoleic acid and  $\alpha$ -linolenic. The total content of phenols and the antioxidant potential are instead increased in relation to the increase in the substitution with purslane. The enrichment of durum wheat semolina with 5% purslane was the best compromise for obtaining breads with a reduced  $\omega$ -6 / $\omega$ -3 ratio and good antioxidant properties. Regarding the breads enriched with *Opuntia cladodes*, the 10% formulation resulted in an increase in the total phenol content and good rheological characteristics of the breads, with a positive evaluation in the panel test.

### **Riassunto**

Negli ultimi decenni, è stato registrato un interesse crescente da parte dei consumatori e del mondo della ricerca per una buona alimentazione, con conseguente incremento del consumo di alimenti funzionali. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare le caratteristiche tecnologiche, nutrizionali e sensoriali di pani funzionali, realizzati con semole di frumento duro e aggiunta di estratti essiccati di *Portulaca oleracea* L. e di *Opuntia ficus-indica* Mill. Sono state messe punto tre formulazioni di miscele: al 5-10-15% di integrazione. Il contenuto di acidi grassi presenti nel pane arricchito con portulaca è risultato più elevato nella miscela al 5%. Infatti, contrariamente a quanto previsto, l'aumento della percentuale di sostituzione al 10 e al 15% non ha comportato un aumento dell'acido linoleico e  $\alpha$ -linolenico. Il contenuto totale di fenoli e il potenziale antiossidante sono invece aumentati in relazione all'incremento della sostituzione con portulaca. L'arricchimento della semola di grano duro con il 5% di portulaca ha rappresentato il miglior compromesso per ottenere pani con ridotto rapporto  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 e buone proprietà antiossidanti. Relativamente ai pani arricchiti con cladodi di *Opuntia*, la formulazione al 10% ha comportato un aumento del contenuto di fenoli totali e buone caratteristiche reologiche dei pani, con una valutazione ampiamente positiva al panel test.

## Introduzione

L'alimento funzionale può essere un qualsiasi alimento consumato nell'ambito di una dieta abituale che, al di là delle funzioni nutrizionali di base, migliora le condizioni generali dell'organismo e può essere utilizzato anche per la cura di alcune malattie (Padalino *et al.*, 2017). Il cibo funzionale può essere un "alimento naturale" non modificato o un alimento sviluppato aggiungendo, modificando o rimuovendo un componente dal cibo (Gaudette & Pickering, 2013). Negli ultimi decenni, diversi gruppi di ricerca hanno inseguito l'obiettivo di incorporare ingredienti bioattivi in alimenti comunemente consumati, come il pane e la pasta. Il pane è l'alimento base della dieta mediterranea e viene consumato e apprezzato, nei paesi di tutto il mondo. Inoltre, a causa del suo costo relativamente basso, della disponibilità, dell'accettabilità e del consumo diffuso, il pane viene considerato uno dei migliori veicoli per la fortificazione, l'integrazione e/o l'arricchimento degli alimenti (Dziki, Rózyło, Gawlik-Dziki e Świeca, 2014). La *Portulaca oleracea* L. è ampiamente diffusa in molte parti del mondo e in particolare nelle aree tropicali e subtropicali. Nelle regioni mediterranee, le parti aeree della pianta vengono consumate come ortaggi e ricercatori e nutrizionisti di tutto il mondo hanno studiato questa pianta, per i suoi effetti benefici (Melilli *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2015). Grazie alle proprietà antiossidanti, agisce principalmente come *scavenger* di radicali liberi e, inoltre, i suoi costituenti fenolici e i numerosi acidi grassi presenti favoriscono, tra l'altro, la funzione cardiovascolare. L'*Opuntia ficus-indica* Mill., nota anche come fico d'India, fa parte della famiglia delle Cactaceae. Le origini sono dell'America Centrale e delle zone desertiche, ma il suo habitat naturale è anche il bacino del Mediterraneo. Recentemente, molti dati di letteratura hanno evidenziato la possibilità di utilizzare le parti aeree dei fichi d'India come fonti di fitofarmaci ad attività biologica e ad alto valore aggiunto, per l'industria alimentare e nutraceutica. In questo studio, è stato valutato l'effetto dell'integrazione di diverse percentuali di estratti essiccati di *Portulaca oleracea* e di *Opuntia, ficus indica* sulla qualità tecnologica, sensoriale e nutrizionale di pani di grano duro fortificati.

## Materiali e metodi

La semola di frumento duro, utilizzata per la realizzazione dei pani fortificati, è di tipo commerciale. Il germoplasma di portulaca è stato raccolto in tre diversi siti della Sicilia orientale: Caltagirone ("Cal"), Cassibile ("Cas") e Santa Venerina ("SVen"). Il germoplasma di Opuntia, invece, è stato raccolto nei siti di Caltagirone ("Cal"), Siracusa ("Syr") e Sortino ("Sor"). Sono state eseguite tre percentuali di integrazioni di estratti essiccati di Portulaca e Opuntia: al 5-10-15%. Nel germoplasma raccolto e nei pani arricchiti, sono stati determinati il contenuto in acidi grassi, il contenuto totale di fenoli ed è stata valutata l'attività antiossidante, attraverso due saggi: ABTS e FRAP. Sugli impasti, sono stati determinati gli indici alveografici (Alveografo di Choipin, metodo UNI n° 10453), gli indici farinografici (Farinografo di Brabender, metodo AACC n° 54-21), gli indici colorimetrici (Colorimetro Minolta, spazio colorimetrico CIE L\*, a\*, b\*). Sono stati eseguiti il test di panificazione sperimentale e un test di tipo artigianale. I campioni di pane sono stati sottoposti a un gruppo di dieci assaggiatori formati, al fine di valutarne le caratteristiche sensoriali.

## Risultati e discussioni

Per quanto riguarda i pani ottenuti con integrazione di Portulaca, i risultati delle analisi alveografiche hanno mostrato quanto una sostituzione parziale (dal 5 al 10%) della semola di grano duro induca variazioni significative sugli indici alveografici W e P/L, i cui valori variano, all'aumentare delle percentuali di sostituzione (Tab. 1).

**Tabella 1.** Indici alveografici e farinografici di impasti arricchiti con Portulaca.

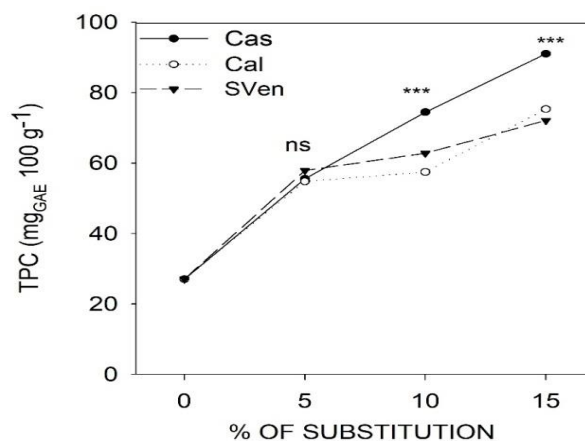
Tesi	Indici alveografici		Indici farinografici		
	W (10 <sup>-4</sup> J)	P/L	Assorbimento idrico (%)	Tempo di sviluppo (min)	Stabilità (min)
<b>CTRL</b>	135	3.58	62.90	2.00	4.20
<b>5</b>	67	10.15	64.40	2.57	6.13
<b>10</b>	58	10.48	65.70	4.43	9.47
<b>15</b>	-	-	67.63	7.50	16.90

In particolare, è stato osservato una diminuzione dei valori di W e un aumento del rapporto P/L, a dimostrazione dell'ottenimento di un impasto meno estensibile. Al 15% di integrazione, non è stato possibile determinare gli indici alveografici, per il mancato sviluppo dell'impasto. In riferimento all'analisi farinografica, il valore di tutti gli indici è aumentato all'aumentare delle percentuali di sostituzione. Per quanto riguarda gli indici colorimetrici, sono state osservate differenze statisticamente significative, in relazione alla percentuale di sostituzione, sia per la crosta che per la mollica: infatti, all'aumentare delle integrazioni, entrambe sono risultate più scure. Anche per quanto riguarda la presenza di acidi grassi nel pane, il contenuto in acido oleico, acido linoleico e acido linolenico è risultato fortemente influenzato dalla percentuale di sostituzione. In particolare, il campione Cas 10 ha mostrato i valori più elevati (Tab. 2).

**Tabella 2.** Contenuto in acidi grassi in pani arricchiti con Portulaca.

	CTRL	Cal5	Cal10	Cal15	Cas 5	Cas10	Cas15	SVen5	SVen10	SVen15
Acido oleico	38.5	35.5	30.6	26.2	56.9	40.0	24.1	41.4	32.9	28.2
Acido linoleico	132.3	119.3	104.3	90.3	203.0	141.1	83.6	143.8	115.1	93.7
Acido $\alpha$ -linolenico	8.4	13.2	9.3	10.5	16.6	13.0	7.7	13.1	9.5	9.9
Acidi grassi saturi	221.2	209.0	179.2	159.5	341.5	241.5	144.6	246.8	196.0	166.9
Acidi grassi polinsaturi	140.7	132.5	113.6	100.8	219.6	154.1	91.3	156.9	124.6	103.6
$\omega$ -6/ $\omega$ -3	15.7	9.0	11.2	8.6	12.2	10.9	10.9	10.9	12.1	9.4

Per quanto riguarda il rapporto  $\omega$ 6/ $\omega$ 3, che nel CTRL era di 15,7 mg g<sup>-1</sup>, ne è stata osservata una diminuzione in tutti i campioni. Al contrario, il contenuto totale di fenoli di (TPC), è aumentato con l'aumentare della percentuale di sostituzione. In particolare, già al 5% di sostituzione, il contenuto di TPC è risultato già raddoppiato (Fig. 1).



**Figura 1.** Contenuto totale dei fenoli

Considerando i risultati delle proprietà sensoriali dei pani fortificati, le proprietà antiossidanti, in termini di FRAP e ABTS, sono stati analizzati fino al 10% di sostituzione. Entrambi i test hanno evidenziato la capacità della *Portulaca* di aumentare il potenziale antiossidante dei campioni arricchiti rispetto al CTRL. Per quanto riguarda l'integrazione con *Opuntia*, la diversa origine dei cladodi e la progressiva percentuale di sostituzione hanno influenzato i parametri alveografici e in particolare il P/L, con conseguente proporzionale aumento dei suoi valori. Riguardo gli indici farinografici, il livello di sostituzione al 15% ha mostrato un maggiore aumento di tutti i parametri, in particolare la stabilità. Anche gli indici colorimetrici sono stati influenzati sia dall'origine dei cladodi che dai livelli di sostituzione e sono state osservate differenze statisticamente significative, in relazione alla percentuale di sostituzione, sia per la crosta che per la mollica. L'analisi sensoriale effettuata sui campioni di pane ha consentito di verificare una friabilità e morbidezza, che si mantengono fino ad una sostituzione del 10%. È stato rappresentato il giudizio globale dei pani con sostituzione, nelle tre diverse concentrazioni. Tra i pani arricchiti, i risultati mostrano il migliore apprezzamento per i pani con il 5% di sostituzione (Fig. 2).



**Figura 2.** Pani arricchiti con *Opuntia*

Anche per i pani arricchiti con *Opuntia*, il contenuto totale dei fenoli (TPC) è aumentato, all'aumentare della percentuale di sostituzione.

Dai risultati ottenuti nel corso della sperimentazione, è stato possibile osservare che la fortificazione della semola di frumento duro con integrazione di estratti essiccati di *Portulaca oleracea* e di *Opuntia ficus indica* Mill. ha portato allo sviluppo di prodotti, con buone proprietà antiossidanti, un più basso rapporto  $\omega$ -6/  $\omega$ -3 e un migliore contenuto di acidi grassi. Nelle

percentuali di integrazione al 5 e al 10%, inoltre, sono state mantenute anche le caratteristiche tecnologiche e sensoriali dei pani. I risultati ottenuti rappresentano un utile contributo per lo sviluppo di un prodotto, che potrebbe potenzialmente fornire benefici per la salute dei consumatori.

### **Bibliografia**

- Dziki D., Rózyło R., Gawlik-Dziki U., Swieca M. 2014. Current trends in the enhancement of antioxidant activity of wheat bread by the addition of plant materials rich in phenolic compounds. *Trends Food Sci. Technol.*, 40: 48–61.
- Gaudette N.J., Pickering G.J. 2013. Modifying Bitterness in Functional Food Systems. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 53: 464–481.
- Melilli M., Sillitti C., Conte A., Padalino L., Del Nobile M., Bognanni R., Pagliaro A. 2019. Quality characteristics of cereal-based foods enriched with quinoa and inulin. In *Quinoa: Cultivation, Nutritional Properties and Effects on Health*. Peiretti P.G., Gai F., Eds., Nova: Annandale, VA, USA, p. 328.
- Padalino L., Costa C., Conte A., Melilli M.G., Sillitti C., Bognanni R., Raccuia S.A., Del Nobile M.A. 2017. The quality of functional whole-meal durum wheat spaghetti as affected by inulin polymerization degree. *Carbohydr. Polym.*, 173: 84-90.
- Zhou Y.X., Xin H.L., Rahman K., Wang S.J., Peng C., Zhang H. 2015. *Portulaca oleracea* L.: A review of phytochemistry and pharmacological effects. *Biomed Res. Int.* 2015.

## **Pane da farine composite di frumento e pannello di canapa (*Cannabis sativa* subsp. *sativa*): un'opportunità qualitativa?**

E. Carini<sup>1\*</sup>, A. Di Fazio<sup>1</sup>, L. Del Vecchio<sup>1</sup>, M. Chiodetti<sup>1</sup>, M. Cirlini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Università Degli Studi di Parma, Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco, Università di Parma, Parco Area delle Scienze, 48/A, 43124 Parma (PR).

\*E-mail: [eleonora.carini@unipr.it](mailto:eleonora.carini@unipr.it)

### **Abstract**

Hemp (*Cannabis sativa* L.) is a versatile plant due to different derivate products which can be used in several industrial sectors. In particular, hemp flour can be used in human and animal nutrition due to its interesting macro and micronutrients composition. Scientific information about the use of hemp flour to improve the nutritional profile of a staple food such as bread, is still lacking.

Therefore, the objective of this work was studying the effect of the inclusion of hemp flour (using three % levels) on chemical, physico-chemical and sensory properties of bread during 7 days of storage. Breads were characterized for specific volume and crumb grain, color, texture, water status, retrograded amylopectin, volatile profile and sensory acceptability. Results showed that the use of hemp flour in bread formulation may potentially increase the nutritional profile of the final product. Furthermore, hemp flour could be advantageous from a technological point of view when used at an inclusion level between 10 and 15%, based on the property considered.

### **Riassunto**

La canapa (*Cannabis sativa* L.) è una pianta molto versatile per la varietà di prodotti che ne possono derivare, utilizzabili in diversi ambiti industriali. In particolare, la farina di pannello di canapa può essere utilizzata nell'alimentazione umana e animale per la sua interessante composizione in macro e micronutrienti. Scarse sono le informazioni presenti in letteratura riguardanti l'utilizzo della farina di pannello di canapa per il miglioramento nutrizionale di un prodotto di largo consumo come il pane.

L'obiettivo di questo lavoro è stato dunque quello di studiare l'effetto di tre livelli di inclusione di farina di pannello di canapa nella formulazione di pane, sulle proprietà chimiche, chimico-fisiche e sensoriali, durante un periodo di conservazione di 7 giorni. I pani prodotti sono stati analizzati per volume specifico e sviluppo dell'alveolatura, consistenza, colore, stato dell'acqua, retrogradazione dell'amilopectina, componente volatile e accettabilità sensoriale. I risultati ottenuti hanno mostrato come l'utilizzo di farina di pannello di canapa nel pane possa potenzialmente rappresentare un'opportunità di miglioramento nutrizionale; inoltre, dal punto di vista tecnologico, essa può essere vantaggiosa se utilizzata ad un livello di inclusione del 10-15%, a seconda delle proprietà considerate.

### **Introduzione**

La canapa (*Cannabis sativa* subsp. *sativa*) è una pianta erbacea annuale, utilizzata a fini tessili nell'Asia Centrale fin dal 2700 a.C. circa. Questa coltura rimase in uso anche in Europa fino agli anni '70, in cui poi venne sostituita da fibre naturali più economiche e da altre sintetiche (Bacci *et al.*, 2007). La coltivazione della canapa venne poi reintrodotta in Italia nel 2013; la sua produzione, commercializzazione e utilizzo per scopi industriali sono state regolamentate dalla L. 242/2016.

I semi rappresentano dei prodotti secondari che, grazie alle loro caratteristiche in macro e microcomponenti, possono essere impiegati sia in ambito alimentare che nella mangimistica (Farinon *et al.*, 2020). Dalla pressatura del seme e successiva separazione dell'olio, si ottiene la farina del pannello esausto di estrazione o più semplicemente farina di canapa, che può essere impiegata come ingrediente strategico per il miglioramento del profilo nutrizionale degli alimenti. La farina di canapa, infatti, oltre a conservare ancora parte dei lipidi (~9%) con un buon rapporto

$\omega 6/\omega 3$ , presenta un elevato contenuto proteico (~26%) e di fibra (~20%) e diversi composti fitochimici afferenti alla classe dei flavonoidi (tra cui fitosteroli) (Farinon *et al.*, 2020).

Recentemente, nell'ottica dell'attuazione di strategie volte ad accelerare la transizione ecologica, l'interesse verso queste materie prime è cresciuto. Infatti, il loro utilizzo in alimenti ad elevata frequenza di consumo come il pane e altri prodotti da forno, potrebbe aumentare l'assunzione di composti potenzialmente benefici per la salute umana.

L'obiettivo di questo studio è stato quindi indagare l'effetto dell'inclusione della farina di canapa su proprietà chimiche, chimico-fisiche e sensoriali di pane durante un periodo di conservazione di 7 giorni.

## Materiali e metodi

Sono stati prodotti tre pani sperimentali in cui è stata sostituita la farina di frumento con farina di canapa secondo tre livelli: 10% (H10), 15% (H15) e 25% (H25); questi sono stati confrontati con un pane di controllo (STD). Le formulazioni dei pani sono riportate in Tabella 1.

**Tabella 1.** Formulazione dei pani

Ingrediente	STD [g]	H10 [g]	H15 [g]	H25 [g]
Farina di grano tenero	100	90	85	75
Farina di pannello di canapa	0	10	15	25
Acqua	58	58.5	58.9	59
Olio di semi	3	3	3	3
Saccarosio	4	4	4	4
NaCl	2	2	2	2
Lievito	3	3	3	3

La farina di canapa è stata caratterizzata per i parametri chimico-nutrizionali quali: contenuto in grassi e proteine, presenza di acidi grassi e amminoacidi essenziali, contenuto in polifenoli e attività antiossidante. I pani prodotti sono stati caratterizzati per volume specifico (kg/L), sviluppo dell'alveolatura (% alveoli in diverse classi dimensionali predeterminate e % di area nelle diverse classi dimensionali, con software di analisi d'immagine ImageJ), texture (durezza, coesività e springiness, test TPA al 40% di compressione con Texture Analyzer), colore ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $\Delta E$  con colorimetro Minolta 2600d), attività dell'acqua ( $a_w$ , Aqualab 4TE a 25°C su crosta e mollica), contenuto d'acqua (g acqua/100 g prodotto, essiccamento in stufa a 105°C fino a peso costante su crosta e mollica), % di acqua congelabile (FW, g acqua congelabile/100 g acqua attraverso analisi termica con DSC Q100, scansione da -80° C a 130° C a 5° C/min, picco da -20° C a 15° C), amilopectina retrogradata (J/g amido, DSC Q100, scansione da -80° C a 130° C a 5° C/min, picco da 50° C a 90° C), componente volatile (HS-SPME/GC-MS) e accettabilità sensoriale (60 rispondenti, attributi: colore, aspetto generale, odore, gusto, consistenza e accettabilità complessiva). Tra questi, i parametri di caratterizzazione dello stato dell'acqua, di amilopectina retrogradata e di texture sono stati studiati in un periodo di conservazione di 7 giorni. I dati sono stati elaborati tramite analisi statistica utilizzando il software SPSS 20.0. Per i dati omoschedastici è stata eseguita l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test post-hoc LSD (livello di significatività  $\alpha = 0.05$ ). Per i dati eteroschedastici è stato eseguito il Welch's ANOVA test seguito dal Games-Howell (livello di significatività  $\alpha = 0.05$ ). Inoltre, sono state eseguite due analisi multivariate (Analisi delle Componenti Principali, PCA) usando il software SIMCA 16.0.1. In particolare, nella prima sono state utilizzate le osservazioni ottenute dall'analisi della

componente volatile e nella seconda tutti i parametri chimico-fisici e le concentrazioni normalizzate delle classi odorose misurate nel pane fresco.

### Risultati e discussione

La farina di canapa era caratterizzata dalla presenza di ~25.8% (g/100g) di proteine e ~9.0% (g/100g) di grassi. Una caratterizzazione più approfondita di queste frazioni ha evidenziato la presenza di amminoacidi essenziali come lisina, limitante nel frumento, e acidi grassi essenziali con un rapporto  $\omega 6/\omega 3$  particolarmente favorevole, pari a 2.67, e un discreto quantitativo in fitosteroli, primo fra tutti il  $\beta$ -sitosterolo. Inoltre, la farina di canapa è stata caratterizzata anche in termini di contenuto in polifenoli totali e attività antiossidante, ottenendo concentrazioni di  $866,72 \pm 30,24$  mg GAE/kg e di  $10,34 \pm 0,60$  mg TEAC/g, rispettivamente.

Il volume specifico del pane fresco è risultato essere significativamente maggiore in H10 ( $4.100 \pm 0.155$  L/kg) e in H15 ( $3.820 \pm 0.189$  L/kg) rispetto al controllo ( $3.416 \pm 0.128$  L/kg). Il campione H25, invece, è risultato essere quello a volume specifico inferiore rispetto a tutti gli altri ( $3.1491 \pm 0.0831$  L/kg). Il volume specifico è relazionato allo sviluppo dell'alveolatura, infatti H10 e H15 hanno mostrato una maggiore % di area occupata da alveoli a classe dimensionale elevata ( $> 10$  mm<sup>2</sup>), rispettivamente ~31% e ~30%, se paragonati ai campioni STD (~16%) e H25 (~9%).

Anche per la durezza, i campioni di pane fresco H10 e H15 hanno fatto registrare valori inferiori rispetto a STD e H25 (Tab. 2). La durezza è aumentata in tutti i campioni nel tempo, ma non allo stesso modo. Infatti, il campione con un maggior incremento di durezza, è stato STD (~231%); il campione H25, invece, è stato quello con un minore incremento (~71%).

**Tabella 2.** Durezza, springiness e coesività dei pani ai diversi giorni di conservazione.

		Giorno 0	Giorno 2	Giorno 5	Giorno 7
<b>DUREZZA</b> [N]	STD	$2.70 \pm 0.90$ b,C	$5.67 \pm 1.97$ a,B	$7.94 \pm 2.19$ a,A	$8.95 \pm 2.26$ a,A
	H10	$1.80 \pm 0.87$ c,C	$3.05 \pm 0.73$ b,B	$4.42 \pm 1.25$ b,A	$3.85 \pm 1.38$ c,A
	H15	$2.16 \pm 0.78$ bc,C	$3.02 \pm 1.11$ b,B	$5.21 \pm 2.00$ b,A	$6.57 \pm 2.37$ b,A
	H25	$4.73 \pm 1.33$ a,B	$5.56 \pm 1.46$ a,B	$7.43 \pm 2.38$ a,A	$8.08 \pm 2.36$ ab,A
	STD	$0.72 \pm 0.02$ b,A	$0.57 \pm 0.03$ b,B	$0.51 \pm 0.03$ ab,C	$0.47 \pm 0.03$ a,D
<b>SPRINGINESS</b> [-]	H10	$0.76 \pm 0.03$ a,A	$0.59 \pm 0.04$ b,B	$0.48 \pm 0.05$ b,C	$0.48 \pm 0.04$ a,C
	H15	$0.70 \pm 0.03$ b,A	$0.61 \pm 0.04$ a,B	$0.48 \pm 0.05$ b,C	$0.48 \pm 0.05$ a,C
	H25	$0.71 \pm 0.02$ b,A	$0.58 \pm 0.04$ b,B	$0.52 \pm 0.03$ a,C	$0.49 \pm 0.04$ a,D
	STD	$0.97 \pm 0.00$ a,A	$0.93 \pm 0.01$ bc,B	$0.93 \pm 0.01$ a,B	$0.93 \pm 0.01$ a,B
<b>COESIVITA'</b> [-]	H10	$0.96 \pm 0.01$ bc,A	$0.94 \pm 0.01$ b,B	$0.92 \pm 0.02$ ab,C	$0.91 \pm 0.02$ a,C
	H15	$0.96 \pm 0.02$ ab,A	$0.95 \pm 0.02$ a,B	$0.90 \pm 0.02$ bc,C	$0.90 \pm 0.03$ b,C
	H25	$0.95 \pm 0.01$ c,A	$0.93 \pm 0.02$ c,B	$0.89 \pm 0.02$ c,C	$0.89 \pm 0.02$ c,D
	STD	$0.97 \pm 0.00$ a,A	$0.93 \pm 0.01$ bc,B	$0.93 \pm 0.01$ a,B	$0.93 \pm 0.01$ a,B

Lettere minuscole nella stessa colonna (effetto della formulazione) e lettere maiuscole diverse nella stessa riga (effetto del tempo) indicano differenze significative per  $p < 0.05$ .

La farina di pannello di canapa ha quindi ridotto la durezza della mollica nel prodotto fresco e diminuito l'incremento di durezza nel tempo. Già diversi autori, riportando gli stessi effetti di miglioramento, avevano attribuito il beneficio all'effetto della componente lipidica addizionale veicolata dalla canapa (Kandrokov *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2011).



All'aumentare del livello di inclusione di farina di canapa, è stata osservata una riduzione della coesività che potrebbe essere spiegata da un effetto di diluizione sul glutine. Queste differenze sono state amplificate con l'aumentare dei giorni di conservazione.

I campioni di mollica di pane contenente farina di canapa sono risultati più scuri (diminuzione di  $L^*$ , aumento di  $a^*$  e diminuzione di  $b^*$ ), se paragonati al controllo. La differenza totale di colore ( $\Delta E > 3$ ) tra pani H10, H15 e H25 rispetto a STD, è aumentata all'aumentare della % di sostituzione nel pane. Per ciò che concerne lo stato dell'acqua, i componenti della farina di canapa hanno influenzato  $a_w$  e FW. L' $a_w$  della mollica del pane fresco, è risultata significativamente maggiore nei pani sperimentali se confrontati con STD. Ciò ha permesso di accelerare la cinetica di migrazione dell'acqua tra la fase a maggiore  $a_w$  (mollica) e la fase a minore  $a_w$  (crosta), nel tempo. Infatti, i pani sperimentali, hanno raggiunto un plateau di equilibrio precocemente rispetto al controllo. Il parametro FW è stato osservato significativamente maggiore solo per H15 e H25; H10 invece ha mostrato valori inferiori al controllo. Il cambiamento di tali parametri di studio dello stato dell'acqua è funzione del diverso modo in cui questa interagisce con i componenti della matrice. In particolare, la presumibile riduzione del contenuto di amido e di glutine, e l'aumento del contenuto proteico e di fibra nei pani sperimentali, hanno probabilmente contribuito in diverso modo al cambiamento dello stato dell'acqua a livello macroscopico e mesoscopico nei pani contenenti farina di canapa.

Nel pane fresco, le transizioni legate all'amido hanno suggerito che parte della frazione gelatinizzabile non aveva subito gelatinizzazione durante la cottura. In particolare, i campioni H15 e H25 hanno mostrato entalpie di gelatinizzazione minori rispetto a H10 e STD, lasciando ipotizzare un ruolo della farina di canapa nel favorire la gelatinizzazione. La ragione è probabilmente da ricercare nel diverso stato dell'acqua dei vari campioni (Ratnayake e Jackson, 2008). Un maggior contenuto di acqua libera data dalla diluizione del glutine, infatti, potrebbe aver agevolato l'accesso dell'acqua ai granuli di amido, agevolando la gelatinizzazione.

Durante la conservazione, le transizioni dell'amido sono associabili all'entalpia di fusione dei cristalli di amilopectina retrogradata. In tutti i campioni è stato osservato un aumento di questo parametro nel tempo, come atteso. A parità di tempo di conservazione non si è tuttavia riscontrata una tendenza dovuta all'effetto della formulazione; dopo 7 giorni di conservazione, i pani sperimentali hanno mostrato una ricristallizzazione dell'amilopectina significativamente maggiore rispetto al pane STD. Il maggiore contenuto di cristalli di amilopectina non ha comunque peggiorato la consistenza della mollica dei pani sperimentali che, come già ribadito, hanno fatto registrare valori di durezza della mollica inferiori al controllo. Il profilo della componente volatile dei pani sperimentali è risultato essere più ricco di componenti esogene apportate dalla farina di pannello di canapa (citrale, umulene, 1-pentanololo, 2-nononale, 1-esanololo, 1-otten-3-olo, esanale), originate sia da metabolismi secondari della pianta che dall'ossidazione radicalica dell'acido linoleico (Shen *et al.*, 2020), principale acido grasso del seme. Tuttavia, la concentrazione di queste componenti nel prodotto finito è risultata inferiore rispetto a quella delle componenti volatili originate durante le fasi di impastamento (ossidazione lipidica, *es.* nonanale, esanale), lievitazione (fermentazione, *es.* etanololo, 3-metil-1-butanolo) e cottura del pane (reazioni termiche, *es.* 2,3-dimetilpirazina, 2-etil-6-metilpirazina) (Birch *et al.*, 2014), lasciando supporre che il massivo apporto di quest'ultime, potesse mascherare le note olfattive erbacee e pungenti tipiche di alcune molecole che caratterizzano la farina di canapa. Oltretutto, la concentrazione di esanale, marker di ossidazione lipidica che contribuisce a determinare la sgradevole sensazione di rancido (Shahidi e Pegg, 1994), non è risultata significativamente diversa tra i campioni. Dalla valutazione sensoriale, è emerso che tutti i campioni, compreso il controllo, non hanno mostrato punteggi significativamente diversi per l'odore, confermando quanto precedentemente ipotizzato. Per colore, aspetto generale, sapore, consistenza, accettabilità complessiva, i campioni di pane sperimentale hanno ricevuto valutazioni più basse rispetto a STD, ma mai al di sotto della soglia di accettabilità (punteggio = 5). Il colore di tutti i campioni di pane sperimentale è stato valutato

allo stesso modo, indicando che il graduale cambiamento di colore non ha influenzato l'accettabilità di tale parametro. Inoltre, il sapore dei pani sperimentali, nonostante abbia fatto registrare punteggi positivi, è stato descritto dai valutatori tramite una sensazione di amaro che permaneva dopo la deglutizione.

In conclusione, si può affermare che, il cambiamento delle caratteristiche considerate non è sempre stato proporzionale al grado di sostituzione della farina, ed inoltre, non è risultato influire sempre negativamente sulle proprietà tecnologiche del pane. La valutazione di tutti i parametri suggerisce che un grado di inclusione compreso tra il 10 e il 15%, possa essere quello che, al netto dei miglioramenti e delle riduzioni di qualità percepite dai valutatori, possa rappresentare un buon compromesso per l'accettabilità. Inoltre, la farina di pannello di canapa potrebbe rappresentare una strategia utile per migliorare il profilo nutrizionale non solo di pane convenzionale, ma anche di pane ottenuto con preparati senza glutine, di cui spesso la qualità nutrizionale non è elevata e quella tecnologica è faticosamente perseguita per mezzo di additivi. In questo modo sarà possibile offrire opportunità di mercato ad un prodotto secondario della canapa le cui applicazioni in ambito alimentare, ad oggi, risultano ancora ridotte.

### **Ringraziamenti**

Gli autori ringraziano Open Fields Srl per il coinvolgimento all'interno del progetto denominato "CATERPILLAR", finanziato dalla regione Emilia-Romagna, il cui obiettivo è quello di valorizzare i prodotti secondari della filiera della canapa tessile.

### **Bibliografia**

- Birch A.N., Petersen M.A., Hansen Å.S. 2014. Aroma of wheat bread crumb. *Cereal Chemistry*, 91(2): pp. 105-114.
- Fadda C., Sanguinetti A.M., Del Caro A., Collar C., Piga A. 2014. Bread staling: Updating the view. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4): 473-492.
- Farinon B., Molinari R., Costantini L., Merendino N. 2020. The seed of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.): Nutritional quality and potential functionality for human health and nutrition. *Nutrients*, 12(7): 1935.
- Legge 2 dicembre 2016, n. 242 Disposizioni per la promozione della coltivazione e della filiera agroindustriale della canapa.
- Ratnayake W.S., Jackson D.S. 2008. Starch gelatinization. *Advances in food and nutrition research*, 55: 221-268.
- Shahidi F., Pegg R.B. 1994. Hexanal as an indicator of meat flavor deterioration. *Journal of Food Lipids*, 1(3): 177-186.
- Shen P., Gao Z., Xu M., Ohm J.B., Rao J., Chen B. 2020. The impact of hempseed dehulling on chemical composition, structure properties and aromatic profile of hemp protein isolate. *Food hydrocolloids*, 106: 105889.
- Kandrokov R.K., Labutina N.V., Begeulov M.S., Taranova E.S., Bykov A.V. 2021. Technological properties of triticale-hemp flour. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 640, No. 2, p. 022035). IOP Publishing.
- Wang Y.Y., Norajit K., Ryu G.H. 2011. Influence of extruded hemp-rice flour addition on the physical properties of wheat bread. *Preventive Nutrition and Food Science*, 16(1): 62-66.

## **Paste funzionali da processi tecnologici innovativi e materiali di scarto di origine vegetale**

*L. Gazza<sup>1\*</sup>, F. Nocente<sup>1</sup>, F. Taddei<sup>1</sup>, E. Galassi<sup>1</sup>, R. Ciccoritti<sup>2</sup>, M. Durante<sup>3</sup>, M. S. Lenucci<sup>4</sup>*

<sup>1</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari (CREA-IT), Via Manziana 30, 00189 Roma (RM).

<sup>2</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura (CREA-OFA), Via di Fioranello 52, 00134 Roma (RM).

<sup>3</sup>CNR-ISPA, Prov.le Lecce-Monteroni, 73100 Lecce (LE).

<sup>4</sup>DiSTeBA, Università del Salento, Prov.le Lecce-Monteroni, 73100 Lecce (LE).

\*E-mail: [laura.gazza@crea.gov.it](mailto:laura.gazza@crea.gov.it)

### **Abstract**

Pasta represents an optimal means of conveying healthy and functional compounds. In particular, the wholemeal pasta sector is gaining increasing attention, although its consumption is still below current dietary recommendations. This is also due to the negative effects of the bran parts on the rheology and on the technological and sensorial quality of the food products. The innovative technological process proposed in this research, subject of an industrial patent, makes it possible to produce enriched pasta with the exclusive use of durum wheat with a higher content of bioactive compounds, without significant negative effects on the technological quality of the cooked pasta. The reuse of waste generated by the agri-food industry has become one of the most important challenges of food technology, in the frame of circular economy. This study indicated that the addition of micronized brewer spent grain to semolina allows the formulation of pasta with increased nutritional potential because of the higher fiber content and antioxidant capacity. Furthermore, the addition to the dough of an oil extracted by supercritical CO<sub>2</sub> from by-products of pumpkin processing, stabilized by inclusion in  $\alpha$ -cyclodextrin microparticles (cyclodextrinosomes), allowed the preparation of pasta further enriched in lipophilic bioactive compounds with a good balance between functional and sensory quality.

### **Riassunto**

La pasta rappresenta un mezzo ottimale per veicolare composti salutistici e funzionali. In particolare, il settore della pasta integrale sta guadagnando sempre maggiore attenzione pur con consumi ancora al di sotto delle attuali raccomandazioni alimentari. Ciò è dovuto anche agli effetti negativi delle parti cruscali sulla reologia dell'impasto e sulla qualità tecnologica e sensoriale dei prodotti finiti. L'innovativo processo tecnologico proposto in questa ricerca, oggetto di brevetto industriale, permette di produrre pasta arricchita in composti bioattivi con l'uso esclusivo di frumento duro, senza significativi effetti negativi sulla qualità tecnologica della pasta cotta. Il riutilizzo degli scarti generati dall'industria agroalimentare, è diventato una delle sfide più importanti della tecnologia alimentare, nell'ottica di un'economia sostenibile. Questo studio ha indicato che l'aggiunta di trebbie micronizzate alla semola permette la realizzazione di pasta con aumentato potenziale nutrizionale grazie al maggior contenuto in fibre e capacità antiossidante. Inoltre, l'aggiunta all'impasto di un olio estratto mediante CO<sub>2</sub> supercritica da polpa e semi di zucca, stabilizzato mediante inclusione in microparticelle di  $\alpha$ -ciclodestrine (ciclodestrinosomi), ha permesso la preparazione di paste ulteriormente arricchite in composti bioattivi con buon equilibrio tra qualità funzionale e sensoriale.

### **Introduzione**

Numerosi studi epidemiologici hanno dimostrato che il consumo di cereali integrali potrebbe contribuire ad un'adeguata assunzione di composti bioattivi utili a ridurre il rischio dell'insorgere di diverse malattie croniche. Nonostante le numerose evidenze scientifiche, il consumo di cereali

integrali è ancora al di sotto delle attuali raccomandazioni alimentari, a causa degli effetti negativi della crusca sulla reologia dell'impasto e sulle proprietà sensoriali. Attualmente, particolare attenzione viene posta all'esplorazione di nuovi sistemi tecnologici, in grado di preservare i composti bioattivi migliorando al contempo le proprietà nutrizionali e tecnologiche degli sfarinati integrali al fine di offrire al consumatore alimenti sani, senza rinunciare però alla qualità organolettica. Tra questi sistemi, la micronizzazione consente di ottenere uno sfarinato integrale molto fine in cui si preservano i composti bioattivi. Questa tecnologia può essere combinata con la turboseparazione per ottenere frazioni di farina più ricche in composti bioattivi da utilizzare per miscele arricchite (Ciccoritti *et al.*, 2018). Inoltre, trattamenti di pre-macinazione come la decorticazione possono avere un impatto positivo sui prodotti finali, in termini di resa, qualità tecnologica ed igienico-sanitaria. In questo studio, una blanda decorticazione delle cariossidi intere, seguita da micronizzazione e turboseparazione ha permesso di ottenere frazioni di sfarinati da aggiungere alla semola tradizionale per la produzione di pasta naturalmente arricchita di solo frumento duro.

Il riciclo dei sottoprodotti dei processi agroalimentari è attualmente uno dei principali campi d'applicazione dell'economia circolare. Il principale sottoprodotto dell'industria birraria, le trebbie esauste rappresentano circa l'85% dei prodotti di scarto dell'industria brassicola, il cui principale riutilizzo è limitato all'alimentazione animale a causa dell'instabilità microbiologica, e del loro gusto amaro (Mussatto *et al.*, 2006). Lo scopo del presente studio è stato quello di sviluppare una nuova formulazione di pasta secca arricchita in differenti composti bioattivi attraverso il riutilizzo delle trebbie micronizzate, al fine di valorizzare questo materiale di scarto e promuovere una maggiore sostenibilità del processo di produzione della birra. L'estrazione convenzionale di molecole lipofile impiega grandi volumi di solventi organici potenzialmente tossici e dannosi per l'ambiente; al contrario, l'estrazione in CO<sub>2</sub> supercritica (SC-CO<sub>2</sub>) rappresenta un'efficace tecnologia non tossica per l'estrazione di olio-resine alimentari prive di solventi. La limitata stabilità di questi oli nel tempo rappresenta il principale svantaggio per la loro utilizzazione. L'incapsulamento di tali oli in microparticelle biocompatibili e non tossiche come le  $\alpha$ -ciclodestrine ( $\alpha$ -CD) è una tecnica promettente per aumentarne la stabilità. In questo lavoro, l'olio derivante dalla polpa e semi di zucca, incapsulato o meno nelle  $\alpha$ -CD, è stato aggiunto alla semola per ottenere paste arricchite di molecole funzionali. Il fine ultimo di questo lavoro di ricerca è quello di creare un valore aggiunto, non solo in termini nutrizionali ma anche di sostenibilità, alla pasta secca, un alimento assai popolare in tutto il mondo per la sua convenienza in termini economici, di versatilità, e di facile conservazione, e che, come tale, rappresenta un mezzo ottimale per veicolare composti salutistici e funzionali.

## Materiali e metodi

Una leggera decorticazione di 90 secondi è stata applicata a 2 kg di cariossidi utilizzando un impianto pilota (NAMAD, Roma). La farina integrale micronizzata è stata ottenuta macinando i semi parzialmente decorticati con un dispositivo KMX-500 (Separ Microsystem, Brescia) come descritto in Ciccoritti *et al.*, 2018. Successivamente, la farina micronizzata è stata frazionata utilizzando un turboseparatore (Separ Microsystem). Questo sistema ha prodotto due frazioni definite come a granulometria grossolana (G) e fine (F), successivamente utilizzate per gli arricchimenti della semola. La semola arricchita con le frazioni G e F a diverso rapporto (25 e 50 % di semola, rispettivamente) sono state setacciate (1 mm) e quindi utilizzate per produrre campioni di pasta (PG25 e PF50). Le trebbie di malto d'orzo tipo Pilsner (10 kg) sono state essiccate in stufa ventilata a 60°C per 72 h (umidità 7%) e successivamente micronizzate ad una granulometria  $\leq 700 \mu\text{m}$ . La semola tradizionale ottenuta con molino Buhler MLU 202, è stata arricchita a tre diverse percentuali (5%-10%-20%) con le trebbie micronizzate per produrre 3 prototipi di pasta. L'olio di zucca è stato estratto utilizzando uno Spe-ed SFE system (Applied Separations, USA) e incapsulato in  $\alpha$ -CDs per uso alimentare (CAVAMAX® w6) (Durante *et al.*,

2016). La pastificazione è stata effettuata utilizzando una pressa sperimentale (NAMAD) per ottenere spaghetti ( $\varnothing$  1,65 mm). Le paste sono state essiccate con un ciclo a bassa temperatura (50°C per 18 h). Sulle paste sono stati determinati: amido resistente e amido totale, fibra alimentare totale, proteine totali, contenuto in ceneri,  $\beta$ -glucani e capacità antiossidante totale come riportato in Nocente *et al.* (2020).

Le paste, inoltre, sono state sottoposte a cottura per la determinazione del tempo ottimale di cottura, della Sostanza Organica Totale e del nervo mediante Texture Analyser (TAXT) (D'Egidio *et al.*, 1982; D'Egidio *et al.*, 1993). Sulle paste è stata inoltre condotta l'analisi sensoriale, eseguita da un panel di tre assaggiatori esperti che ne hanno valutato collosità, nervo e ammassamento, e fornito un giudizio globale (D'Egidio *et al.*, 1982; D'Egidio *et al.*, 1993). Tutti i dati sono riportati come peso secco e sono stati riportati come la media di due aliquote indipendenti  $\pm$  la deviazione standard.

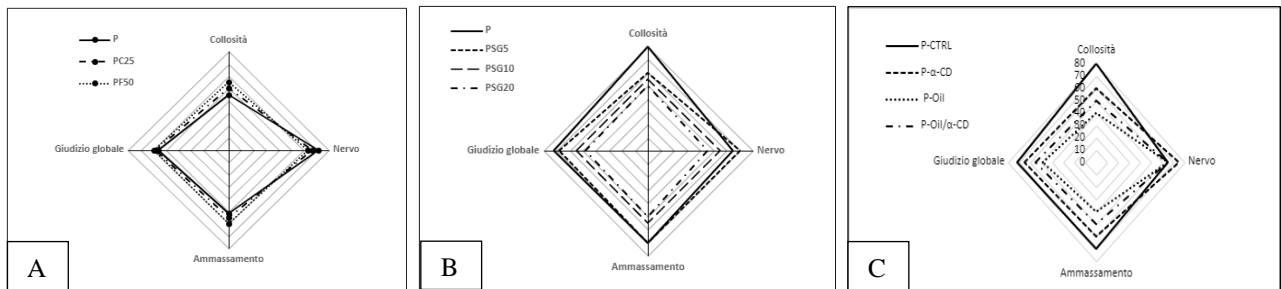
### **Risultati e discussione**

L'obiettivo di questa ricerca è stato di migliorare il potenziale nutrizionale della pasta alimentare attraverso l'applicazione di tecniche innovative durante l'intero processo di produzione come descritto nei materiali e metodi. L'intero processo tecnologico innovativo e la pasta prodotta sono oggetto del brevetto N. 1421958 rilasciato il 14/04/2016 dall'UIBM (Ufficio Italiano Brevetti e Marchi); questo brevetto è stato valutato dallo stesso UIBM, come altamente trasferibile alle aziende alimentari su scala industriale. Sono stati ottenuti tre diversi campioni di pasta, P, PG25 e PF50. Le paste secche sono state caratterizzate per il contenuto in proteine, ceneri, amido totale, il contenuto di fibre alimentari totali e di amido resistente. I livelli di tutti i parametri analizzati erano più elevati nei campioni arricchiti rispetto alla pasta di controllo, con la sola eccezione del contenuto di amido totale che risulta essere più o meno invariato. Interessante notare che la quantità di fibra è risultata aumentata del 62,5% in PG25 e persino del 113% in PF50. È stato anche osservato un incremento dell'amido resistente in entrambe le paste arricchite, particolarmente evidente nel campione ottenuto dalla semola arricchita con la frazione grossolana (+ 18%), mentre nella pasta arricchita con la frazione fine, l'aumento era del 7%. I risultati relativi al contenuto di ceneri hanno rivelato, come previsto, un graduale incremento a partire dal campione P a PG25 a PF50 (quantità media 0,67, 0,73 e 0,90%), rimanendo comunque ampiamente entro i limiti legali italiani per la pasta integrale (1,8%). Dai dati sopra riportati, si può dedurre che i prodotti di pasta arricchiti presentavano un contenuto più elevato di composti bioattivi rispetto alla pasta di controllo e un ottimo contenuto di amido e proteine. La pasta arricchita ha mostrato un aspetto simile alla pasta tradizionale, senza particelle di crusca visibili e un colore giallo leggermente meno brillante. A seguito dell'analisi organolettica, è stata riscontrata una minore tenacità (nervo) negli spaghetti arricchiti (PG25 e PF50) (Fig. 1A); anche collosità e ammassamento sono risultati inferiori sia in PG25 che in PF50 rispetto alla pasta di controllo; ciò potrebbe essere una conseguenza dell'interferenza delle parti cruscali sulla rete del glutine, e potrebbero essere correlati alla presenza della fibra che è nota avere un effetto positivo sulla collosità, poiché limita parzialmente il rilascio dell'amido durante la cottura. I punteggi di giudizio organolettico globale variavano da 56 a 59, indicando una qualità "sufficiente" per tutti e tre i campioni di pasta. L'utilizzo di frazioni micronizzate e turboseparate per arricchire la semola, ha influenzato in misura minore le proprietà organolettiche della pasta, permettendo un'aggiunta fino al 50% di frazione F (Fig. 1A).

L'applicazione della micronizzazione sulle trebbie ha permesso di arricchire la semola fino ad una percentuale del 20%, limitando i problemi tecnologici legati alla granulometria degli sfarinati. Le paste arricchite con le trebbie hanno mostrato un potenziale nutrizionale aumentato rispetto alla pasta di sola semola. In particolare, si è osservato un aumento in fibre del 42% e del 52% nelle paste arricchite al 5% (PSG5) e al 10% (PSG10) rispettivamente, fino ad arrivare al 135% nella pasta arricchita al 20% (PSG20). Anche il rapporto tra amido resistente ed amido totale (RS/TS)

ha mostrato un graduale incremento in relazione all'arricchimento arrivando ad un aumento massimo del 57% nella pasta con il 20% di trebbie. È interessante notare che la presenza di trebbie ha comportato un innalzamento del contenuto in  $\beta$ -glucani nelle paste arricchite raggiungendo un incremento del 19, del 49 e dell'85% rispettivamente nelle paste con il 5, 10, 20 % di trebbie. Infine, anche la capacità antiossidante totale aumentava con l'aumentare dell'arricchimento così come osservato per gli altri composti bioattivi analizzati in questo studio. In particolare, i livelli di capacità antiossidante totale, nelle paste arricchite al 10 e 20 %, sono risultati rispettivamente superiori del 10 e del 19% rispetto alla pasta di semola; tale innalzamento era dovuto alla presenza degli strati esterni della cariosside di orzo, ricchi in composti antiossidanti come i polifenoli che, anche a seguito del processo di maltazione, potrebbero risultare più accessibili all'attacco del radicale (ABTS) utilizzato in questa analisi. Le paste arricchite sono state anche valutate per la loro qualità in cottura. I tempi di cottura sono risultati simili in tutti i campioni ad eccezione della pasta arricchita al 20% che presentava una diminuzione, seppur contenuta, di 20 secondi nel tempo di cottura rispetto alle altre tre paste. Questi risultati hanno evidenziato che le trebbie micronizzate influenzano in misura minore i tempi di cottura rispetto alla crusca utilizzata nelle paste integrali, i cui tempi di cottura di norma risultano inferiori alla pasta convenzionale. Nelle paste arricchite con trebbie la sostanza organica aumentava gradualmente all'aumentare dell'arricchimento. Questo comportamento è ascrivibile all'alto contenuto di fibre che limita l'intrappolamento dell'amido nelle maglie glutiniche, causandone il suo rilascio dalla matrice. Gli effetti dell'aggiunta delle trebbie sul nervo delle paste arricchite sono risultati, anche in questo caso, simili a quelli osservati nelle paste integrali, dove la presenza di fibra e  $\beta$ -glucani indebolisce il glutine con effetti sulla sua tenacità. La riduzione del nervo, determinato con il metodo analitico TA.XT, è stata percepita anche dal panel di esperti a seguito dell'analisi sensoriale (Fig. 1B), che ha attribuito un giudizio comunque buono per la pasta al 5% e sufficiente per le altre due tipologie di paste che, inoltre, risultavano più collose ed ammassate. Questo lavoro ha messo in evidenza come materiali di scarto come le trebbie, derivanti dal processo di birrificazione, possano essere valorizzate mediante il loro reimpiego nel processo di produzione della pasta.

L'aggiunta nella semola dell'olio estratto in SC-CO<sub>2</sub> dalla polpa e semi di zucca, in forma libera o incapsulato nelle  $\alpha$ -CD (P-Oil e P-Oil/ $\alpha$ -CD, rispettivamente, Fig. 1C) ha permesso la produzione di spaghetti con aumentati livelli di fitosteroli, squalene, carotenoidi (es. vitamina A), tococromanoli (es. vitamina E), acidi grassi insaturi e di capacità antiossidante. Sebbene la carenza di vitamina A ed E sia rara nei paesi sviluppati, la dieta di quelli in via di sviluppo spesso non soddisfa il fabbisogno giornaliero consigliato (RDA) (700  $\mu$ g/die e 15 mg/die per vitamina A ed E, rispettivamente). Considerando che 100 g di pasta cotta S-Oil e S-Oil/ $\alpha$ -CD forniscono, rispettivamente, 8,86 e 10,41% della RDA per la vitamina A e 2,99 e 1,83% della RDA per la vitamina E, gli spaghetti arricchiti possono contribuire a migliorare il fabbisogno vitaminico. Inoltre, una porzione da 100 g di pasta S-Oil o S-Oil/ $\alpha$ -CD cotta fornisce circa dal 5% all' 8% della dose funzionale di fitosteroli (1,5–2,4 g/giorno). Un'assunzione giornaliera entro l'intervallo suggerito è stato riportato ridurre in media il colesterolo totale plasmatico e il colesterolo LDL del 7-10,5%. La complessazione dell'olio di zucca nelle  $\alpha$ -CD ha aumentato il contenuto di fibre e di amido resistente della pasta, oltre alla texture degli spaghetti cotti e alla stabilità dei composti bioattivi, rispetto al campione arricchito dell'olio di zucca in forma libera. Al contrario, l'integrazione dell'olio ha influenzato negativamente la SOT e i valori di collosità se confrontati con gli spaghetti di sola semola (P-CTRL); tuttavia, la valutazione sensoriale complessiva è stata soddisfacente per la pasta arricchita con l'olio di zucca incapsulato nelle  $\alpha$ -CD (Fig. 1C).



**Figura 1.** Grafico a radar della valutazione organolettica dei campioni di pasta cotta. Per collosità e ammassamento,  $\leq 20$  = molto alto, 40 = alto, 60 = raro, 80 = quasi assente, 100 = assente; per il nervo,  $\leq 20$  = assente, 40 = raro, 60 = sufficiente, 80 = buono, 100 = molto buono. Il punteggio globale del giudizio organolettico va da 10 a 100,  $< 55$  = scarso,  $\geq 55$  e  $< 65$  = sufficiente,  $\geq 65$  e  $< 75$  = buono,  $> 75$  = molto buono. **A)** P= Pasta di semola; PG25= Pasta arricchita con 25% di frazione Grossolana, G); PF50= Pasta arricchita con 50% di frazione Fine, F). **B)** P= Pasta di semola; PSG5,10,20= Pasta arricchita con trebbie (5, 10, 20%, rispettivamente). **C)** P-CTRL= Pasta di semola; P- $\alpha$ -CD= Pasta arricchita con le  $\alpha$ -Ciclodestrine; P-Oil= Pasta arricchita con olio di zucca in forma libera; P-Oil/  $\alpha$ -CD= Pasta arricchita con olio di zucca incapsulato nelle  $\alpha$ -Ciclodestrine.

## Ringraziamenti

Gli autori ringraziano Roberto Mortaro, Ester Gosparini, Alessandra Arcangeli e Cristina Cecchini del CREA-IT di Roma per il loro supporto tecnico nella trasformazione della pasta e nell'analisi sensoriale.

## Bibliografia

- Ciccoritti R., Terracciano G., Cammerata A., Sgrulletta D., Del Frate V., Gazza L., Nocente F. 2018. Hydrothermal grain pre-processing and ultra-fine milling for the production of durum wheat flour fractions with high nutritional value. *Food Science and Technology International*, 24: 242-250.
- D'Egidio, M.G., De Stefanis, E., Fortini, S., Galterio, G., Nardi, S., Sgrulletta, D., Bozzini, A. 1982. Standardization of cooking quality analysis in macaroni and pasta products. *Cereal Foods World*, 27: 367-368.
- D'Egidio M.G., Mariani B.M., Nardi S., Novaro P. 1993. Viscoelastograph measures and total organic matter test: suitability in evaluating textural characteristics of cooked pasta. *Cereal Chemistry*, 70: 67-72.
- Durante M., Lenucci M. S., Marrese P. P., Rizzi V., De Caroli M., Piro G., Fini P., Russo G. L., Mita G. 2016.  $\alpha$ -Cyclodextrin encapsulation of supercritical CO<sub>2</sub> extracted oleoresins from different plant matrices: A stability study. *Food Chemistry*, 199: 684-693.
- Mussatto S.I., Dragone G., Roberto I.C. 2006. Brewers' spent grain: Generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, 43: 1-14.
- Nocente F., Taddei F., Galassi E., Gazza L. 2020. Recupero e valorizzazione delle trebbie esauste derivanti dal processo di birrificazione attraverso la produzione di pasta ad aumentato valore nutrizionale. *Tecnica Molitoria*, 71: 33-45.



## **Riutilizzo sostenibile delle trebbie di birra per la produzione di pasta ad alto contenuto proteico e di fibre**

*F. Cuomo<sup>1\*</sup>, M.C. Trivisonno<sup>1</sup>, S. Iacovino<sup>1</sup>, L. Falasca<sup>1</sup>, M. C. Messia<sup>1</sup>, E. Marconi<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Dipartimento Agricoltura, Ambiente e Alimenti (DiAAA), Università degli Studi del Molise, Via Francesco De Sanctis, 86100 Campobasso (CB).

<sup>2</sup>Facoltà Dipartimentale di Scienze e Tecnologie per l'Uomo e l'Ambiente (STUA), Università Campus Bio-Medico di Roma, Via Álvaro del Portillo 21, 00128 Roma (RM).

\*E-mail: [francesca.cuomo@unimol.it](mailto:francesca.cuomo@unimol.it)

### **Abstract**

Brewer's spent grains (BSG) are a by-product of the brewing industry, which, due to their protein and fiber content, can be used as raw material for the production of many other products. In this study, to enhance their nutritional characteristics BSG were included in the formulation of innovative dry pasta. In particular, an ingredient rich in proteins derived from BSG was used. The ingredient was blended with the semolina in different proportions in order to have an adequate compromise between technological and nutritional properties. The nutritional characteristics of "high protein" and "high fiber content" claims were obtained using formulations enriched with 15% of protein-rich ingredient, while using 12.5% of the ingredient the final product had the characteristics of "high fiber" and "source of protein". The obtained results showed that the inclusion of BSG in pasta formulation represents an effective way to enhance the nutritional characteristics of a by-product of the food industry.

### **Riassunto**

Le trebbie di birra sono un sottoprodotto dell'industria brassicola che, per il loro contenuto di proteine e fibre, possono essere recuperate per diventare materia prima per la produzione di molti altri prodotti. In questo studio, per valorizzare le loro caratteristiche nutrizionali, le trebbie di birra sono state incluse nella formulazione di paste secche innovative. In particolare, è stato utilizzato un ingrediente ricco in proteine derivato dalle trebbie di birra. Questo è stato miscelato con la semola in proporzioni tali da avere un adeguato compromesso tra le proprietà tecnologiche e quelle nutrizionali. Le caratteristiche nutrizionali relative ai claim "ad alto contenuto proteico" e "ad alto contenuto di fibre" sono state ottenute utilizzando una formulazione arricchita con il 15% di un ingrediente derivato dalle trebbie. Utilizzando, invece il 12.5% di tale ingrediente sono state ottenute le caratteristiche per i claim "ad alto contenuto di fibre" e "fonte di proteine". I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'inclusione delle trebbie di birra nella formulazione della pasta rappresenta un modo efficace per valorizzare le caratteristiche nutrizionali di un sottoprodotto dell'industria alimentare.

### **Introduzione**

In un momento in cui l'attenzione alla sostenibilità e alla lotta allo spreco alimentare è diventata la norma, i sottoprodotti dell'industria cerealicola, in virtù della loro composizione, risultano particolarmente interessanti. Di recente, la Commissione Europea ha sviluppato un piano, nell'ambito del Green Deal europeo, denominato "Strategia Farm to Fork" che, tra gli altri aspetti, mira a sviluppare un sistema alimentare più sostenibile, dalla produzione al consumo (European Commission, 2020).

Nel sistema agroalimentare esistono numerosi esempi di sottoprodotti ricchi di nutrienti e micronutrienti, come ad esempio le trebbie birra. Esse sono il residuo insolubile del malto d'orzo al termine della fase di ammostamento e comprendono le glumelle che ricoprono inizialmente il chicco d'orzo, il pericarpo e i rivestimenti del seme. L'interesse per le trebbie di birra nasce dalla loro composizione ricca in fibre (cellulosa, emicellulosa e lignina) e proteine, dall'altro lato la



loro elevata umidità le rende un prodotto rapidamente deperibile. Per far fronte a questo aspetto, attualmente vengono applicate strategie di essiccazione a ridotto impatto economico ed energetico (Ikram *et al.*, 2017).

Negli ultimi anni sono stati pubblicati diversi studi in cui le trebbie di birra sono state incluse nella formulazione di prodotti destinati all'alimentazione umana, tra cui la pasta. La pasta è un prodotto cardine per l'alimentazione umana e contiene generalmente il 12% di proteine ma questo valore può essere accresciuto attraverso diverse strategie (Jayasena *et al.*, 2002; Messia *et al.*, 2021). Recentemente, alcuni ricercatori del CREA hanno utilizzato una miscela di semola e trebbie di birra per produrre pasta secca lunga e corta (Nocente *et al.*, 2019, Nocente *et al.*, 2021) migliorandone in particolare il contenuto di fibre. In un altro studio realizzato da un gruppo di ricerca irlandese (Sahin *et al.*, 2021) due ingredienti derivati dalle trebbie di birra, uno ricco di proteine e l'altro ricco di fibre, sono stati utilizzati per produrre pasta fresca con caratteristiche idonee per avere l'indicazione nutrizionale "fonte di fibre" o "ricca di fibre".

In questo scenario, l'obiettivo principale di questa ricerca è stato sviluppare della pasta secca rispondente ai claim del Reg. UE 1924/2006 "ad alto contenuto proteico" (almeno il 20% del valore energetico derivante dalle proteine) e "ad alto contenuto di fibre" (almeno il 6% di fibra) utilizzando ingredienti derivati dalle trebbie di birra.

## **Materiali e metodi**

La semola ad alto contenuto proteico, la semola integrale e la farina pregelatinizzata di lenticchie rosse sono state acquistate presso un distributore locale. La composizione (% ss) della farina di lenticchie rosse è riportata di seguito: proteine 31.2%, fibra 10.6%, grassi 2.0%, carboidrati 56.1%, ceneri 3.1%. L'ingrediente derivato dalle trebbie di birra (EVP) è stato fornito da AB-InBev (Leuven, Belgio) ed era ottenuto dalle trebbie di un processo di produzione realizzato con malto d'orzo e mais (70/30). Le dimensioni medie della polvere di EVP erano di circa 52µm e la composizione media (% ss) era la seguente: proteine 32.2%, fibra 38.7%, grassi 15.6%, carboidrati 10.5%, ceneri 3.1%.

*Analisi chimico nutrizionali e reologiche.* La caratterizzazione chimica degli ingredienti, delle miscele e dei prodotti finiti e le analisi farinografiche e alveografiche sono state realizzate secondo le metodiche di analisi ufficiali (AACC 2000 - ICC 1995).

*Pastificazione.* La pasta, formato lungo (spaghetti), è stata realizzata secondo il metodo ufficiale AACC 66-41.01, utilizzando un impianto pilota sperimentale per la produzione di pasta (NAMAD, Roma, Italia) composto da una pressa e un essiccatore. Ciascuna serie di spaghetti è stata essiccata a temperatura inferiore a 80°C modulando temperatura e umidità tramite un sistema di curve di equilibrio.

*Colore.* Il colore è stato misurato utilizzando il sistema di CIE L\* a\*b\*. Le misurazioni del colore sono state eseguite in triplicato con un colorimetro modello CR300 Minolta.

*Qualità di cottura.* Il tempo ottimale di cottura (TCO) e la determinazione degli attributi sensoriali (consistenza, rilascio di amido o collosità e ammassamento) sono stati determinati secondo la norma internazionale ISO 7304-1 (ISO 2016). La combinazione dei punteggi assegnati alle singole caratteristiche determina il punteggio totale della qualità di cottura. Gli spaghetti con punteggio totale ≤40 sono classificati di qualità scarsa o mediocre; da >40 a ≤50 non sono completamente soddisfacenti; da >50 a ≤70 sono discreti; >70 a 80 buoni; e >80 molto buoni.

*Analisi della texture.* L'analisi delle texture è stata effettuata utilizzando un Texture Analyzer TAXT2 per valutare la consistenza, la forza tensile e la flessibilità.

## **Risultati e discussione**

Nelle prime fasi della sperimentazione le miscele di semola, EVP e farina di lenticchie rosse (LR) sono state sottoposte alle prove reologiche per avere indicazioni sull'impatto degli ingredienti

sulle proprietà tecnologiche degli impasti. Nella Tabella 1 sono riportati il contenuto di proteine e fibra e i risultati dei test farinografici e alveografici delle miscele selezionate (EVP12.5 e EVP15) e dei sistemi di riferimento (semola, semola integrale e miscela LR25 al 25% di farina di lenticchie rosse e 75% di semola). La miscela LR25 è stata scelta come riferimento di una formulazione ricca in proteine.

**Tabella 1.** Umidità, proteine e fibra di semola, semola integrale e delle miscele con EVP e con farina di lenticchie rosse, risultati dei test farinografici e alveografici. Le lettere diverse nelle stesse righe indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ).

	<b>EVP12.5</b> (semola 87.5% + EVP 12.5%)	<b>EVP15</b> (semola 85% + EVP 15%)	<b>Semola</b>	<b>Semola integrale</b>	<b>LR25</b> (semola 75% + LR 25%)
<b>Umidità (%)</b>	13.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	12.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	14.2 ± 0.2 <sup>c</sup>	13.6 ± 0.1 <sup>b</sup>	13.6 ± 0.1 <sup>b</sup>
<b>Proteine (Nx6.25) (% ss)</b>	16.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	19.9 ± 0.1 <sup>c</sup>	17.4 ± 0.1 <sup>b</sup>	16.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	20.2 ± 0.2 <sup>c</sup>
<b>Fibra (% ss)</b>	8.0 ± 0.2 <sup>b</sup>	9.7 ± 0.2 <sup>c</sup>	3.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	8.7 ± 0.3 <sup>b</sup>	34.3 ± 0.4 <sup>d</sup>
<b><u>Parametri farinografici</u></b>					
<b>Acqua assorbita (%)</b>	62.3 ± 0.4 <sup>b</sup>	65.5 ± 0.4 <sup>d</sup>	58.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	63.8 ± 0.3 <sup>c</sup>	59.1 ± 0.4 <sup>a</sup>
<b>Tempo sviluppo impasto (min)</b>	10.2 ± 0.3 <sup>c</sup>	19.0 ± 0.2 <sup>d</sup>	5.3 ± 0.3 <sup>b</sup>	3.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.2 <sup>a</sup>
<b>Stabilità (min)</b>	13.5 ± 0.2 <sup>c</sup>	15.6 ± 0.3 <sup>e</sup>	14.6 ± 0.5 <sup>d</sup>	4.3 ± 0.2 <sup>b</sup>	3.2 ± 0.2 <sup>a</sup>
<b>Grado di rammollimento (UF)</b>	22 ± 0.5 <sup>a</sup>	43 ± 3.0 <sup>c</sup>	20 ± 1.0 <sup>a</sup>	42 ± 1.2 <sup>b</sup>	115 ± 1.1 <sup>c</sup>
<b><u>Parametri alveografici</u></b>					
<b>P (mm)</b>	123 ± 2 <sup>b</sup>	122 ± 5 <sup>a</sup>	126 ± 9 <sup>b</sup>	128 ± 7 <sup>b</sup>	76 ± 6 <sup>a</sup>
<b>L (mm)</b>	39 ± 3 <sup>b</sup>	18 ± 1 <sup>a</sup>	85 ± 6 <sup>c</sup>	31 ± 5 <sup>b</sup>	36 ± 4 <sup>b</sup>
<b>P/L</b>	3.15 ± 0.1 <sup>b,c</sup>	7.7 ± 0.5 <sup>d</sup>	1.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	4.1 ± 0.7 <sup>c</sup>	2.12 ± 0.5 <sup>a,b</sup>
<b>W (10<sup>-4</sup>J)</b>	116 ± 13 <sup>b</sup>	115 ± 3 <sup>b</sup>	116 ± 11 <sup>b</sup>	159 ± 8 <sup>c</sup>	85 ± 7 <sup>a</sup>

La composizione delle miscele denominate EVP12.5 e EVP15 è riportata in tabella. Entrambe le miscele hanno fornito un compromesso interessante tra la risposta tecnologica e quella nutrizionale. Queste risposte sono state favorite dall'utilizzo di una semola di elevata qualità che ha consentito di ottenere una buona attitudine alla trasformazione.

Le due miscele selezionate sono state sottoposte al processo di pastificazione. Le condizioni operative utilizzate per il processo di pastificazione sono riportate in Tabella 2 assieme alla composizione e all'analisi del colore delle paste realizzate.

Sulla base delle indicazioni ricavate dalle prove reologiche sono stati modulati il contenuto di acqua da aggiungere alla miscela di pastificazione e il tempo di miscelazione dell'impasto.

Dall'analisi della composizione si evince che la pasta EVP15 ha raggiunto le caratteristiche per i claim "ad alto contenuto di proteine" e "ad alto contenuto di fibra", mentre la pasta EVP12.5 è conforme ai claim "ad alto contenuto di fibra" e "fonte di proteine" (almeno il 12% del valore energetico deriva dalle proteine).

Per quanto riguarda l'analisi del colore, la pasta arricchita con EVP ha prodotto, come previsto, una significativa riduzione del parametro L\*, effetto atteso considerando il colore scuro dell'ingrediente. L'indice di rosso, a\*, era inferiore per la pasta di semola rispetto a tutte le altre e risultava massima nella pasta LR25. L'indice giallo, b\*, anch'esso, aveva valori più elevati nella pasta con le lenticchie rosse e presentava il valore più basso nella pasta EVP15.

La qualità di cottura è stata determinata sulle diverse paste cotte ai rispettivi TCO (Tab. 3).

Le paste EVP12.5 e EVP15 hanno TCO molto simile e di poco inferiore a quello della semola con cui sono state prodotte. Un tempo inferiore è osservato, invece, per la pasta di semola integrale e per la LR25. La consistenza è stata valutata positivamente per le paste realizzate con l'aggiunta dell'ingrediente EVP ed è abbastanza simile alla pasta di semola e di semola integrale.

**Tabella 2.** Condizioni operative della pastificazione, composizione, raggiungimento delle caratteristiche nutritive e colore delle diverse paste. Le lettere diverse nella stessa riga indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ).

	<b>EVP12.5</b>	<b>EVP15</b>	<b>Semola-2</b>	<b>Semola integrale</b>	<b>LR25</b>
<b>Condizioni operative</b>					
Acqua aggiunta (%)	35	40	28	31	28
Tempo impastamento (min)	25	25	20	20	15
Pressione testa (bar)	63	56	112	74	75
Umidità (%)	10.7 ± 0.3 <sup>b</sup>	10.4 ± 0.2 <sup>a,b</sup>	10.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	10.5 ± 0.1 <sup>a,b</sup>	10.0 ± 0.2 <sup>a</sup>
Proteine (% tal quale)	17.3 ± 0.2 <sup>b</sup>	17.8 ± 0.3 <sup>b</sup>	15.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	15.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	18.4 ± 0.1 <sup>c</sup>
Fibra (% tal quale)	8.3 ± 0.5 <sup>c,d</sup>	8.7 ± 0.4 <sup>d</sup>	3.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	7.6 ± 0.2 <sup>c</sup>	4.6 ± 0.1 <sup>b</sup>
Grassi (% tal quale)	3.2 ± 0.2 <sup>b</sup>	3.5 ± 0.3 <sup>b</sup>	1.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.9 ± 0.3 <sup>b</sup>	1.5 ± 0.2 <sup>a</sup>
Ceneri (% tal quale)	1.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.2 <sup>a</sup>
Carboidrati (% tal quale)	59.1 ± 0.7 <sup>a</sup>	57.9 ± 0.6 <sup>a</sup>	69.5 ± 0.2 <sup>c</sup>	63.2 ± 0.2 <sup>b</sup>	64.1 ± 0.3 <sup>b</sup>
<b>Claim nutrizionali</b>					
Ad alto contenuto di proteine		SI			
Ad alto contenuto di fibre	SI	SI		SI	SI
Fonte di proteine	SI		SI	SI	
Fonte di fibre			SI		SI
<b>Colore</b>					
L*	42.8 ± 0.9 <sup>b</sup>	34.5 ± 0.9 <sup>a</sup>	57.1 ± 1.5 <sup>d</sup>	44.9 ± 1.2 <sup>b</sup>	49.7 ± 0.8 <sup>c</sup>
a*	3.4 ± 0.2 <sup>b</sup>	7.3 ± 0.2 <sup>d</sup>	-4.5 ± 0.6 <sup>a</sup>	4.9 ± 0.2 <sup>c</sup>	11.2 ± 0.3 <sup>c</sup>
b*	13.3 ± 0.7 <sup>a</sup>	12.6 ± 0.2 <sup>a</sup>	34.7 ± 0.4 <sup>c</sup>	29.9 ± 0.3 <sup>b</sup>	40.7 ± 0.2 <sup>d</sup>

**Tabella 3.** TCO, qualità di cottura e analisi della texture delle diverse paste. Le lettere diverse nella stessa riga indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ).

	<b>EVP12.5</b>	<b>EVP15</b>	<b>Semola</b>	<b>Semola integrale</b>	<b>LR25</b>
TCO (min)	12'40"	12'50"	13'00"	10'00"	11'35"
<b>Qualità di cottura</b>					
Consistenza	88 ± 4 <sup>a</sup>	86 ± 5 <sup>a</sup>	88 ± 4 <sup>a</sup>	89 ± 6 <sup>a</sup>	83 ± 4 <sup>a</sup>
Collosità	83 ± 4 <sup>a,b</sup>	90 ± 3 <sup>b</sup>	84 ± 3 <sup>a,b</sup>	77 ± 4 <sup>a</sup>	79 ± 5 <sup>a</sup>
Ammassamento	84 ± 2 <sup>b</sup>	95 ± 2 <sup>c</sup>	85 ± 2 <sup>b</sup>	73 ± 2 <sup>a</sup>	80 ± 3 <sup>b</sup>
Punteggio totale	85 ± 6 <sup>a,b</sup>	90 ± 4 <sup>b</sup>	84 ± 5 <sup>a,b</sup>	80 ± 4 <sup>a</sup>	81 ± 4 <sup>a,b</sup>
Giudizio finale	Molto buono	Molto buono	Molto buono	Buono	Molto buono
<b>Analisi della texture</b>					
Consistenza (g)	574 ± 18 <sup>b,c</sup>	560 ± 15 <sup>a,b,c</sup>	581 ± 20 <sup>c</sup>	515 ± 20 <sup>a</sup>	528 ± 18 <sup>a,b</sup>
Forza tensile (g)	25 ± 2 <sup>a</sup>	31 ± 6 <sup>a</sup>	27 ± 6 <sup>a</sup>	33 ± 7 <sup>a</sup>	33 ± 5 <sup>a</sup>
Flessibilità (g)	49 ± 7 <sup>a</sup>	47 ± 3 <sup>a</sup>	52 ± 3 <sup>a</sup>	48 ± 8 <sup>a</sup>	52 ± 6 <sup>a</sup>

Sebbene nelle miscele delle paste EVP12.5 e EVP15 parte del glutine sia stato sostituito da altre proteine, il rilascio di amido (collosità) di entrambi i campioni di pasta ha ricevuto punteggi molto alti, indicativi del fatto che la quantità di amido rilasciato era ridotta. La pasta integrale e la LR25 hanno ottenuto punteggi inferiori. Quanto osservato (collosità ridotta), è ascrivibile alla ridotta granulometria dell'ingrediente EVP (52 µm) che ha contribuito a creare una barriera alla fuoriuscita dell'amido. Nella formulazione della pasta LR25 la semola è stata sostituita per il 25% con un ingrediente ricco di proteine e di amido. Questo, assieme alle dimensioni medie della farina di lenticchie rosse (tra 100 e 250 µm), ha generato una diversa interazione con il glutine che ha portato ad una maggior presenza di amido sulla superficie della pasta, sebbene in quantità contenuta. L'ammassamento ha mostrato una tendenza che rispecchiava quella del rilascio di amido con punteggi più alti per EVP12.5 ed EVP15. Nel complesso, le paste preparate con l'ingrediente EVP, la pasta di semola e la LR25 sono risultate di elevata qualità mentre la pasta di semola integrale era di qualità buona.

Le caratteristiche di consistenza, valutate attraverso l'analisi strumentale (texture analyzer), erano ben correlate con quanto riscontrato dall'analisi sensoriale. Il valore di forza tensile era simile per tutti gli spaghetti, così come i valori della forza per la rottura degli spaghetti crudi.

## **Conclusioni**

Il presente studio ha dimostrato come sia possibile utilizzare con successo un ingrediente derivato dalle trebbie di birra e ricco in proteine per sviluppare nuova pasta con valore aggiunto in termini di caratteristiche nutrizionali e qualità tecnologica. Le caratteristiche reologiche delle miscele EVP/semola hanno evidenziato come l'aggiunta degli ingredienti all'impasto determini la necessità di regolare alcuni parametri del processo di pastificazione.

La pasta arricchita con EVP al 12.5 o al 15% ha mostrato elevata qualità di cottura e la prima ha raggiunto le caratteristiche per avere in etichetta i claims "fonte di proteine" e "ad alto contenuto di fibra" e la seconda quella per i claims "ad alto contenuto di proteine e di fibra".

I risultati di questa ricerca, nell'insieme, dimostrano che l'inclusione delle trebbie di birra nella formulazione della pasta permette di aggiungere su un mercato già saturo, un prodotto innovativo che contiene un prezioso sottoprodotto industriale.

## **Bibliografia**

AACC 2000. *American Association of Cereal Chemists. Approved Methods*, 11th ed. 2010; Methods 46-30.01 32-05.01, 54-21.01, 54-30.02 and 66-41.01: St. Paul, MN, USA.

European Commission. Farm to Fork Strategy - For a fair, healthy and environmentally-friendly food system 2020, [https://ec.europa.eu/food/horizontal-topics/farm-fork-strategy\\_en](https://ec.europa.eu/food/horizontal-topics/farm-fork-strategy_en) (accessed on October 4, 2021).

ICC. *Standard Methods of the International Association for Cereal Science and Technology*. Methods 109/1, 136, and 104/1; ICC: Vienna, Austria, 1995.

Ikram S., Huang L., Zhang H., Wang J., Yin M., 2017 Composition and Nutrient Value Proposition of Brewers Spent Grain. *Journal of Food Science*, 82: 2232-2242.

International Standard ISO 2016, 7304-1: Durum Wheat Semolina and Alimentary Pasta- Estimation of Cooking Quality of Alimentary Pasta by Sensory Analysis; Geneva, Switzerland.

Jayasena V., Nasar-Abbas S.M., 2012. Development and quality evaluation of high-protein and high-fiber pasta using lupin flour. *Journal of Texture Studies*, 43: 153-163.

Messia M.C., Cuomo F., Falasca L., Trivisonno M.C., De Arcangelis E., Marconi E. 2021. Nutritional and Technological Quality of High Protein Pasta. *Foods*, 10: article 589.

Nocente F., Natale C., Galassi E., Taddei F., Gazza L. 2021. Using einkorn and tritordeum brewers' spent grain to increase the nutritional potential of durum wheat pasta. *Foods*, 10: article 502.

Nocente F., Taddei F., Galassi E., Gazza L. 2019. Upcycling of brewers' spent grain by production of dry pasta with higher nutritional potential. *LWT - Food Science and Technology*, 114: article 108421.

Sahin A.W., Hardiman K., Atzler J.J., Vogelsang-O'Dwyer M., Valdeperez D., Münch S., Cattaneo G., O'Riordan P., Arendt E.K. 2021. Rejuvenated Brewer's Spent Grain: The impact of two BSG-derived ingredients on techno-functional and nutritional characteristics of fibre-enriched pasta. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 68: article 102633.

## Caratterizzazione di pasta fresca arricchita in amido resistente

A. Cimini<sup>1\*</sup>, A. Poliziani<sup>1</sup>, E. De Arcangelis<sup>3</sup>, E. Botticella<sup>2</sup>, D. Lafiandra<sup>2</sup>, M. Moresi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento per l'Innovazione nei sistemi Biologici, Agroalimentari e Forestali, Università della Tuscia, Via S. C. de Lellis, 01100 Viterbo (VT).

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali, Università della Tuscia, Via San Camillo de Lellis, 01100 Viterbo (VT).

<sup>3</sup>Facoltà Dipartimentale di Scienze e Tecnologie per l'Uomo e l'Ambiente (STUA), Università Campus Bio-Medico, Via Álvaro del Portillo 21, 00128 Roma (RM).

\*E-mail: [a.cimini@unitus.it](mailto:a.cimini@unitus.it)

### Abstract

This study was aimed at assessing the main biochemical, technological, and functional properties of a few samples of fresh pasta obtained from a commercial type 00 bread wheat flour enriched with 50% (w/w) of a high amylose wheat flour. Although the technological parameters of such samples remained practically constant, it was possible to classify such fresh pasta sample as a food with a low *in vitro* glycemic index of about 44%.

### Riassunto

In questo studio si sono determinate le principali proprietà biochimiche, tecnologiche e funzionali di alcuni campioni di pasta fresca ottenuti a partire da una farina commerciale di grano tenero 00 arricchita al 50% con una farina ad alto contenuto di amilosio. Sebbene i parametri tecnologici dei campioni si siano mantenuti praticamente costanti, l'indice glicemico *in vitro* ha permesso di classificare i campioni di pasta fresca come alimenti a basso indice glicemico (~44%).

**Parole chiave:** amido resistente, amilosio, consistenza, consumo energetico, *cooking loss*, indice glicemico *in vitro*, pasta fresca.

### Introduzione

Gli amidi ad alto tenore di amilosio migliorano il profilo nutrizionale dei frumenti, in quanto incrementano la frazione di amido resistente (RS), che, non essendo digerito dalle  $\alpha$ -amilasi nello stomaco e nell'intestino tenue, ma solo fermentato dal microbiota intestinale, migliora il metabolismo del glucosio dopo un pasto (Birt *et al.*, 2013). Amidi con un tenore di amilosio superiore al 70% del contenuto totale di amido sono stati ottenuti in frumenti (Botticella *et al.*, 2018; Regina *et al.*, 2015; Slade *et al.*, 2012), dando origine a farine con un tenore di RS >10% utilizzate per produrre alimenti arricchiti in amido resistente, quali tagliatelle essiccate (Ang *et al.*, 2020), noodles giapponesi, pane e grano soffiato (Newberry *et al.*, 2018).

Obiettivo primario di questo lavoro è stato quello di determinare le principali proprietà biochimiche (amido totale, amido resistente), tecnologiche (tempo di cottura ottimale; acqua assorbita dalla pasta cotta; *cooking loss*; consistenza della pasta cotta tramite test dinamometrici; energia di cottura) e funzionali (indice glicemico) di alcuni campioni di pasta fresca (spaghetti), ove una farina commerciale di grano tenero 00 era arricchita con una farina ad alto contenuto di amilosio.

## Materiali e metodi

Per la produzione di pasta fresca è stata utilizzata una linea ad alto contenuto di amilosio derivata dalla cultivar di frumento tenero Cadenza (Botticella *et al.*, 2018), coltivata con tecniche di agricoltura conservativa, semina su sodo e concimazione convenzionale durante la stagione 2019-2020. Dalla macinazione della granella in un mulino pilota di Grandi Molini Italiani SpA (Venezia) si è ottenuta una farina arricchita in amilosio (resa 56,2%) al (64,5±0,4) % in amido totale, di cui (10,9±0,7) % amido resistente e (54,4±0,5) % amilosio, al (2,1±0,2) % in grassi, al (10,8±0,1) % in proteine ed umidità del (14.3±0,1) %. La farina di grano tenero tipo 00 impiegata (Molino Profili Giuseppe s.a.s., Viterbo) derivava dalla macinazione di grani nazionali ed era così caratterizzata: forza W=180-200 ( $10^{-4}$  J), rapporto tenacità/estensibilità P/L=0.5-0.6 e frazioni ponderali [in g/g] lipidica (0,02), glucidica (0,73) e proteica (0,115). Dette farine sono state miscelate previa pesatura preliminare, in modo da pervenire ad una frazione ( $x_F$ ) della farina ad alto amilosio pari al 50% p/p. L'omogeneità è stata ottenuta mediante prolungata miscelazione. L'impastamento è stato effettuato aggiungendo acqua deionizzata in ragione di 35 g per ogni 100 g di miscela direttamente all'interno di una impastatrice Simac Pastamatic 1000 (De' Longhi Appliances Srl, Campi Bisenzio, FI) per una durata complessiva di 8 min. L'impasto è stato poi trafilato sotto forma di spaghetti, i quali sono stati conservati in frigorifero a +4 °C all'interno di vaschette di alluminio opportunamente chiuse per non più di 2 giorni. Ciascuna pasta fresca è stata preparata tre volte differenti, utilizzando sfarinati dello stesso lotto. Determinato il tempo di cottura ottimale (OCT) per ciascun campione di pasta fresca prodotta in base al metodo ISO 7304-1 (ISO, 2016), si è effettuata la cottura nel cuocitore eco-sostenibile previamente messo a punto (Cimini *et al.*, 2020), utilizzando 50 g di pasta fresca in 500 g di acqua minerale. Durante la fase di riscaldamento dell'acqua da ~15 a 98 °C e per riportare a 98 °C la temperatura dell'acqua una volta colata la pasta, si è regolata la potenza erogata dal fornello a 2000 W. Infine, la fase di cottura è stata poi completata alla potenza minima di 200 W. L'energia elettrica consumata dal piano a induzione ( $E_s$ ) è stata rilevata con un misuratore di potenza digitale tipo RCE MP600 (RCE Srl, Salerno). La qualità della pasta fresca cotta è stata valutata determinando: l'acqua assorbita dalla pasta cotta (WU) e la quantità di solidi dispersi nell'acqua di cottura (*cooking loss*, CL: D'Egidio *et al.*, 1990) per unità di pasta fresca cruda; la consistenza della pasta cotta tramite l'Universal Testing Machine UTM mod. 3342 (Instron Int. Ltd., High Wycombe, UK), equipaggiata con cella di carico da 1000 N, sottoponendola a 2 cicli consecutivi di compressione al 30 ed al 90% dello spessore medio di ciascun campione di pasta in esame, come descritto da Cimini *et al.* (2019abc). Le frazioni di amido totale (TS) e di amido resistente (RS) sono state determinate nelle farine e nelle paste cotte rispettivamente tramite i kit enzimatici *Total starch (amyloglucosidase/α-amylase method)* e *Resistant starch* della Megazyme Ltd. (Bray, Ireland). La digestione *in vitro* dell'amido della pasta è stata determinata in base al metodo messo a punto da Zou *et al.* (2015). Per i test dell'indice glicemico e dell'amido resistente si è direttamente utilizzata la pasta cotta per un tempo pari all'OCT, mentre per il test dell'amido totale la pasta cotta è stata successivamente essiccata e poi macinata. Tutti i test sono stati replicati almeno 3 volte per stimare il valore medio e la deviazione standard di tutti i parametri in esame, onde sottoporli ad Analisi della Varianza (ANOVA) ad una via e confronti multipli (*Tukey Test*) al livello di significatività p di 0,05.

## Risultati e discussione

Si riportano in Tabella 1 i risultati dei test chimico-fisici e biochimici eseguiti sui campioni di pasta fresca a base di farina di frumento tenero tipo 00 con una frazione ( $x_F$ ) di farina di frumento ad alto amiloso pari a 0 ed al 50% p/p. Eseguendo le prove di cottura con un rapporto acqua-pasta fresca di 10 L/kg, il tempo di cottura ottimale (OCT) nei casi esaminati si riduceva da 3,5 a 3 min. Sebbene tale differenza risulti significativa al livello di confidenza del 95%, l'OCT, viste le modalità di rilevazione, può in pratica ritenersi costante. Parimenti costanti appaiono gli altri parametri caratteristici della cottura dei campioni di pasta fresca esaminati, quali: l'energia specifica di cottura ( $E_S=2,0\pm 0,2$  kWh/kg); le frazioni ponderali dell'acqua assorbita dalla pasta ( $\eta_{PC}=7,0\pm 0,4$  %), di quella evaporata ( $\eta_{EW}=9,0\pm 1,3$ %) e di quella che residua a fine cottura ( $\eta_{PW}=84,0\pm 1,6$ ); l'acqua assorbita dalla pasta cotta ( $WU=0,70\pm 0,04$  g/g) ed il *cooking loss* ( $CL=0,073\pm 0,012$  g/g) per unità di pasta fresca cruda. Nel complesso, pur con lievi differenze statisticamente significative, si possono ritenere praticamente costanti anche il diametro iniziale degli spaghetti ( $\varnothing=2,36\pm 0,07$  mm), la consistenza della pasta cotta sia durante il primo ( $F_{30}=3,4\pm 0,5$  N) che il secondo ( $F_{90}=12,6\pm 0,8$  N) ciclo di compressione e la cosiddetta elasticità (*springiness*), ossia la deformazione ( $S=2,11\pm 0,06$  mm) in corrispondenza della quale il campione, dopo la prima compressione ed adeguato tempo di rilassamento, raggiungeva la massima consistenza durante la seconda compressione.

**Tabella 1.** Effetto della frazione ponderale ( $x_F$ ) di farina ad alto amiloso addizionata alla farina di frumento tenero sulle principali proprietà tecnologiche (tempo di cottura ottimale, OCT; energia di cottura,  $E_S$ ; frazioni dell'acqua di cottura evaporata,  $\eta_{EV}$ , assorbita dalla pasta,  $\eta_{PC}$ , e residua,  $\eta_{PW}$ ; *water uptake*, WU; *cooking loss*, CL; consistenza della pasta cotta  $F_{30}$  e  $F_{90}$ ; elasticità, S; diametro dello spaghetti crudo,  $\varnothing$ ), biochimiche (amido totale, TS; amido resistente, RS) e funzionali (area racchiusa dalla curva di rilascio del glucosio in funzione del tempo, AUC; indice di idrolisi dell'amido, SHI; indice glicemico *in vitro*, IG).

Parametro	Pasta fresca arricchita con farina ad alto amiloso		UdM
$x_F$	0,00	0,50	g/g
OCT	3,5 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	3,0 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>	min
$E_S$	1,81 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	2,02 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	kWh/kg
$\eta_{PW}$	84,2 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	84,7 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	%
$\eta_{PC}$	7,4 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	6,8 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	%
$\eta_{EV}$	8,5 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	8,5 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	%
WU	0,74 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,68 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	g/g
CL	0,070 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	0,077 $\pm$ 0,015 <sup>a</sup>	g/g
$F_{30}$	2,9 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	3,7 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	N
$F_{90}$	11,6 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>	12,8 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	N
S	2,18 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	2,05 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	mm
$\varnothing$	2,46 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	2,30 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	mm
TS	80,0 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	77,4 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>	%
RS	0,59 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	3,64 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	%
AUC	53 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	34 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	g min/L
SHI	66 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	42 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	%
IG	65 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	44 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	%

Il tenore di amido totale (TS) su base secca nei campioni di pasta fresca si riduceva dall'80% al 77% all'aumentare di  $x_F$  da 0 al 0,5 g/g e tendeva per  $x_F=1$  g/g al tenore (75,3 $\pm$ 0,1) riscontrato nella farina ad alto amiloso. Analogamente, anche la frazione di amido resistente (RS), ossia la frazione di amido che non viene idrolizzata nell'intestino tenue e fermentata parzialmente o totalmente nell'intestino crasso (Lal *et al.*, 2021), aumentava da 0,59 a 3,6% nei campioni di pasta fresca cotta esaminati. Infine, per descrivere la cinetica di digestione dell'amido, la concentrazione del glucosio (in g/L) rilasciato simulando la digestione dell'amido nella bocca e nello stomaco attraverso appropriati trattamenti enzimatici è stata diagrammata in funzione del tempo di incubazione (in min). Si è quindi calcolata per via numerica, secondo la regola del trapezio, l'area

racchiusa fra l'asse dei tempi di incubazione ed il digestogramma (AUC) per un tempo complessivo di incubazione di 180 min per ciascun campione. Come evidenziato in Tabella 1, AUC era pari a 53 g min/L, nel caso della pasta fresca a base di farina di frumento tenero ( $x_F=0$  g/g) e si riduceva a  $(34\pm 2)$  g min/L per  $x_F=0,5$  g/g. Il rapporto tra il valore di AUC per ciascun campione e l'area corrispondente per il prodotto di riferimento (cioè un pane bianco con un contenuto di amido di  $83,4\pm 1,7$  g/g dm), è stato definito come l'*indice di idrolisi dell'amido* (SHI), come indicato da Giuberti *et al.* (2015). Il pane bianco ha mostrato i livelli più elevati di AUC ( $91\pm 19$  g min/L) rispetto alla pasta fresca tradizionale e arricchita, come ben noto e supportato da Jenkins *et al.* (1984), che hanno riportato che la risposta glicemica dei soggetti diabetici a seguito del consumo di spaghetti era ridotta rispetto al pane bianco di grano. Pertanto, all'aumentare di  $x_F$  la quantità di zuccheri riducenti rilasciati dalla pasta cotta era significativamente ( $p < 0,05$ ) minore rispetto alla pasta fresca a base di farina di frumento tenero e ciò presumibilmente a causa del maggior contenuto in amilosio (Tabella 1). In questo studio, SHI diminuiva significativamente ( $p < 0,05$ ) dal  $(66\pm 8)$  % per  $x_F=0$  g/g al  $(42\pm 2)$  % per  $x_F= 0,5$  g/g. D'altra parte, la struttura della pasta è stata descritta come una matrice compatta con granuli di amido intrappolati in una rete proteica (Pagani *et al.*, 1986), il che rallenta la digeribilità dell'amido della pasta (Monge *et al.*, 1990).

L'indice di idrolisi SHI ha permesso quindi di stimare l'indice glicemico *in vitro* (IG) utilizzando la formula empirica proposta da Granfeldt *et al.* (1992):

$$IG = 8,198 + 0,862 \times SHI \quad (1)$$

Il concetto di IG è stato introdotto per classificare gli alimenti ad alto tenore glucidico rispetto al loro effetto sulla glicemia post-prandiale. Foster Powell *et al* (2002) classificarono gli alimenti in 3 categorie: a basso ( $\leq 55$ ), medio (55–69) ed alto ( $\geq 70$ ) IG. In questo sistema di classificazione, confermato da Atkinson *et al.* (2021), la pasta fresca arricchita con il 50% di farina ad alto amilosio rientrerebbe nella gamma degli alimenti a basso IG, ossia in quegli alimenti in grado di indurre un piccolo aumento del livello di glucosio nel sangue post-pasto e quindi concorrere a ridurre il rischio a lungo termine di diabete mellito di tipo 2 ed a prevenire l'obesità ed i fattori di rischio metabolico, come le malattie coronariche (Brand-Miller *et al.*, 2003).

### Conclusioni

In sintesi, questo studio ha dimostrato che è possibile arricchire in amilosio la pasta fresca a base di farina di frumento tenero in modo da rallentare la velocità di digestione post-prandiale dell'amido e ridurre l'indice glicemico *in vitro* dal 65% al 44% senza alterarne le principali caratteristiche tecnologiche. Ciò ha consentito di classificare la pasta fresca arricchita in amilosio nella categoria dei prodotti a basso indice glicemico. Ulteriori studi saranno rivolti a validare ulteriormente detti risultati al variare della frazione  $x_F$  e ad accertare la sostenibilità ambientale dalla culla alla tomba della produzione di questo innovativo alimento funzionale.

### Ringraziamenti

Questo lavoro è stato effettuato nell'ambito del progetto "Frumilosio" della Regione Lazio "L.R. 13/2008 - art. 7 Progetti di Gruppi di Ricerca" (Domanda n. 85-2017-14994 - L.R. 13/2008 Prot. 14994).



## Bibliografia

- Ang K., Bourgy C., Fenton H., Regina A., Newberry M., Diepeveen D., Lafiandra D., Grafenauer S., Hunt W., Solah V. 2020. Noodles made from high amylose wheat flour attenuate postprandial glycaemia in healthy adults. *Nutrients*, 12: 2171.
- Atkinson F.S., Brand-Miller J.C., Foster-Powell K., Buyken A.E., Goletzke J. 2021. International tables of glycemic index and glycemic load values 2021: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 114: 1625-1632.
- Birt D.F., Boylston T., Hendrich S., Jane J.-L., Hollis J., Li L., McClelland J., Moore S., Phillips G.J., Rowling M., Schalinske K., Scott M.P., Whitley E.M. 2013. Resistant starch: promise for improving human health. *Advances in Nutrition*, 4: 587-601.
- Botticella E., Sestili F., Sparla F., Moscatello S., Marri L., Cuesta-Seijo J.A., Falini G., Battistelli A., Trost P., Lafiandra D. 2018. Combining mutations at genes encoding key enzymes involved in starch synthesis affects the amylose content, carbohydrate allocation and hardness in the wheat grain. *Plant Biotechnology Journal*, 16: 1723-1734.
- Brand-Miller J., Hayne S., Petocz P., Colagiuri S. 2003. MD Low-glycemic index diets in the management of diabetes: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes Care*, 26(8): 2261-67.
- Cimini A., Cibelli M., Messia M.C., Marconi E., Moresi M. 2019a. Cooking quality of commercial spaghetti: Effect of the water-to-dried pasta ratio. *European Food Research and Technology*, 245(5): 1037-1045.
- Cimini A., Cibelli M., Messia M.C., Moresi M. 2019b. Commercial short-cut extruded pasta: Cooking quality and carbon footprint vs. water-to-pasta ratio. *Food and Bioproducts Processing*, 116: 150-159.
- Cimini A., Cibelli M., Moresi M. 2019c. Reducing the cooking water-to-dried pasta ratio and environmental impact of pasta cooking. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99: 1258-1266.
- Cimini A., Cibelli M., Moresi M. 2020. Development and assessment of a home eco-sustainable pasta cooker. *Food and Bioproducts Processing*, 122: 291-302.
- D'Egidio M.G., Mariani B.M., Nardi S., Novaro P., Cubadda R. 1990. Chemical and technological variables and their relationships: a predictive equation for pasta cooking quality. *Cereal Chemistry*, 67: 275-281.
- Foster-Powell K., Holt S.H.A., Brand-Miller J.C. 2002. International table of glycemic index and glycemic load values: 2002. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76: 5-56.
- Giuberti G., Gallo A., Cerioli C., Fortunati P., Masoero F. 2015. Cooking quality and starch digestibility of gluten free pasta using new bean flour. *Food Chemistry*, 175: 43-49.
- Granfeldt Y., Björck I., Drews A., Towar J. 1992. An in vitro procedure based on chewing to predict metabolic responses to starch in cereal and legume products. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46: 649-660.
- ISO 2016. *Durum wheat semolina and alimentary pasta - Estimation of cooking quality of alimentary pasta by sensory analysis - Part 1: Reference method. ISO n. 7304-1*. Vernier, Geneva, CH: International Organization for Standardization.
- Jenkins D.A., Wolever T.M.S., Thorne M.J., Wong G.S., Josse R.G., Csima A. 1984. The relationship between glycemic response, digestibility, and factors influencing the dietary habits of diabetics. *American Journal of Clinical Nutrition*, 40(6): 1175-1191.
- Lal M.K., Singh B., Sharma S., Singh M.P., Kumar A. 2021. Glycemic index of starchy crops and factors affecting its digestibility: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 111: 741-755.
- Monge L., Cortassa G., Fiocchi F., Mussino G., Carta Q. 1990. Glyco-insulinaemic response, digestion and intestinal absorption of the starch contained in two types of spaghetti. *Diabetes, Nutrition & Metabolism*, 3: 239-246.
- Newberry M., Berbezy P., Belobrajdic D., Chapron S., Tabouillot P., Regina A., Bird A. 2018. High-amylose wheat foods: a new opportunity to meet dietary fiber targets for health. *Cereal Foods World*, 63(5): 188-193.
- Pagani M.A., Gallant D.J., Bouchet B., Resmini P. 1986. Ultrastructure of cooked spaghetti. *Food Microstructure*, 5: 111-129.
- Regina A., Berbezy P., Kosar-Hashemi B., Li S., Cmiel M., Larroque O., Bird A.R., Swain S.M., Cavanagh C., Jobling S.A., Li Z., Morell M. 2015. A genetic strategy generating wheat with very high amylose content. *Plant Biotechnol Journal*, 13: 1276-1286.
- Slade A.J., McGuire C., Loeffler D., Mullenberg J., Skinner W., Fazio G., Holm A., Brandt K.M., Steine M.N., Goodstal J.F., Knauf V.C. 2012. Development of high amylose wheat through TILLING. *BMC Plant Biology*, 12: 69.
- Zou W., Sissons M., Gidley M.J., Gilbert R.G., Warren F.J. 2015. Combined techniques for characterising pasta structure reveals how the gluten network slows enzymic digestion rate. *Food Chemistry*, 188: 559-568.

## **Valutazione dell'attitudine alla trasformazione di una varietà di frumento alto amiloso e utilizzo di uno sfarinato tipo-semola per la produzione di pasta**

*E. De Arcangelis<sup>1,2\*</sup>, M.C. Trivisonno<sup>2</sup>, M. Angelicola<sup>2</sup>, M. Quiquero<sup>2</sup>, V. Di Nardo<sup>2</sup>, S. Iacovino<sup>2</sup>, L. Falasca<sup>2</sup>, F. Sestili<sup>3</sup>, M. C. Messia<sup>2</sup>, E. Marconi<sup>1,2,4</sup>*

<sup>1</sup>Facoltà Dipartimentale di Scienze e Tecnologie per l'Uomo e l'Ambiente (STUA), Università Campus Bio-Medico di Roma, Via Álvaro del Portillo 21, 00128 Roma (RM).

<sup>2</sup>Dipartimento Agricoltura, Ambiente e Alimenti (DiAAA), Università degli Studi del Molise, Via Francesco De Sanctis snc, 86100 Campobasso (CB).

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali, Università della Tuscia, Via San Camillo de Lellis, SNC, 01100 Viterbo (VT).

<sup>4</sup>Centro Interateneo di Eccellenza per la Ricerca e l'Innovazione su Pasta e Cereali trasformati (CERERE), 86100 Campobasso (CB).

\*E-mail: [elisa.dearcangelis@unicampus.it](mailto:elisa.dearcangelis@unicampus.it)

### **Abstract**

The objective of this study was the evaluation of a durum wheat mill diagram applied to a high amylose bread wheat, assessing the physico-chemical properties of derived semolina-type flour and the nutritional and cooking properties of five pasta formulations. The application of debranning and hard- wheat milling to a high amylose bread wheat substantially enhanced the refining rate and yields of flours compared to a conventional milling diagram. High amylose semolina-type flour is characterized by a remarkable resistant starch content, equal to 29% over total starch, compared to the value <1% in commercial semolina; moreover, it is well suitable for pasta production, defining a decrease of starch digestibility and expected glycemic index, coupled with a good overall acceptability.

### **Riassunto**

L'obiettivo di questo studio è stato la valutazione dell'applicazione di un diagramma di macinazione per grano duro su granella di frumento tenero alto amiloso, studiando le caratteristiche chimico-fisiche dello sfarinato tipo-semola, le proprietà nutrizionali e la qualità di cottura di cinque formulazioni di pasta. Complessivamente, la macinazione con mulino per grano duro con preventiva decorticazione ha permesso di migliorare le rese e il tasso di raffinazione degli sfarinati rispetto all'applicazione di un diagramma convenzionale per grano tenero. La semola alto amiloso si caratterizza per una proporzione di amido resistente pari al 29% su amido totale, rispetto al valore <1% della semola commerciale. La pasta ottenuta dall'inclusione della semola alto amiloso ha dimostrato significative riduzioni della digeribilità dell'amido e dell'indice glicemico atteso, assieme ad una buona accettabilità complessiva.

### **Introduzione**

L'impiego di grani ad alto contenuto di amiloso per la produzione di alimenti innovativi rappresenta una valida strategia per migliorare la qualità nutrizionale di prodotto a base di cereali. Infatti, essi presentano una elevata percentuale di amido resistente (fino a circa il 10%) (Bird e Regina, 2018) ossia una porzione dell'amido che resiste alla digestione nell'intestino tenue, e i cui benefici sono analoghi a quelli apportati dalla fibra alimentare (Nugent, 2005). Dall'analisi della letteratura emerge che le modifiche del pathway biosintetico dell'amido si traducono in alterate proprietà della granella di frumento tenero alto amiloso e degli sfarinati derivati, e tra queste, di particolare rilievo, risulta essere l'elevata durezza della cariosside (> 80 HI) (Schönhofen *et al.*, 2017; Botticella *et al.*, 2018). L'obiettivo di questo studio è stato valutare le caratteristiche di sfarinati ottenuti dalla macinazione di una varietà di frumento tenero ad alto contenuto di amiloso applicando un diagramma di macinazione con mulino per grano duro. Ulteriormente, sono stati

valutati gli effetti dell'inclusione di uno sfarinato tipo-semola nella formulazione di pasta, sulle caratteristiche chimico-fisiche e nutrizionali del prodotto finito.

## Materiali e metodi

### *Grano*

Campioni di grano tenero alto amiloso cv Cadenza (*high amylose*-HA) e controllo (*normal starch*-NS) sono stati forniti dall'Università della Tuscia e ottenuti presso i campi sperimentali "Nello Lupori" nell'annata agraria 2017/2018. Per le analisi, i campioni sono stati macinati con macinino refrigerato da laboratorio.

### *Caratterizzazione della granella*

Il peso ettolitrico (kg/hL) è stato misurato con una bilancia di Schopper. Il peso mille semi e la durezza sono stati misurati con Perten SKCS 4100 (Perten Instruments, Sweden).

### *Macinazione*

Aliquote di grano *high amylose* e *normal starch* sono state sottoposte a macinazione convenzionale (NAMAD SG2000, Rome, Italy) con preventiva bagnatura (umidità finale=17%) (Diagramma 1). Data la maggiore durezza della cariosside del grano alto amiloso, la cariosside è stata decorticata al 6% e sottoposta ad una macinazione con mulino per grano duro (Bühler, Uzwil, Switzerland) con preventiva bagnatura (umidità finale=14%) (Diagramma 2) ottenendo 3 frazioni di rottura, 3 di rimacina, uno sfarinato tipo-semola, la crusca e il cruschetto.

### *Produzione di pasta*

Sono state prodotte 5 formulazioni di pasta miscelando la semola alto amiloso con semola commerciale (100/0 – P100HA; 30/70 – P30HA, 50/50 – P50HA; 70/30 -P30HA; 0/100 -P100S) e l'impasto sottoposto a estrusione in formato tagliatelle. La pasta fresca è stata essiccata a 30°C per 24 ore al fine di valutare il solo effetto dello sfarinato alto amiloso sulle caratteristiche del prodotto finito.

### *Analisi chimiche e granulometria degli sfarinati*

Umidità, ceneri e proteine sono state determinate secondo i metodi ICC 110/1, 104/1 e AOAC 992.23. Amiloso, amido totale (AACC 76-13.01), amido resistente (AOAC method 2002.02) e fibra totale (AOAC method 985.29) sono stati determinati con kit enzimatici (Megazyme Ltd, Ireland). La granulometria degli sfarinati è stata determinata con setacciatore analitico (Bühler, Uzwil, Switzerland).

### *Indice glicemico atteso e proprietà di cottura della pasta*

Le proprietà di digestione in vitro dell'amido sono state valutate sulle paste cotte al tempo di cottura ottimale secondo Romano *et al.* (2016). L'indice di idrolisi dell'amido (HI) è stato calcolato a partire dall'area sottesa alla curva di idrolisi, in riferimento a quella del pane bianco, e l'indice glicemico atteso calcolato secondo la formula  $eGI = 39.71 + 0.549HI$  (Goñi *et al.*, 1997). La qualità di cottura è stata valutata secondo la norma ISO 7304-1, da un panel addestrato, assegnando un punteggio ai descrittori: nervo, collosità e ammassamento.

### *Analisi statistica*

Sui dati ottenuti è stata eseguita l'analisi ANOVA e test *post-hoc*, definendo come statisticamente significativi i risultati con  $p < 0.05$ .

## Risultati

In Tabella 1 sono riportate le caratteristiche chimico-fisiche delle due tipologie di grano (alto amiloso, HA; normal starch- NS). Il grano alto amiloso ha presentato un maggiore peso 1000 semi rispetto al grano controllo, insieme ad una durezza (HI) significativamente più elevata (89

vs 62). Dal punto di vista chimico nutrizionale, significativo è il dato della fibra (+23%), mentre dal punto di vista della caratterizzazione dell'amido, l'amilosio è risultato pari al 58% nel grano HA contro il 23% del grano NS. In coerenza con i dati di letteratura, l'amido resistente è risultato decisamente elevato (10%), contrapposto al valore quasi nullo del grano controllo.

Dalla macinazione convenzionale (Diagramma 1 - Tab. 2) di grano alto amilosio e di grano controllo è emerso che la resa di macinazione della farina (frazioni di rottura e di rimacina) ottenuta dal grano alto amilosio è sensibilmente più bassa (49,5%) rispetto al genotipo normale (65,7%) e, inoltre, lo sfarinato ottenuto nel complesso presenta un più elevato tenore in ceneri (0,88% s.s) rispetto allo sfarinato a composizione normale di amido (0,49% s.s.), in linea con studi precedenti (Hogg & Giroux, 2019). L'applicazione di un protocollo di macinazione con mulino per grano duro abbinato ad una preventiva decorticazione ha determinato un miglioramento significativo della resa degli sfarinati, la quale, includendo anche lo sfarinato-tipo semola, è risultata pari al 66,3%. Ulteriormente, di rilievo è il dato relativo al tenore in ceneri nella semola, che ha evidenziato una sensibile riduzione rispetto al diagramma 1, pari al 0,70% s.s.

**Tabella 1.** Caratteristiche della granella (valore medio  $\pm$  ds)

	Peso 1000 semi (g)	Peso Ettolitrico (kg/hL)	Durezza a (HI)	Ceneri (% s.s.)	Proteine (% s.s.)*	Fibra totale (% s.s.)	Amido totale (% s.s.)	Amilosio (%)	Amido resistente (% s.s.)
<b>Grano HA</b>	43.5 $\pm$ 0.51 a	74.4 $\pm$ 0.14 a	89 $\pm$ 16a	2.13 $\pm$ 0.03 a	11.7 $\pm$ 0.07 a	15.2 $\pm$ 0.35 a	61.0 $\pm$ 0.46 a	58.1 $\pm$ 1.93 a	10.0 $\pm$ 1.37 a
<b>Grano NS</b>	39.7 $\pm$ 0.90 b	76.4 $\pm$ 0.49 b	62 $\pm$ 15b	1.94 $\pm$ 0.03 b	10.6 $\pm$ 0.02 b	12.3 $\pm$ 0.80 b	65.5 $\pm$ 0.12 b	23.4 $\pm$ 0.33 b	0.3 $\pm$ 0.21b

\*Nx5.70

**Tabella 2.** Resa e tenore in ceneri (valori medi) degli sfarinati ottenuti nelle diverse prove di macinazione

	Grano HA Diagramma 1		Grano NS Diagramma 1		Grano HA Diagramma 2	
	Resa (%)	Ceneri (% s.s.)	Resa (%)	Ceneri (% s.s.)	Resa (%)	Ceneri (% s.s.)
<b>Frazioni di Rottura</b>	10.2	1.24	17.8	0.52	17.2	0.78
<b>Frazioni di Rimacina</b>	39.2	0.79	47.8	0.47	15.0	0.85
<b>Semola</b>	-	-	-	-	34.1	0.70
<b>Totale sfarinato</b>	49.5	0.88	65.7	0.49	66.3	0.75
<b>Tot. scarti di macinazione</b>	48.8	2.86	33.0	3.58	25.6	4.28
<b>Totale scarti di decorticazione</b>	-	-	-	-	6.0	6.68

In Tabella 3 sono riportate le caratteristiche compositive e la granulometria media dello sfarinato tipo- semola alto amilosio, in confronto con una semola commerciale. Di rilievo è il dato relativo al tenore di fibra alimentare, più di 3 volte maggiore nella semola alto amilosio, dovuto al maggiore livello di amido resistente. Quest'ultimo infatti è presente in proporzione pari al 29% su amido totale, rispetto a valori quasi nulli nella semola commerciale. Dal punto di vista della granulometria, lo sfarinato tipo semola alto amilosio si configura con dimensione medie perlopiù comprese tra 300  $\mu$ m e 477  $\mu$ m (74.8%), in maniera analoga alla semola commerciale (59.1%), la quale evidenzia anche una maggiore proporzione di particelle con diametro > 477  $\mu$ m.

**Tabella 3.** Caratteristiche compositive e granulometria della semola alto amilosio e della semola commerciale

	Proteine N×5.70 (% s.s.)	Fibra alimentare (% s.s.)	Amido totale (% s.s.)	Amido resistente (% amido totale)	Amilosio (%)	>477 µm %	>355 µm %	>300 µm %	>183 µm %	>85 µm %	<85 µm %
<b>Semola alto amilosio</b>	10.4±0.12b	8.6±0.23a	69.1±2.38b	29.1±0.59a	57.8±2.12a	2.8	16.3	58.5	19.3	1.8	0.7
<b>Semola commerciale</b>	14.2±0.04a	2.6±0.33b	78.6±1.14a	0.6±0.24b	34.7±0.8b	7.6	19.3	39.8	17.0	10.8	4.7

In Tabella 4 sono evidenziate le caratteristiche nutrizionali delle paste. Analizzando i dati sulla pasta cruda, emerge un valore di fibra alimentare nettamente superiore nelle formulazioni con semola HA (4.3-9.3% s.s.) rispetto alla pasta controllo. L'amido resistente ha raggiunto valori di 15.3% su amido totale nella formulazione con sola semola HA (P100HA), garantendo la possibilità di applicare il claim salutistico relativo all'amido resistente (14% su amido totale). L'elevato tenore di amido resistente permane dopo cottura (Tab. 5), raggiungendo un valore compreso tra 8.4-19.4% su amido totale, rispetto al valore di 2.2% della pasta controllo. Il contenuto di amido resistente delle paste sperimentali ha determinato una sensibile riduzione della digeribilità dell'amido. Infatti, dati rilevanti sono stati ottenuti dalla valutazione dell'indice glicemico in vitro, risultato significativamente ridotto nelle paste sperimentali, rispetto al controllo. Dal punto di vista sensoriale, le paste hanno dimostrato una buona accettabilità, eccetto la pasta costituita da sola semola HA che ha ottenuto il punteggio più basso, pari a 32.

**Tabella 4.** Caratteristiche compositive delle paste sperimentali (valore medio ±ds)

	Proteine* (% s.s.)	Amido totale (% s.s.)	Fibra totale (% s.s.)	Amido resistente (% s.s.)	Amido resistente (% amido totale)
<b>P30HA</b>	12.9±0.00b	72.0±0.05b	4.3±0.32 c	3.4±0.63c	4.9±0.91d
<b>P50HA</b>	12.1±0.02c	70.2±0.56c	6.0±0.88 b	5.4±0.52bc	7.7±0.64c
<b>P70HA</b>	11.3±0.01d	70.5±1.11c	7.3±0.65 b	7.2±0.80b	10.3±1.13b
<b>P100HA</b>	10.3±0.01e	64.1±0.21d	9.3±0.30 a	9.8±0.05a	15.3±0.16a
<b>P100S</b>	13.9±0.01a	75.9±4.12a	3.5±0.24 d	0.5±0.01d	0.7±0.01e

\*N×5.70

**Tabella 5.** Caratteristiche nutrizionali e qualità di cottura delle paste sperimentali (valore medio ±ds)

	Amido resistente (% amido totale)	Indice glicemico atteso	Punteggio alla qualità di cottura
<b>P30HA</b>	8.4±0.58d	51.4±0.09b	59
<b>P50HA</b>	13.3±0.35c	50.9±0.07c	58
<b>P70HA</b>	16.0±1.41b	49.5±0.01d	55
<b>P100HA</b>	19.4±0.10a	48.0±0.25e	32
<b>P100S</b>	2.2±0.03e	53.8±0.06a	68

## Conclusioni

I risultati di questo studio indicano che un diagramma molitorio per grano duro con preventiva decorticazione ha contribuito ad una migliore prestazione in macinazione del grano alto amilosio, ottenendo un prodotto tipo-semola. I risultati evidenziano come gli sfarinati alto amilosio possano essere inclusi nelle formulazioni di alimenti innovativi al fine dell'apposizione del claim salutistico relativo all'amido resistente, che prescrive una proporzione di almeno il 14% sull'amido totale (Reg. UE 432/212). Complessivamente i dati sottolineano un'ottima adattabilità dello sfarinato tipo-semola alto amilosio alla produzione di pasta, con un potenziamento delle caratteristiche nutrizionali e una riduzione dell'indice glicemico atteso. È tuttavia ipotizzabile un netto miglioramento delle caratteristiche sensoriali delle paste alto amilosio attraverso l'utilizzo di diagrammi di essiccazione ad alte/medie temperature o l'impiego di glutine vitale nella formulazione.

## **Ringraziamenti**

Questo studio è stato finanziato dal progetto “Frumilosio” Regione Lazio "L.R. 13/2008 - art. 7 Progetti di Gruppi di Ricerca” (Domanda n. 85-2017-14994 - L.R. 13/2008 Prot. 14994).

## **Bibliografia**

- Botticella E., Sestili F., Sparla F., Moscatello S., Marri L., Cuesta-Seijo J. A., Falini G., Battistelli A., Trost P., Lafiandra D. 2018. Combining mutations at genes encoding key enzymes involved in starch synthesis affects the amylose content, carbohydrate allocation and hardness in the wheat grain. *Plant Biotechnology Journal*, 16(10): 1723-1734.
- Goñi I., Garcia-Alonso A., Saura-Calixto F. 1997. A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Nutrition Research*, 17(3): 427-437.
- Hogg A.C., Giroux M. J. 2019. Milling and baking quality of hexaploid spring wheat starch synthase IIa (ssIIa) mutants with elevated amylose content. *Cereal Chemistry*, 96(3): 532-544.
- Nugent A. P. 2005. Health properties of resistant starch. *Nutrition Bulletin*, 30(1): 27-54.
- Romano A., Mackie A., Farina F., Aponte M., Sarghini F., Masi P. 2016. Characterisation, in vitro digestibility and expected glycemic index of commercial starches as uncooked ingredients. *Journal of Food Science and Technology*, 53(12): 4126-4134.
- Schönhofen A., Zhang X., Dubcovsky J. 2017. Combined mutations in five wheat STARCH BRANCHING ENZYME II genes improve resistant starch but affect grain yield and bread-making quality. *Journal of Cereal Science*, 75: 165-174.

## Bio-fortificazione in provitamina A della granella di frumento duro

S. Palombieri<sup>1\*</sup>, M. D. Garcia Molina<sup>1</sup>, G. Gambacorta<sup>1</sup>, R. Beleggia<sup>2</sup>, P. De Vita<sup>2</sup>, E. Botticella<sup>1,3</sup>, D. Lafiandra<sup>1</sup>, S. Masci<sup>1</sup>, F. Sestili<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Università degli Studi della Tuscia, DAFNE, Via San Camillo de Lellis snc, 01100 Viterbo (VT).

<sup>2</sup>Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria (CREA), Centro di Ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali (CREA-CI), S.S. 673, Km 25+200, 71122 Foggia (FG).

<sup>3</sup>Consiglio Nazionale delle Ricerche-Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (CNR-ISPA), Via provinciale Lecce-Monteroni 73100 Lecce (LE).

\*E-mail: [palombieri@unitus.it](mailto:palombieri@unitus.it)

### Abstract

Vitamin A deficiency represents one of the major causes of malnutrition, which affects the world population and can cause serious health, economic and social consequences. Vitamin A cannot be synthesized by humans but must be introduced through the diet. As it is difficult to provide a balanced diet accessible to low-income populations, bio-fortification of staple crops through genetic improvement can be a viable strategy. In durum wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*)  $\beta$ -carotene, precursor of vitamin A, is present only in trace amounts. In this work, TILLING mutants were identified for the enzymes lycopene  $\epsilon$ -cyclase (LCYE) and  $\beta$ -carotene hydroxylase (HYD1) which are, respectively, involved in targeting the synthesis pathway towards lutein and catalyzing the turnover of  $\beta$ -carotene in xanthophylls. Complete null LCYE and HYD1 mutant genotypes showed a significant increase of more than 70% of  $\beta$ -carotene compared to wild-type lines. This study provides more insights into the molecular mechanism governing the biosynthesis of carotenoids in durum wheat and the resulting lines represent good material for future breeding programs.

### Riassunto

La deficienza di vitamina A rappresenta una delle maggiori cause di malnutrizione per la popolazione mondiale e può provocare gravi conseguenze sanitarie, economiche e sociali. La vitamina A non può essere sintetizzata dall'uomo ma deve essere introdotta attraverso la dieta. Poiché è difficile fornire una dieta equilibrata accessibile alle popolazioni con basso reddito, la bio-fortificazione delle colture di base attraverso il miglioramento genetico può rappresentare una valida strategia. Nel frumento duro (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) il  $\beta$ -carotene, precursore della vitamina A, è presente solo in tracce. In questo lavoro, sono stati identificati mutanti TILLING per gli enzimi licopene  $\epsilon$ -ciclastasi (LCYE) e  $\beta$ -carotene idrossilasi (HYD1) che sono, rispettivamente, coinvolti nell'indirizzare il *pathway* di sintesi verso la luteina e nel catalizzare il *turnover* del  $\beta$ -carotene nelle xantofille. I genotipi mutanti nulli LCYE e HYD1 hanno mostrato un aumento significativo di oltre il 70% di  $\beta$ -carotene rispetto alle linee *wild-type*. Questo studio fornisce maggiori delucidazioni sul meccanismo molecolare che governa la biosintesi dei carotenoidi in frumento duro e le linee ottenute rappresentano un buon materiale per futuri programmi di breeding.

### Introduzione

Vitamine e minerali sono elementi essenziali per la crescita e il metabolismo e sono indicati come micronutrienti, poiché sono necessari in piccole dosi per il corretto funzionamento dell'organismo. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha recentemente stimato che più di due miliardi di persone soffrono di carenze di vitamine e minerali, una forma di malnutrizione chiamata fame nascosta (WHO). La causa è spesso un'alimentazione sbagliata o insufficiente, o un aumento del

fabbisogno di micronutrienti, come avviene durante la gravidanza e l'allattamento, o durante malattie o infezioni. Questa carenza ha conseguenze negative sia per lo sviluppo e la crescita dei bambini, che per la salute e il funzionamento fisico e mentale degli adulti. I suoi effetti possono essere devastanti, ma spesso restano invisibili: ecco perché la carenza di micronutrienti è chiamata "fame nascosta". Le carenze più gravi che colpiscono la salute e lo sviluppo di bambini e adulti sono dovute alla mancanza di quattro micronutrienti principali: iodio, ferro, zinco e vitamina A. In particolare, la carenza di vitamina A è stata definita dall'OMS come il principale problema nutrizionale che affligge i Paesi a reddito medio e basso (WHO). Questa carenza è causata da un inadeguato apporto alimentare cronico di vitamina A e dei suoi precursori metabolici, come il  $\beta$ -carotene. La vitamina A (retinolo) e i suoi derivati sono nutrienti chiave necessari per il corretto funzionamento del sistema visivo, immunitario e riproduttivo, il mantenimento della funzione e della differenziazione cellulare, il mantenimento dell'integrità epiteliale ed il processo di ematopoiesi (Sommer, 2008). I disturbi di carenza di vitamina A vanno dalle manifestazioni oculari della xerofthalmia a disturbi generici, come la cecità notturna, malfunzionamento del sistema immunitario, anemia, e aumento della mortalità infantile causata da morbillo, diarrea e infezioni generali (Imdad *et al.*, 2011; Underwood *et al.*, 1978). Poiché la vitamina A non può essere sintetizzata dall'uomo, questo micronutriente o i suoi precursori metabolici devono essere forniti dalla dieta (Fairfield *et al.*, 2002).

La bio-fortificazione in provitamina A dei principali alimenti di base attraverso l'ingegneria metabolica è considerata una strategia efficace e a lungo termine (Nissar *et al.*, 2015). Questo approccio ha molteplici vantaggi. In primo luogo, sfrutta l'assunzione giornaliera regolare di una quantità consistente di alimenti di base che predominano nelle diete delle famiglie a basso e medio reddito (che sono maggiormente colpite dalla fame nascosta). In secondo luogo, dopo l'investimento iniziale per produrre la varietà biofortificata, i costi ricorrenti sono bassi e il germoplasma può essere condiviso a livello internazionale. La bio-fortificazione fornisce uno strumento per raggiungere le popolazioni denutrite in aree rurali relativamente remote, fornendo cibi fortificati naturalmente a persone con accesso limitato a una dieta diversificata.

Dal 1990 sono stati pubblicati numerosi lavori, incentrati sull'ingegneria metabolica delle vie dei carotenoidi nelle piante coltivate (Giuliano, 2017; Giuliano *et al.*, 2008). Le diverse strategie applicate possono essere così riassunte: 1) la *Push strategy* agisce sul flusso metabolico a monte della via biosintetica, attraverso la sovra espressione di uno o più enzimi coinvolti nelle reazioni iniziali; 2) la *block strategy* consiste nel silenziamento dei geni posti a valle lungo la via metabolica o di quelli coinvolti nelle vie competitive e porta all'accumulo del metabolita di interesse. Il silenziamento di geni *target* può essere ottenuto attraverso la strategia *Targeting Induced Local Lesion in Genome*, TILLING. Questa tecnica di genetica inversa combina la mutagenesi classica con tecniche ad alta processività per il rilevamento di mutazioni puntiformi (McCallum *et al.*, 2000). Questo approccio è stato applicato con successo in numerose specie vegetali e permette il miglioramento di varietà/cultivar già selezionate, mediante l'introduzione di nuova variabilità, senza produrre genotipi geneticamente modificati. Il TILLING permette di generare mutanti *knock-out*, ossia genotipi caratterizzati dalla perdita di funzione del gene d'interesse utili per la *block strategy*.

Il frumento duro è una coltura importante per i Paesi del bacino mediterraneo e funge da principale fonte di calorie e proteine nonostante sia carente in alcuni micronutrienti essenziali, tra cui la provitamina A. La cariosside di frumento duro accumula prevalentemente luteina che conferisce il classico colore giallo alla semola. Tuttavia, il principale precursore della vitamina A è, il  $\beta$ -carotene che sfortunatamente nella granella di frumento duro è presente solo in tracce.

Lo scopo di questo lavoro è aumentare la biodisponibilità del  $\beta$ -carotene in frumento duro attraverso un approccio *block strategy* utilizzando una piattaforma TILLING della cv. di frumento duro Kronos. In particolare, sono state identificate mutazioni con perdita di funzione nei geni *lycopeno  $\epsilon$ -cyclase* (*lcyE*) e nel gene  *$\beta$ -carotene idrossilasi 1* (*hyd1*). L'enzima LCYE ha la



funzione di deviare la via metabolica dal  $\beta$ -carotene alla biosintesi della luteina mentre l'enzima HYD1 catalizza il *turnover* del  $\beta$ -carotene verso le xantofille (Fig. 1).

## **Materiali e metodi**

### ***Materialie vegetale***

Due mutanti LCYE (Kronos2426 privo dell'omeoallele *LCYE-A* e Kronos3179 privo dell'omeoallele *LCYE-B*) e due linee mutanti HYD1 (Kronos2017 privo dell'omeoallele *HYD-A1* e Kronos4413 privo dell'omeoallele *HYD-B1*) sono stati identificati attraverso la ricerca *in silico* nella piattaforma TILLING disponibile presso l'Università di Davis (Krasileva *et al.*, 2017).

Per ottenere genotipi *knock-out* per il gene *lcyE* le due mutazioni sono state piramidate attraverso l'incrocio dei due mutanti omozigoti sopra descritti. La progenie F<sub>1</sub> è stata autofecondata e la selezione dei diversi genotipi è stata condotta sulla successiva generazione F<sub>2</sub>. La stessa strategia sopra descritta è stata utilizzata per ottenere mutanti *loss of fuction* del gene *hyd1*.

Le linee mutanti selezionate e le piante di controllo (cv. Kronos) sono state vernalizzate a 4° C per 15 giorni. Le condizioni di crescita sono state 20/24 °C con un periodo di luce di 16 h e un'intensità luminosa di 300  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

### ***Identificazione linee loss of fuction per lcyE e hyd1***

I mutanti della progenie F<sub>2</sub> ottenuta dall'incrocio LCYE-A<sup>-</sup> × LCYE-B<sup>-</sup> sono stati selezionati attraverso un approccio di *marker assisted selection* (MAS) basato sull'*High Resolution Melting* (HRM) *genotyping* come descritto in Sestili *et al.* (2019). Per ottenere genotipi *loss of fuction* per il gene *hyd1* è stata utilizzata la stessa strategia dei mutanti LCYE come descritto in Garcia Molina *et al.* (2020).

### ***Estrazione dei carotenoidi e analisi HPLC- Diode Array Detector (DAD)***

L'estrazione dei pigmenti carotenoidi dalle cariossidi e la rispettiva analisi in HPLC-Diode Array Detector (DAD) sono state effettuate come descritto in Sestili *et al.* (2019) per i mutanti LCYE e come descritto in Garcia Molina *et al.* (2020) per i mutanti HYD1.

## **Risultati e discussioni**

### ***Identificazione di mutanti TILLING loss of fuction per i geni lcyE-A1 e -B1 e pyramiding delle mutazioni***

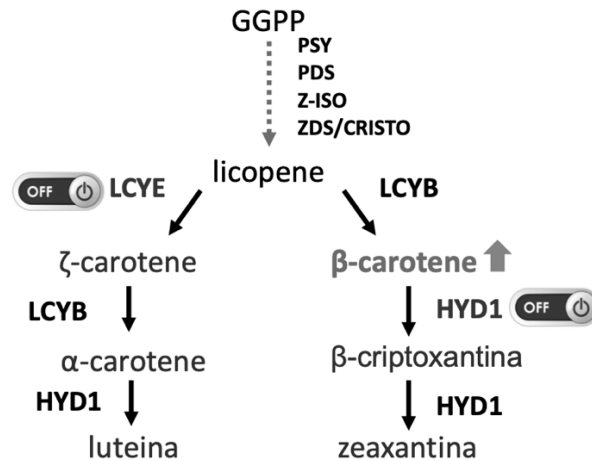
Al fine di indirizzare il substrato licopene verso la sintesi del  $\beta$ -carotene (Fig. 1), sono stati identificati mutanti TILLING per i geni *lcyE* che codificano per l'enzima licopene  $\varepsilon$ -ciclasi coinvolto nella ciclizzazione del licopene. L'analisi *in silico* ha consentito l'identificazione di due linee mutanti che possiedono mutazioni deleterie rispettivamente sugli alleli *lcyE-A1* e *-B1*. La linea Kronos2426 presenta una mutazione non senso nell'esone 9 dell'omeoallele *lcyE-A1*, mentre la linea Kronos3179 possiede una mutazione nel sito di splicing situata nella regione 3' dell'introne 6 dell'omeoallele *lcyE-B1*. Per combinare i due alleli nulli *lcyE* in un unico genotipo, la progenie F<sub>2</sub> dell'incrocio LCYE-A1<sup>-</sup> × LCYE-B1<sup>-</sup> è stata analizzato utilizzando la *HRM genotyping*. L'analisi ha permesso di discriminare le curve di melting prodotte dagli ampliconi dei genotipi omozigoti, eterozigoti, e *wild type* per ciascun omeoallele. Dall'analisi di 89 piante F<sub>2</sub>, 5 sono risultate con genotipo LCYE-A1<sup>-</sup>B1<sup>-</sup>, 7 con genotipo LCYE-A1<sup>-</sup>, 3 con genotipo LCYE-B1<sup>-</sup> e 7 con genotipo *wild type* (WT); le rimanenti piante sono eterozigoti per uno o entrambi gli alleli.

### ***Identificazione di mutanti TILLING loss of fuction per i geni hyd1E-A1 e -hyd1-B1 e pyramiding delle mutazioni***

Al fine di limitare l'idrossilazione del  $\beta$ -carotene nelle xantofille neoxantina, violaxantina e zeaxantina (Fig. 1) sono stati identificati mutanti TILLING per i geni *hyd1* che codificano per l'enzima  $\beta$ -carotene idrossilasi 1. L'analisi *in silico* ha consentito l'identificazione di due linee

mutanti che possiedono mutazioni deleterie rispettivamente sugli alleli *hyd-A1* e *-B1*. La linea Kronos2017 presenta una mutazione al 3° sul sito di splicing nell'esone 2 dell'omeoallele *hyd-A1*, mentre la linea Kronos4413 possiede una mutazione non senso nell'esone 3 dell'omeoallele *hyd-B1*. Per piramidare i due alleli nulli *hyd1* si è utilizzato la stessa strategia di incrocio e selezione sopra descritta per le linee LCYE.

Dall'analisi di 81 piante F<sub>2</sub>, 8 sono risultate con genotipo HYD-A1<sup>-</sup>B1<sup>-</sup>; 4 con genotipo HYD-A1, 4 con genotipo LCYE-B1<sup>-</sup> e 4 con genotipo WT; le rimanenti piante sono eterozigoti per uno o entrambi gli alleli.



**Figura 1.** Via metabolica dei carotenoidi. Geranil-geranil difosfato (GGPP); fitoene sintasi 1, PSY1; fitoene desaturasi, PDS; ζ-carotene isomerasi Z-ISO; zeta carotene desaturasi, ZDS; carotenoide isomerasi, CRISTO; licopene ε-ciclastasi, LCYE; licopene β-ciclastasi, LCYB; β-carotene idrossilasi, HYD.

### **Analisi del contenuto dei carotenoidi in cariossidi**

Per studiare l'effetto del silenziamento dei geni *lcyE* e *hyd1* sulla via dei carotenoidi, sono stati analizzati i metaboliti prodotti a partire dal licopene per ciascuna linea mutante. L'analisi dei singoli carotenoidi nelle cariossidi ha confermato la luteina come il composto più abbondante nel *wild-type* e nei singoli mutanti LCYE-A1<sup>-</sup> e LCYE-B1<sup>-</sup>. Al contrario, il silenziamento completo dei geni *lcyE* ha bloccato la via responsabile della sintesi di α-carotene e luteina ed ha favorito l'accumulo di β-carotene, aumentato (+75%) nelle cariossidi dei mutanti doppio nulli rispetto al controllo. Nei mutanti HYD1 non si sono riscontrate differenze significative per i singoli carotenoidi ad eccezione del β-carotene che è aumentato del 70% nel mutante doppio nulli rispetto al controllo. La presenza delle xantofille e di luteina nelle linee silenziate per *hyd1* lascia ipotizzare la presenza di altri enzimi complementari coinvolti nell'idrossilazione dell'α-carotene e β-carotene come *hyd2* (Qin *et al.*, 2012).

### **Conclusioni**

Sebbene numerosi programmi di ricerca si siano focalizzati sull'aumento dei precursori della vitamina A in diverse specie (Giuliano, 2017), la carenza di questa vitamina rimane tutt'oggi motivo di malnutrizione per circa 2 milioni di persone e resta uno degli obiettivi di sviluppo sostenibile dell'Agenda 2030 delle Nazioni Unite.

I mutanti prodotti in questo lavoro, con un approccio non transgenico, rappresentano un buon materiale di partenza da impiegare in futuri programmi di miglioramento genetico focalizzati all'ottenimento di genotipi di frumento duro biofortificati in provitamina A.

Pertanto, considerato che il consumo mondiale di pasta continua a crescere insieme all'interesse per il benessere delle persone, i risultati ottenuti potrebbero avere un impatto molto importante sulla salute di una vasta platea di consumatori, non solo nei Paesi in via di sviluppo.

In prospettiva futura, il *pyramiding* delle mutazioni identificate nei due genotipi LCYE e HYD1 rappresenta una buona strategia per sviluppare varietà di frumento duro con livelli di provitamina A ancora più elevati.

### **Ringraziamenti**

Le attività di ricerca sono state finanziate dal MIUR progetto SafeMed, Dipartimenti d'eccellenza Legge 232/2016 e da "INTEGRI- PASTA E PRODOTTI DA FORNO: INTEGRITÀ, SALUBRITÀ E SOSTENIBILITÀ. Innovazione di processo e di prodotto " (ARS01\_00188) DD 1735 del 13 luglio 2017.

### **Bibliografia**

Fairfield K.M., Fletcher R.H. 2002. Vitamins for chronic disease prevention in adults. *Scientific review. Journal of the American Medical Association* 287: 3116-3126.

Giuliano G. 2017. Provitamin A biofortification of crop plants: A gold rush with many miners. *Current Opinion in Biotechnology* 44: 169-180.

Giuliano G., Tavazza R., Diretto G., Beyer P., Taylor M.A. 2008. Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Biotechnology*, 26: 139-145.

Imdad A., Yakoob M.Y., Sudfeld C., Haider B.A., Black R.E., Bhutta Z.A. 2011. Impact of vitamin A supplementation on infant and childhood mortality. *BMC Public Health*, 11: S20.

Krasileva K.V., Vasquez-Gross H.A., Howell T., Bailey P., Paraiso F., Clissold L., Simmonds J., Ramirez-Gonzalez R.H., Wang X., Borrill P., et al. 2017. Uncovering hidden variation in polyploid wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 114: E913-E921.

McCallum C.M., Comai L., Greene E.A., Henikoff S. 2000. Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiology* 123: 439-442. <https://doi.org/10.1104/pp.123.2.439>.

Nisar N., Li L., Lu S., Khin N.C., Pogson B.J. 2015. Carotenoid metabolism in plants. *Molecular Plant*, 8: 68-82.

Qin X., Zhang W., Dubcovsky J., Tian L. 2012. Cloning and comparative analysis of carotenoid  $\beta$ -hydroxylase genes provides new insights into carotenoid metabolism in tetraploid (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) and hexaploidy (*Triticum aestivum*) wheat grains. *Plant Molecular Biology* 80: 631-646.

Sommer A. 2008. Vitamin A deficiency and clinical disease: an historical overview. *The Journal of Nutrition*. 138: 1835-1839.

Underwood B.A. 1978. Hypovitaminosis A and its control. *Bull. World Health Organization*. 56: 525.

World Health Organization. World Health Organization. Micronutrients Deficiencies. Available online: <http://www.who.int/nutrition/topics/vad/en/> (accessed on 10 October 2022).

## Studio di shelf-life di biscotti con miscele lipidiche diverse

F. Pasini<sup>1\*</sup>, S. Marzocchi<sup>1</sup>, C. Ravagli<sup>1</sup>, M. C. Messia<sup>2</sup>, M.F. Caboni<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>DISTAL, Università di Bologna, P.zza Goidanich 60, 47521 Cesena (FC).

<sup>2</sup>Dipartimento Agricoltura, Ambiente e Alimenti (DiAAA), Università degli Studi del Molise, Via Francesco De Sanctis, 86100 Campobasso (CB).

\*E-mail: [federica.pasini5@unibo.it](mailto:federica.pasini5@unibo.it)

### Abstract

Biscuits, one of the fastest growing sectors of bakery products, are often produced using significant quantities of fat which was represented for many years by palm oil. Since for environmental and health reasons, palm oil was progressively abandoned, the aim of this work was to produce and evaluate the oxidative quality over time of biscuits formulated with lipid blends other than palm oil, such as high oleic sunflower oil (100%) and coconut oil:high oleic sunflower oil (87.5:12.5). The samples were stored at both room temperature and 45 °C for a shelf life of 120 days. Biscuits formulated with 100% palm oil showed a lower peroxide value but a higher hexanal content than the other two formulations, especially as regards samples stored under thermal stress. The other two biscuit samples presented a similar oxidative state and in particular, sample obtained with coconut oil and high oleic sunflower oil showed the highest oxidative resistance, mainly during the shelf life at 45 °C.

### Riassunto

I biscotti, uno dei settori della categoria prodotti da forno in più forte crescita, sono spesso prodotti attraverso l'impiego di quantità rilevanti di sostanza grassa che per molti anni è stata rappresentata dall'olio di palma. Poiché per una serie di motivi ambientali e salutistici c'è stato un progressivo disimpiego di questo grasso, lo scopo di questo lavoro è stato quello di produrre e valutare la qualità ossidativa nel tempo di biscotti formulati con miscele lipidiche diverse dall'olio di palma, come l'olio di girasole alto oleico (100%) e la miscela olio di cocco: olio di girasole alto oleico (87,5:12,5). I campioni sono stati conservati sia a temperatura ambiente che a 45 °C per 120 giorni. I biscotti formulati con il 100% di olio di palma mostravano un contenuto in perossidi inferiore ma un contenuto maggiore in esanale rispetto alle altre due formulazioni, soprattutto per quanto riguarda i biscotti conservati in stress termico. Le altre due formulazioni presentavano uno stato ossidativo simile e durante la shelf life alla temperatura di 45 °C il campione costituito da olio di cocco e olio di girasole alto oleico risultava essere il biscotto con una resistenza ossidativa maggiore.

### Introduzione

I prodotti da forno rappresentano uno degli elementi cardine della cultura gastronomica di molti Paesi, soprattutto quelli occidentali. Inoltre, il crescente utilizzo di prodotti trasformati a lunga conservazione, fonte di praticità e convenienza, ha determinato un forte consumo dei prodotti da forno, ed in particolare di biscotti industriali. Come noto, la produzione di prodotti da forno, in particolare dei biscotti, richiede frequentemente l'impiego di quantità rilevanti di sostanza grassa che contribuiscono alla struttura e quindi alle caratteristiche sensoriali del prodotto, alla sua fragranza e alla sua conservabilità (Conte *et al.*, 2003).

In generale il grasso più utilizzato nella preparazione dei prodotti da forno è stato per anni l'olio di palma, che presenta un largo impiego in ambito alimentare grazie ad una serie di caratteristiche positive, tra cui anche la buona resistenza al deterioramento ossidativo e la sua capacità di ottenere prodotti altamente stabili con una lunga shelf life (Imoisi *et al.*, 2015). Le sue peculiarità ne hanno determinato un elevato utilizzo in ambito alimentare ma allo stesso tempo l'incessante

deforestazione, la perdita di biodiversità e la presenza di 3-monocloropropandiolo (3-MCPD) con i suoi derivanti che si vengono a formare durante il processo di raffinazione, ha stimolato nel tempo il progressivo disimpiego di questo olio (EFSA, 2016).

In virtù di queste considerazioni e dei trend futuri del settore “bakery” tra cui un maggiore orientamento alla sostenibilità, non solo nel packaging ma anche nell’origine delle materie prime impiegate, è stata condotta una valutazione dell’andamento ossidativo durante la shelf life di frollini in funzione della differente componente lipidica utilizzata per la loro produzione.

### **Materiali e metodi**

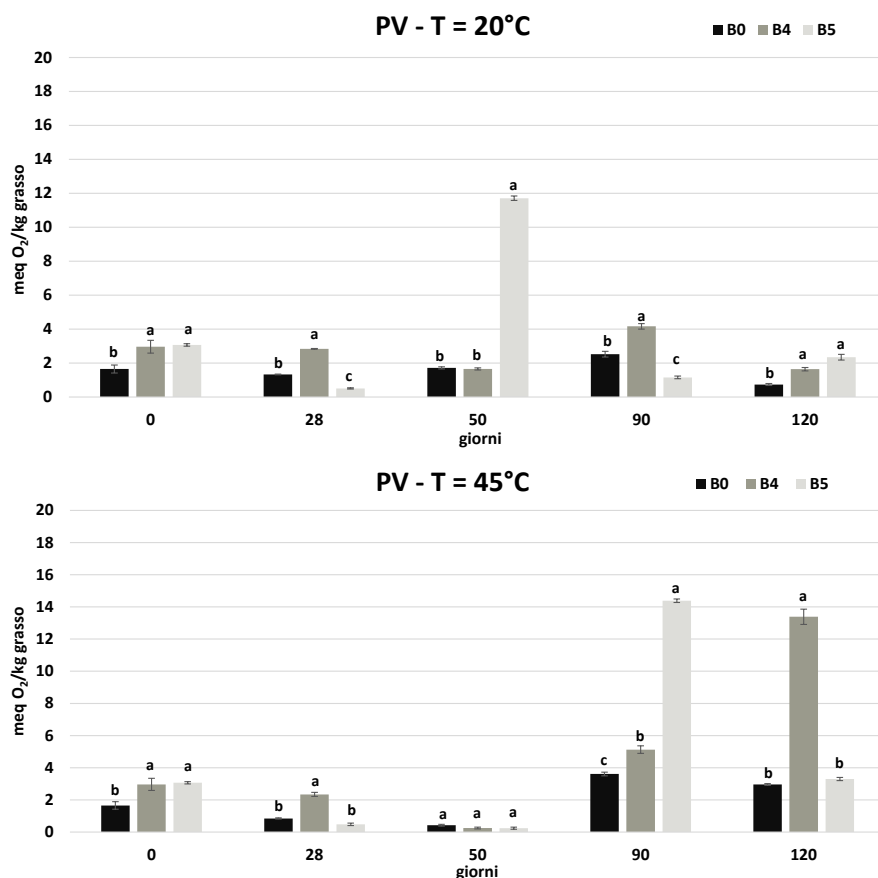
La ricetta impiegata per la produzione dei biscotti prevedeva farina di frumento 00 (9%), uova (15%), zucchero (16%), olio (16%) e lievito chimico (1%). Tre tipologie di campione sono state ottenute variando la componente lipidica, rappresentata quindi dal 100% olio di palma (B0), dal 100% olio di girasole alto oleico (B4) e dalla miscela 87,5% di olio di cocco e 12,5% di olio di girasole alto oleico (B5).

Lo studio di shelf life è stato condotto conservando i campioni a temperatura ambiente e in cella termostata a 45 °C in sacchetti di plastica per alimenti e campionando a 0, 28, 50, 90 e 120 giorni. La valutazione dello stato ossidativo è stata svolta mediante la determinazione del numero di perossidi (Shantha e Decker, 1994) in seguito ad estrazione lipidica con metodo Soxhlet (AOAC, 2000) e del contenuto di esanale attraverso analisi della componente volatile con la tecnica SPME-GC-MS (Marzocchi *et al.*, 2017). È stata inoltre effettuato un test di ossidazione accelerata con strumento Oxitest<sup>®</sup> (Marzocchi e Caboni, 2018) su tutti i vari campioni.

### **Risultati e discussione**

In Figura 1a, sono riportati i valori del numero di perossido (PV) delle tre tipologie di biscotti conservati a temperatura ambiente e a 45°C per 4 mesi. In linea generale il campione B0 presenta un contenuto in PV sempre inferiore o uguale ( $p \leq 0.05$ ) a quello riscontrato per il campione B4. Il campione B5, invece, presenta valori molto più altalenanti. Nel grafico in Figura 1b, si nota come a 28 giorni di shelf life, l’andamento del PV è simile a quello riscontrato per gli stessi biscotti stoccati a 20°C. Dopo 50 giorni, invece, i campioni stoccati a 45 °C mostrano un forte calo con concentrazioni di poco superiori allo zero e non significativamente diverse tra i tre biscotti. Infine, al tempo 90 e 120 giorni si ha un innalzamento del PV anche se in maniera differente a seconda del campione. Nonostante il B0 presenti anch’esso un incremento, rimane comunque il biscotto con un PV sempre tra i più bassi. Il campione B4, invece, mostra un incremento significativo e graduale negli ultimi due step temporali; al contrario il B5 aumenta significativamente dopo 90 giorni raggiungendo il valore massimo assoluto, per poi però subire un altrettanto significativo calo a 120 giorni. L’andamento sinusoidale del contenuto dei perossidi è tipico di tali molecole durante le fasi di propagazione e terminazione delle reazioni di ossidazione, in quanto sono molecole molto instabili che vanno incontro a ulteriori reazioni con formazione di prodotti secondari e quindi vengono demoliti velocemente. Il loro accumulo è quindi strettamente legato alla velocità di formazione e demolizione degli stessi.

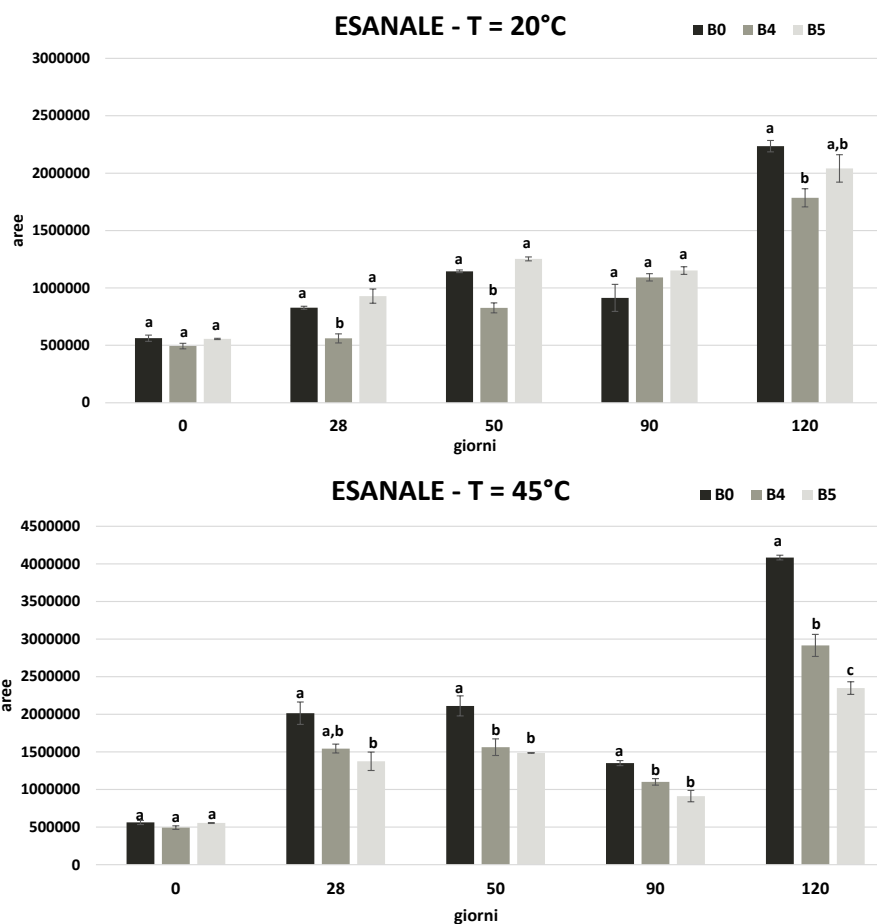
Anche in questo caso è possibile evidenziare come tutti e tre i biscotti, nonostante siano stati conservati ad una temperatura di stress (45°C), continuano a mantenere un PV entro i limiti di legge (20 meqO<sub>2</sub>/kg di grasso) per tutti i tempi di shelf life analizzati.



**Figura 1.** Valore di PV dei biscotti conservati a 20°C (a) e a 45°C (b) durante la shelf life, espresso come meq O<sub>2</sub>/kg di grasso. Barre con lettere diverse all'interno di ogni tempo rappresentano valori significativamente diversi ( $p \leq 0,05$ ).

Dalla Figura 2a si può notare come il contenuto iniziale di esanale sia il medesimo in tutte e tre le formulazioni e come tutti i frollini presentino poi un aumento graduale al progredire della shelf life, diventando più significativo a 120gg dove l'esanale aumenta quasi di 4 volte rispetto al tempo zero. Inoltre, possiamo notare come il campione B4 costituito da 100% olio di girasole alto oleico è in linea di massima quello che presenta il contenuto più basso rispetto agli due altri campioni. Nei biscotti conservati a 45°C (Fig. 2b) il contenuto di esanale aumenta significativamente in tutti i campioni già dopo 28 giorni di shelf life raggiungendo valori pari a quelli registrati a fine shelf life per la conservazione a T 20°C. Inoltre, i campioni mostrano lo stesso andamento, cioè presentano valori molto bassi al tempo 0 che si innalzano poi in maniera significativa a 28 gg e rimangono stabili fino ai 50gg per poi subire un calo a 90 gg e avere un notevole incremento significativo a 120gg raggiungendo valori doppi rispetto ai corrispettivi ottenuti a temperatura ambiente. Anche qui il campione B0 mostra in generale il valore più alto rispetto agli altri 2 biscotti in tutti i tempi di shelf life. I campioni B5 e B4 presentano invece contenuti molto simili ma a fine shelf life il campione B5 è quello che mostra il valore più basso.

Per quanto riguarda il test di ossidazione accelerata, sono stati selezionati solo tre tempi di prelievo ed è stata impostata una temperatura di 100°C e una pressione di ossigeno di 6 bar. I risultati sono espressi sotto forma di periodo di induzione (IP) ossia il tempo limite in cui il campione riesce a resistere all'ossidazione forzata prima di andare in contro a decadimento qualitativo, espresso in minuti (min).

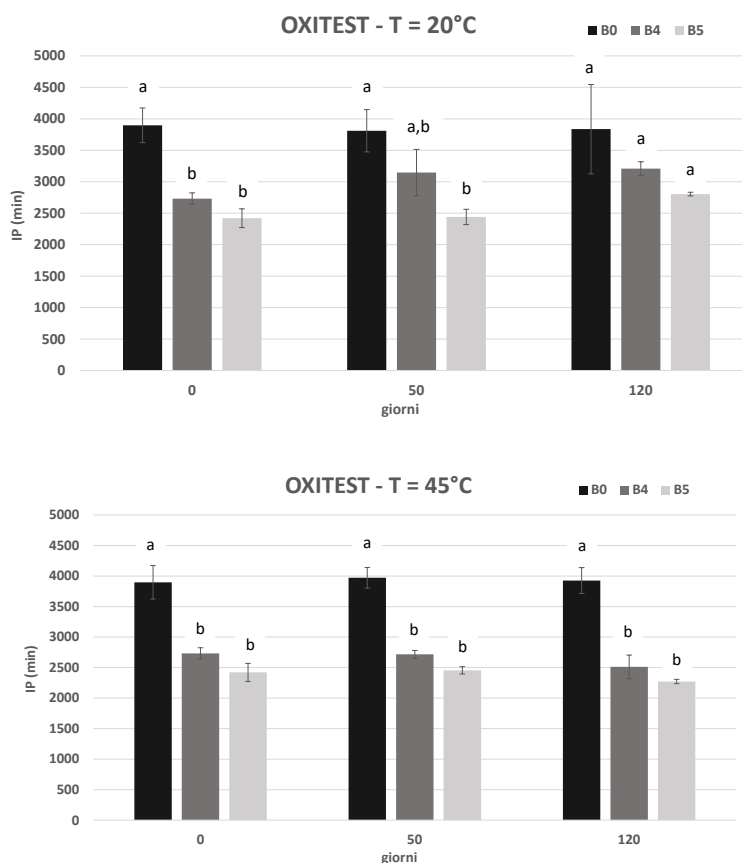


**Figura 2.** Contenuto di esanale dei biscotti conservati a 20°C (a) e a 45°C (b) durante la shelf life, espresso in aree. Barre con lettere diverse all'interno di ogni tempo rappresentano valori significativamente diversi ( $p \leq 0,05$ ).

Dalla Figura 3a è evidente come i biscotti stoccati a 20°C non presentino variazioni significative del valore di IP, indice quindi di una certa stabilità ossidativa nell'arco dei 4 mesi di conservazione. Dall'altro lato, si nota bene come il campione B0, formulato solo con olio di palma, abbia un IP al tempo 0 significativamente superiore ( $p \leq 0,05$ ) rispetto agli altri due campioni. Questo trend si ripresenta anche a 50 e 120 giorni anche se non ci sono differenze così marcate con i valori di B4 e B5. Anche i biscotti stoccati a 45°C (Fig. 3b) non mostrano differenze significative all'avanzare del tempo, sottolineando come anche ad una temperatura di stress non ci sia in 4 mesi cali importanti della resistenza all'ossidazione lipidica dei prodotti.

Concludendo, è possibile affermare che le 2 miscele testate come alternative all'olio di palma hanno consentito di ottenere risultati incoraggianti, mostrandosi quindi alternative lipidiche promettenti per la formulazione di prodotti da forno dolci.

Sicuramente questo studio dimostra come la sostituzione del grasso, in fase di formulazione, non sia banale e i fattori da considerare sono molteplici. È quindi molto importante considerare la qualità totale dei grassi e non solo la sua composizione acidica, tenendo conto sia della presenza di altre molecole così come anche la freschezza del grasso impiegato.



**Figura 3.** Valore di IP nei biscotti conservati a 20°C (a) e a 45°C (b) durante la shelf life, espresso in minuti. Barre con lettere diverse all'interno di ogni tempo rappresentano valori significativamente diversi ( $p \leq 0,05$ ).

### Bibliografia

- AOAC. 2000. Official methods of analysis. 16th ed. Washington, DC: Association of Official Analysis Chemists.
- Conte L., Nicoli M.C. 2003. Impiego di oli e grassi nella formulazione dei prodotti da forno, AREA Science Park.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). 2016. Risks for human health related to the presence of 3- and 2-monochloropropanediol (MCPD), and their fatty acid esters, and glycidyl fatty acid esters in food. *EFSA Journal*, 14(5): 4426
- Imoisi O., Ilori G., Agho I., Ekhatior J. 2015. Palm oil, its nutritional and health implications (Review), *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 19 (1): 127-133.
- Marzocchi S., Pasini F., Verardo V., Ciemniowska-Żytkiewicz H., Caboni M.F., Romani S. 2017. Effects of different roasting conditions on physical-chemical properties of Polish hazelnuts (*Corylus avellana* L. var. *Kataloński*). *LWT - Food Science and Technology*, 77: 440-448.
- Marzocchi S., Caboni M. F. 2018. Study of the Effect of Tyrosyl Oleate on Lipid Oxidation in a Typical Italian Bakery Product. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(47): 12555-12560.
- Shanta N.C., Decker E.A. 1994. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, 77(2): 421-424.



## Caratterizzazione di sfarinati di grani teneri antichi

A. Borriello\*, N.A. Miele, E. Torrieri, N. Velleca, S. Cavella

Università degli Studi di Napoli Federico II, Dipartimento di Agraria, Via Università 100, 80055 Portici (NA).

\*E-mail: [angela.borriello@unina.it](mailto:angela.borriello@unina.it)

### Abstract

Ancient grains represent an important resource for preserving agro-food biodiversity. In this work, the chemical and physical properties of two ancient varieties of soft wheat, were studied. To this purpose, 8 flours were studied by choosing 2 variety, *Romanella* and *Ianculidda*, 2 sifting rates, whole grain and type 1, and 2 milling systems, stone and roller. The flours were characterized in terms of chemical composition, particle size and hydration indices. The rheological, farinographic and calorimetric properties of dough were also studied. The results showed that the protein, ash, fiber and fat content depended on the milling system. All the samples behaved as weak flours. Stone-milled flours were characterized by higher water absorption, higher weakening degree and more homogeneous particle size distribution than roller milled flours. Regardless of the grain variety, the doughs obtained from stone-milled whole grain flours were the firmest. The results showed how the milling system strictly affected physical properties of whole grain flours.

### Riassunto

I grani antichi rappresentano una importante risorsa per conservare la biodiversità agroalimentare. In questo lavoro sono state studiate le proprietà chimico-fisiche di due varietà antiche di grano tenero, *Romanella* e *Ianculidda*, considerando due tassi di abburattamento, integrale e tipo 1, due sistemi di molitura, a pietra e a cilindri, per un totale di otto tipologie di sfarinati. Le farine sono state caratterizzate in termini di composizione chimica, granulometria, misurandone inoltre gli indici di idratazione. Sono state studiate le proprietà reologiche farinografiche e calorimetriche di impasti di farina e acqua. I risultati hanno evidenziato che il contenuto di proteine, ceneri, fibra e grassi dipende dal sistema di molitura. Tutti gli sfarinati presentano caratteristiche tecnologiche tipiche di farine deboli. Gli sfarinati moliti a pietra sono caratterizzati da un maggiore assorbimento di acqua, presentano un grado di rammollimento superiore e hanno una granulometria più fine e più omogenea rispetto a quelli moliti a cilindri. Indipendentemente dalla varietà del grano, gli impasti ottenuti dagli sfarinati integrali moliti a pietra sono i meno rigidi. I risultati evidenziano che il sistema di molitura ha un maggiore impatto sulle caratteristiche degli sfarinati integrali.

### Introduzione

Negli ultimi anni, è aumentata l'attenzione dei produttori nei confronti della sostenibilità ambientale. I grani antichi si coltivano prevalentemente con agricoltura biologica ecosostenibile, in linea con le esigenze attuali del consumatore che chiede prodotti nutrizionalmente validi nel rispetto dell'ambiente. Inoltre, diversi studi suggeriscono che potrebbero presentare un buon profilo nutrizionale, per la loro particolare composizione che differisce dai cereali moderni, presentando un maggiore contenuto di fibre, vitamine, sali minerali, fitosteroli e polifenoli (Bordoni *et al*, 2017). È necessario quindi preservare e valorizzare soprattutto i grani tradizionali autoctoni. Pertanto, l'obiettivo del seguente lavoro è stato quello di esplorare le potenzialità tecnologiche di sfarinati di grani teneri antichi *Romanella* e *Ianculidda*, coltivate nel Cilento e Vallo di Diano.

## **Materiali e metodi**

### ***Materiali***

Gli sfarinati sono stati ottenuti dalla macinazione a pietra (Terra di Resilienza, Morigerati, SA, Italia) e a cilindri (Molino Ficocchia, Calitri, AV, Italia) di due varietà antiche di grano tenero, *Ianculidda* e *Romanella*, considerando due tassi di abburattamento, integrale e tipo 1, per un totale di otto sfarinati: I1 mc (Ianculidda tipo 1 molita a cilindri), Iint mc (Ianculidda integrale molita a cilindri), R1 mc (Romanella tipo 1, molita a cilindri), Rint mc (Romanella integrale, molita a cilindri), I1 mp (Ianculidda, molita a pietra), Iint mp (Ianculidda integrale, molita a pietra), R1 mp (Romanella tipo 1, molita a pietra), Rint mp (Romanella integrale, molita a pietra).

### ***Caratterizzazione delle farine***

#### ***Analisi chimiche***

Per la determinazione del contenuto di azoto dei campioni è stato utilizzato il metodo UNI EN ISO 20483. Per la determinazione del grasso è stato utilizzato il metodo riportato da Bahrami *et al.* 2014. Per la determinazione dell'umidità è stato utilizzato il metodo riportato sulla G.U. del 21/06/1985 n. 145. La fibra alimentare è stata determinata tramite il metodo enzimatico-gravimetrico (G.U. n° 186-1994). Il contenuto di carboidrati è stato determinato per differenza. La determinazione dei sali minerali è stata effettuata tramite spettrofotometria ad assorbimento atomico (AOAC, 2012).

#### ***Analisi granulometrica***

Per l'analisi granulometrica è stato utilizzato un granulometro a diffrazione laser (Mastersizer 3000, Malvern Instruments, UK).

#### ***Analisi calorimetrica***

Per l'analisi calorimetrica è stato utilizzato un calorimetro a scansione differenziale (DSC, TA Instruments QSC Q200). Ai campioni, preparati ponendo circa 15 mg di sospensione acqua-farina in capsule di alluminio sigillate ermeticamente, è stata imposta una storia termica in riscaldamento (isoterma a 25°C per 10 min., riscaldamento fino a 90°C a 5°C/min). Dai termogrammi sono state determinate l'entalpia di gelatinizzazione ( $\Delta H$ , J/g) e le temperature di inizio ( $T_{onset}$ , °C), di picco ( $T_{pk}$ , °C) e di fine ( $T_{endset}$ , °C) transizione.

#### ***Analisi farinografiche***

Per valutare il comportamento degli impasti durante la miscelazione sono state condotte analisi farinografiche mediante farinografo Brabender (Farinograph-AT, Brabender® GmbH & Co. KGi).

### ***Caratterizzazione impasti***

#### ***Preparazione impasti***

Gli impasti sono stati preparati mediante un farinografo Brabender, miscelando, fino al tempo di sviluppo, la farina con la quantità di acqua necessaria a raggiungere una consistenza pari a 500 unità Brabender (UB).

#### ***Analisi reologica***

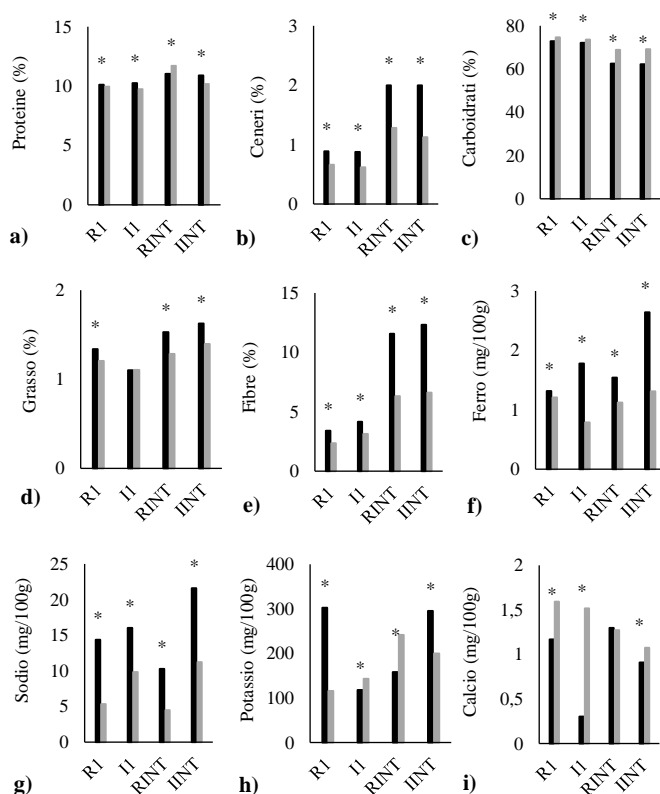
Per le prove reologiche è stato utilizzato un reometro rotazionale (HAAKE MARS, ThermoScientific) a stress controllato, con geometria a piatti piani e paralleli, ( $\varnothing=80$  mm, gap=2 mm). Sono state effettuate prove di *strain sweep* per misurare il campo di viscoelasticità lineare degli impasti. È stato effettuato un test di *creep* della durata pari a 60 s, e un test di *recovery* della durata di 240 s, nel campo di viscoelasticità lineare imponendo uno sforzo costante,  $\tau$ , pari a 10 Pa.

## Risultati e discussione

### Caratterizzazione delle farine

#### Analisi chimiche

Nella Figura 1 è riportato il contenuto (%) di sostanza secca, umidità, proteine, ceneri, grasso, fibre, carboidrati e il contenuto (mg/100g) di minerali degli sfarinati. Come atteso, le farine integrali presentavano un maggior contenuto di proteine, ceneri, fibra, grassi e minerali rispetto alle farine tipo 1, ad eccezione del contenuto di calcio sul quale il tasso di abburattamento non ha avuto effetto. Gli sfarinati moliti a pietra erano caratterizzati da un maggior contenuto di ceneri, grasso, fibre, ferro e sodio rispetto a quelle moliti a cilindri ( $p \leq 0,05$ ). A parità di sistema di macinazione e tasso di abburattamento, la varietà *Ianculidda*, presentava maggiori quantità di ferro, sodio, ma minor contenuto di potassio rispetto alla varietà *Romanella*.



**Figura 1.** Effetto della molitura su proteine (a), ceneri (b), carboidrati (c), grasso (d), fibre (e), ferro (f), sodio (g), potassio (h) e calcio (i). Molitura a pietra in nero, molitura a cilindri in grigio.

#### Analisi farinografiche

In Tabella 1 sono riportati i valori medi ( $\pm$ errore standard) dei parametri ottenuti dall'analisi farinografica degli otto campioni: assorbimento di acqua (WZ%), tempo di sviluppo (DDT), stabilità (S), grado di rammollimento dopo 10 minuti di impastamento (DS). Le farine integrali presentavano valori di WZ% maggiori delle farine di tipo 1 grazie al maggior contenuto di fibra. Anche il sistema di molitura ha avuto un effetto significativo su tale parametro ( $p \leq 0,05$ ). Infatti, gli sfarinati macinati a pietra presentavano valori maggiori di WZ% rispetto agli stessi moliti a cilindri, in accordo con Pagani *et al.* (2020). Le differenze in termini di assorbimento erano attribuibili ad una maggiore quantità di amido danneggiato dovuta allo stress termico generato durante la molitura a pietra. In generale, gli sfarinati analizzati erano caratterizzati da brevi tempi di sviluppo, bassa stabilità degli impasti ed elevati indici di rammollimento.

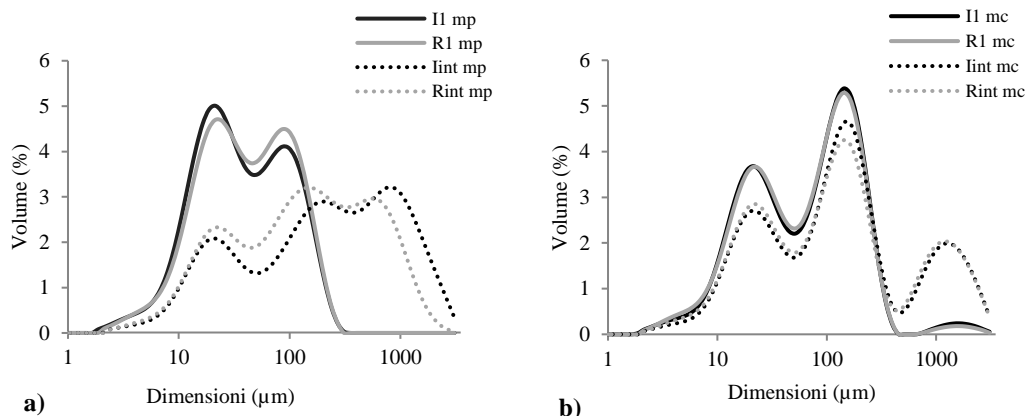
**Tabella 1.** Assorbimento di acqua (WZ%), tempo di sviluppo (DDT), stabilità (S), grado di rammollimento dopo 10 minuti di impastamento (DS), di sfarinati moliti a pietra e cilindri.

	WZ %	DDT (s)	S (s)	DS
<b>Iint mp</b>	66,03±0,15 <sup>a</sup>	91,67±1,15 <sup>a</sup>	110,33±7,64 <sup>a</sup>	91,0±2,00 <sup>d</sup>
<b>I1 mp</b>	59,73±0,15 <sup>b</sup>	76,33±8,14 <sup>c</sup>	115,33±8,62 <sup>a</sup>	149±5,51 <sup>b</sup>
<b>Rint mp</b>	65,86±0,38 <sup>a</sup>	85,67±3,51 <sup>b</sup>	93,67±3,21 <sup>c</sup>	144±3,05 <sup>c</sup>
<b>R1 mp</b>	58,60±0,31 <sup>c</sup>	76,33±5,51 <sup>c</sup>	107,67±6,50 <sup>b</sup>	177±9,29 <sup>a</sup>
<b>Iint mc</b>	60,00±0,15 <sup>a</sup>	62,30±4,62 <sup>c</sup>	124,0±5,20 <sup>a</sup>	108±5,68 <sup>d</sup>
<b>I1 mc</b>	57,80±0,20 <sup>b</sup>	67,00±3,46 <sup>b</sup>	114,3±4,16 <sup>b</sup>	141±3,05 <sup>b</sup>
<b>Rint mc</b>	60,40±0,10 <sup>a</sup>	66,67±8,39 <sup>b</sup>	124,3±2,31 <sup>a</sup>	115±1,52 <sup>c</sup>
<b>R1 mc</b>	57,80±0,17 <sup>b</sup>	73,67±5,68 <sup>a</sup>	108,3±3,80 <sup>c</sup>	178±1,52 <sup>a</sup>

Per ciascuna colonna a lettere differenti corrispondono valori significativamente diversi ( $p \leq 0,05$ )

### Analisi granulometrica

Nella Figura 2 sono riportate le curve di distribuzione granulometrica relative alle otto farine analizzate. Gli sfarinati integrali erano caratterizzati da una popolazione di particelle di dimensioni maggiori ( $\approx 1200 \mu\text{m}$ ) rispetto agli sfarinati tipo 1 (max.  $300 \mu\text{m}$ ), ciò è dovuto alla presenza di crusca nelle farine integrali. Inoltre, gli sfarinati moliti a pietra mostravano una granulometria più fine e omogenea rispetto a quelli moliti a cilindri.



**Figura 2.** Curve di distribuzione granulometrica degli sfarinati moliti a pietra (a) e a cilindri (b).

### Analisi calorimetrica

Tutti i campioni sono stati sottoposti ad analisi calorimetrica a scansione differenziale e i parametri termici sono stati riportati in Tabella 2.

**Tabella 2.** Parametri termici, temperature di inizio gelatinizzazione ( $T_{\text{onset}}$ ), fine gelatinizzazione ( $T_{\text{endset}}$ ), picco ( $T_{\text{pk}}$ ) ed entalpia di gelatinizzazione dell'amido ( $\Delta H$ ) di sfarinati moliti a pietra e a cilindri.

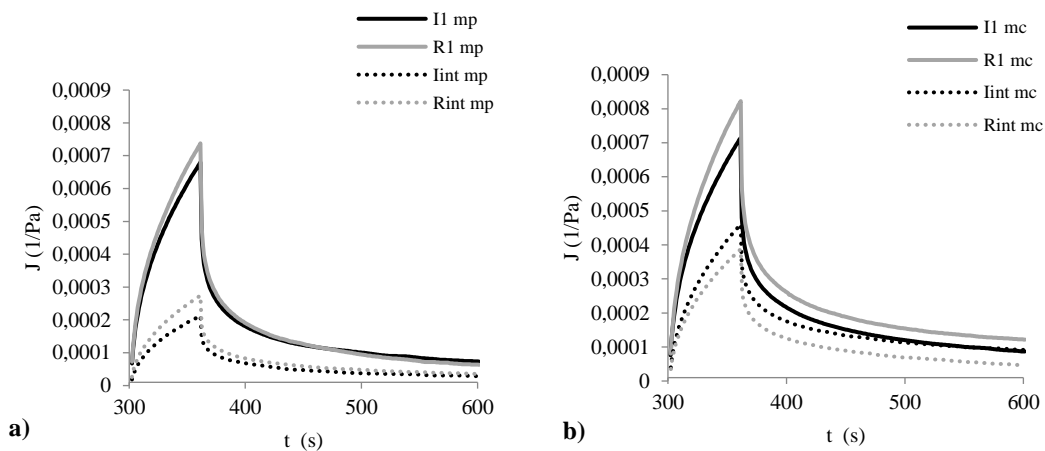
	$T_{\text{onset}}$ (°C)	$T_{\text{offset}}$ (°C)	$T_{\text{pk}}$ (°C)	$\Delta H$ (J/g carboidrati)
<b>Iint mp</b>	55,14±0,21 <sup>a,b</sup>	75,28±0,21 <sup>a,b</sup>	64,67±0,13 <sup>b</sup>	2,01±0,06 <sup>a</sup>
<b>I1 mp</b>	55,96±0,13 <sup>a</sup>	73,53±1,30 <sup>b</sup>	63,90±0,32 <sup>c</sup>	1,72±0,42 <sup>a</sup>
<b>Rint mp</b>	55,96±0,79 <sup>a</sup>	75,12±1,24 <sup>a,b</sup>	65,60±0,08 <sup>a</sup>	1,79±0,20 <sup>a</sup>
<b>R1 mp</b>	54,84±0,64 <sup>b</sup>	75,46±0,37 <sup>a</sup>	64,49±0,15 <sup>b</sup>	2,03±0,07 <sup>a</sup>
<b>Iint mc</b>	54,21±0,76 <sup>a</sup>	77,79±0,71 <sup>a</sup>	64,08±0,05 <sup>a</sup>	2,23±0,05 <sup>a</sup>
<b>I1 mc</b>	54,73±0,25 <sup>a</sup>	75,99±1,75 <sup>a,b</sup>	63,68±0,31 <sup>a</sup>	2,32±0,09 <sup>a</sup>
<b>Rint mc</b>	54,71±0,29 <sup>a</sup>	76,32±0,64 <sup>a,b</sup>	64,01±0,27 <sup>a</sup>	2,20±0,13 <sup>a</sup>
<b>R1 mc</b>	54,18±0,58 <sup>a</sup>	75,69±0,46 <sup>b</sup>	62,99±0,10 <sup>b</sup>	2,13±0,19 <sup>a</sup>

In generale, la gelatinizzazione dell'amido è avvenuta nell'intervallo di temperatura compreso tra 50 e 80°C ed è caratterizzata da un unico picco endotermico. Gli sfarinati integrali erano caratterizzati da temperature di picco massimo di gelatinizzazione maggiori rispetto a quelli tipo 1 ( $p < 0,05$ ). La diversa composizione degli sfarinati non ha avuto un effetto sulla gelatinizzazione dell'amido.

### Caratterizzazione impasti

#### Analisi reologica

Il tasso di abburrattamento e il sistema di molitura hanno influenzato le proprietà reologiche degli impasti (Fig. 3). Gli impasti ottenuti con sfarinati tipo 1 erano meno rigidi poiché presentavano valori di *compliance* massima in *creep* ( $J_{max}$ ) maggiori rispetto a quelli ottenuti da sfarinati integrali. Gli impasti ottenuti da sfarinati moliti a pietra risultavano più rigidi di quelli moliti a cilindri.



**Figura 3.** Curve di *Creep Recovery* degli sfarinati moliti a pietra (a) e a cilindri (b).

### Ringraziamenti

Si ringrazia il Prof. Romano Raffaele per le analisi chimiche degli sfarinati.

### Bibliografia

- Bahrami N., Yonekura L., Linforth R., Carvalho da Silva M., Hill S., Penson S., Fisk I. D. 2014. Comparison of ambient solvent extraction methods for the analysis of fatty acids in non-starch lipids of flour and starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(3): 415-423.
- Bordoni A., Danesi F., Di Nunzio M., Taccari A., Valli V. 2017. Ancient wheat and health: a legend or the reality? A review on KAMUT khorasan wheat. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 68: 278-286.
- Pagani M. A., Giordano D., Cardone G., Pasqualone A., Casiraghi M. C., Erba D., Marti A. (2020). Nutritional features and bread-making performance of wholewheat: Does the milling system matter? *Foods*, 9(8): 1035.

## **Risi pigmentati italiani: caratteristiche e peculiarità**

A. Cantalupi\*, C. Simonelli, E. Fantozzi

Ente Nazionale Risi, Laboratorio di Chimica Merceologia e Biologia Molecolare, Centro Ricerche sul Riso, Strada per Ceretto 4, 27030 Castello d'Agogna (PV).

\*E-mail: a. [cantalupi@enterisi.it](mailto:cantalupi@enterisi.it)

### **Abstract**

Rice is the most widely consumed and cultivated cereal in the world. Harvested as paddy rice, it undergoes a series of mechanical processing that transforms it first into brown rice and then, by removal of the pericarp, into milled rice.

In recent years there has been a rise in the market for the consumption of brown rice, including pigmented rice. These varieties are characterized by a naturally colored pericarp (usually black or red) due to the presence of anthocyanin pigments.

They maintain all the benefits of brown rice and in addition contain bioactive molecules, such as polyphenols, flavonoids,  $\gamma$ -oryzanol, tocopherols, ferulic acid, phytic acid, and tecotrienols, making them functional foods. For example, anthocyanins, water-soluble pigments belonging to the class of flavonoids, have been shown to provide significant benefits to our body. Their antioxidant action, in fact, inhibits or decreases the formation of free radicals, allowing the prevention of chronic diseases such as obesity, diabetes, atherosclerosis, cancer and cardiovascular disease.

Furthermore, at the sensory level, there are many aromatic varieties among pigmented rices, capable of exhibiting unique aroma due to aldehydes and other chemical compounds present, such as 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP).

The present study consists of an initial investigation of Italian pigmented varieties, aimed at examining the chemical and merceological characterization of the grain.

### **Riassunto**

Il riso è il cereale più consumato e coltivato al mondo. Raccolto come risone, subisce una serie di lavorazioni meccaniche che lo trasformano dapprima in integrale e successivamente, per rimozione del pericarpo, in riso lavorato.

Negli ultimi anni vi è stato un riaffermarsi nel mercato del consumo dei risi integrali, fra i quali spiccano i risi pigmentati. Queste varietà sono caratterizzate da un pericarpo naturalmente colorato (solitamente nero o rosso) per la presenza di pigmenti antocianinici.

Conservano tutti i vantaggi del riso integrale e in aggiunta contengono molecole bioattive, come polifenoli, flavonoidi,  $\gamma$ -orizanolo, tocoferoli, acido ferulico, acido fitico e tecotrienoli, che li rendono dei *functional food*. Ad esempio, le antocianine, pigmenti idrosolubili appartenenti alla classe dei flavonoidi, hanno dimostrato di poter apportare notevoli benefici al nostro organismo. La loro azione antiossidante, infatti, inibisce o diminuisce la formazione di radicali liberi, permettendo la prevenzione di malattie croniche come obesità, diabete, arteriosclerosi, cancro e malattie cardiovascolari.

Inoltre, a livello sensoriale, esistono molte varietà aromatiche fra i risi pigmentati, capaci di esibire un aroma unico grazie ad aldeidi e altri composti chimici presenti, come la 2-acetil-1-pirrolina (2-AP).

Il presente studio consiste in un primo approfondimento sulle varietà pigmentate italiane, volto a prendere in esame la caratterizzazione chimica e merceologica del granello.

## Introduzione

Esistono nel mondo alcune varietà di riso il cui pericarpo si presenta pigmentato: rosso, viola oppure nero. Il colore deriva dalla presenza di pigmenti antocianici in diversi strati del pericarpo, lolla e strato aleuronico.

La Cina sembra essere il Paese in cui vi è la maggior presenza di risi colorati: qui i risi pigmentati sono rinomati in quanto hanno la fama di avere importanti proprietà nutrizionali. Anche in Italia, negli anni più recenti, si è però creata una buona fetta di mercato per le varietà pigmentate. Inizialmente sono state introdotte soprattutto per il loro aspetto estetico: possono infatti conferire eleganza ed originalità alle più svariate preparazioni. La curiosità e l'interesse verso le proprietà benefiche hanno successivamente portato ad incrementarne nel tempo il consumo.

Nel riso nero è stata dimostrata la presenza di elevate quantità di antocianine, in particolare la cianidina-3-glucoside e la peonidina-3-glucoside, riscontrate nell'aleurone per l'85% del totale delle antocianine contenute nel chicco intero di riso. La frazione pigmentata estratta dal riso nero possiede elevate proprietà antiossidanti e di *scavenger* di radicali liberi. Inoltre, questo estratto è in grado di ridurre la formazione di ossido nitrico, un potente produttore di radicali liberi, mediante soppressione della sintesi di questa sostanza nei macrofagi attivati, senza indurre citotossicità. È stata inoltre dimostrata la capacità della frazione pigmentata del riso nero di ridurre la formazione di placche aterosclerotiche. I risi rossi sono caratterizzati da una colorazione rossa del pericarpo che va dal rosso tenue al rosso scuro. La pula contiene polifenoli e antocianine dalle proprietà antiossidanti. I risi rossi sono inoltre una ricca fonte di proteine, zinco e ferro.

## Materiali e metodi

Le varietà pigmentate italiane iscritte al Registro dell'Ente Nazionale Risi utilizzate per il seguente studio sono state: Gioiello, Nerone e Il Moro quali risi neri; Diamante e Il Cardinale come risi rossi.

Le analisi sono state condotte dal Laboratorio di Chimica Merceologia e Biologia Molecolare dell'Ente Nazionale Risi.

Le determinazioni effettuate sono state: grado di bianco Kett mediante un metodo interno (MP28, rev.01:2011) con colorimetro Kett (Colorimetro digitale KETT modello C-300); biometrie (UNI EN ISO 11746:2012), mediante analizzatore di immagini WinSEEDLE; massa dei 1000 grani (UNI EN ISO 520:2011) sul semigreggio, che prevede il conteggio di 500 grani e pesata dei soli grani interi; umidità con essiccamento in stufa ventilata (Memmert UFE 400, metodo ISO 712:2019); lipidi grezzi con estrazione in sistema Soxhlet con etere di petrolio (metodo AACC 30-25.01); proteine, mediante metodo Kjeldahl (ISO 20483:2013) per il contenuto di azoto e successiva moltiplicazione per il fattore correttivo del riso (5.95); ceneri per incenerimento sotto cappa e calcinazione in stufa a muffola (Nabertherm P300, metodo AOAC Official Method 936.07); contenuto di amilosio (UNI ISO 6647-1:2008) mediante spettrofotometro UV-VIS (Lambda 25, Perkin Elmer) dopo delipidizzazione mediante estrazione con metanolo; caratterizzazione al micro viscoamilografo Brabender (metodo interno MP34 rev.06:2015) di TI (temperatura di inizio gelatinizzazione), PV (picco di viscosità), TP (temperatura al picco), BD (breakdown) e SB (setback). L'aromaticità è stata determinata applicando un metodo interno (MP23 rev.07:2018) e sottoponendo i campioni al panel test (ISO 8588), con giudici selezionati ed addestrati (ISO 8586, ISO 11132).

## Risultati e discussione

**Grado di bianco Kett.** Il grado di bianco Kett (gbd Kett) è un'analisi volta alla valutazione della colorazione del granello. Usualmente si effettua su riso bianco per valutare il grado di lavorazione. In questo caso, essendo tutti risi integrali e pigmentati, il gbd Kett è risultato essere molto basso, in quanto le colorazioni dei risi commerciali, in particolare quelli neri, è particolarmente intensa.

**Tabella 1.** Grado di bianco Kett.

Varietà	Semigreggio	Lavorato
<i>Non pigmentata</i>	20 - 28	45 - 58
Gioiello	3,0	35,5
Diamante	4,6	37,1
Nerone	3,3	37,4
Il Moro	3,5	38,5
Il Cardinale	4,5	47,9

È possibile notare in Tabella 1 come le varietà pigmentate, se sottoposte a lavorazione, presentano comunque dei valori di gdb Kett più bassi rispetto ai valori tipici dei risi bianchi. Questo è dovuto al fatto che i pigmenti sono presenti in parte anche all'interno del granello.

**Biometrie e massa 1000 grani.** Sono riportati in Tabella 2 i risultati ottenuti per lunghezza (L), larghezza (l) e massa dei 1000 grani. La classificazione riportata è stata effettuata sulla base del D.Lgs. 131/2017 sul riso lavorato.

**Tabella 2.** Biometrie e classificazione dei risi pigmentati.

Varietà	L lavorato [mm]	l lavorato [mm]	L/l	Classificazione	L semigreggio [mm]	l semigreggio [mm]	1000 grani [g]
Gioiello	4,73	2,31	2,39	Medio	6,02	2,52	17,6
Diamante	6,03	2,20	3,11	Lungo B	7,14	2,30	21,4
Nerone	5,42	2,65	2,24	Medio	6,36	2,84	23,0
Il Moro	4,85	2,62	2,10	Medio	5,78	2,75	22,8
Il Cardinale	5,65	2,48	2,50	Medio	6,52	2,61	24,1

Le analisi nutrizionali hanno invece riguardato diversi parametri di interesse, quali: umidità, lipidi grezzi, sostanze azotate, ceneri e quantità di amilosio presente.

**Umidità.** Per alcune varietà, l'umidità è risultata essere maggiore del 14%, valore limite che, se non superato, assicura una buona conservazione dei cereali. La motivazione risiede nel fatto che questi non sono dei risi commerciali, e dunque il tenore di acqua può talvolta superare il 14%.

**Lipidi/proteine/ceneri.** Per tutte le varietà si sono invece riscontrati i valori tipici dei risi integrali per quanto riguarda lipidi grezzi (in genere attorno al 2-4%, maggiore rispetto ai risi lavorati poiché contenuti nella parte esterna), sostanze azotate (in genere superiore al 7%) e ceneri (componente inorganica del granello, nettamente maggiore nei risi integrali rispetto ai lavorati).

**Amilosio.** La determinazione dell'amilosio è stata effettuata dopo lavorazione dei campioni di riso integrale, poiché la metodica è applicabile al solo riso lavorato. Dopo lavorazione, le varietà Diamante, Nerone e Il Moro sono risultate essere a basso contenuto di amilosio (10-19 g/100g), mentre le varietà Gioiello e Il Cardinale sono risultate essere a medio contenuto di amilosio (20-24 g/100g).

**Analisi micro-viscoamilografica.** La caratterizzazione al Brabender ha permesso di valutare il comportamento reologico della farina di riso semigreggio.



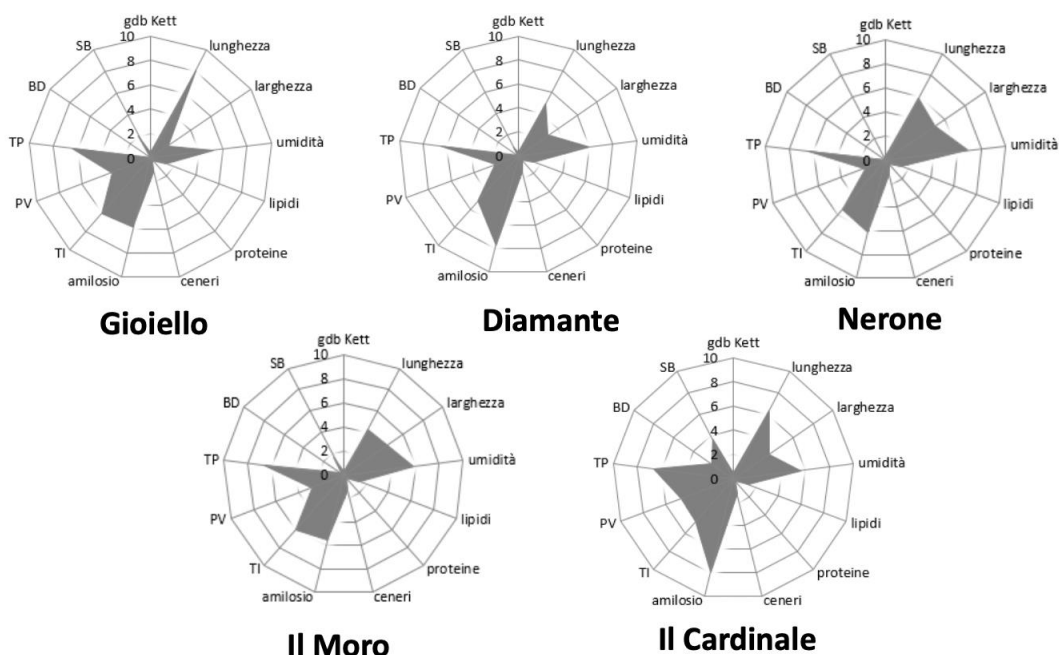
**Tabella 3.** Caratterizzazione al RMVA Brabender delle varietà pigmentate.

Varietà	TI [°C]	PV [BU]	TP [°C]	BD [BU]	SB [BU]
Gioiello	78,2	283	95,40	1	337
Diamante	81,0	412	95,10	0	445
Nerone	79,2	268	95,10	0	296
Il Moro	81,0	361	95,50	6	407
Il Cardinale	77,1	537	95,53	48	577

Dai dati riportati in Tabella 3 è possibile notare che i tracciati nel riso integrale e lavorato sono analoghi per alcuni parametri (TI, TP, BD), mentre PV ed SB sono inferiori rispetto al lavorato, probabilmente perché influenzati dalla presenza del pericarpo.

**Aromaticità.** È stato applicato e validato per i risi pigmentati (ovvero integrali) il metodo interno MP23 per l'aromaticità. Le varietà Diamante, Il Moro, Gioiello e Nerone si sono dimostrate essere aromatiche, al contrario della varietà Il Cardinale. Nell'analisi sensoriale è emersa la facilità con cui si viene fuorviati nella valutazione dell'aromaticità (sentore di pop-corn) a causa dell'aroma tipico di ciascuna varietà, soprattutto se celato dietro al sentore rilasciato dalla pula.

**Conclusioni.** Tutte le varietà sono risultate confrontabili a livello di caratteristiche nutrizionali (umidità, lipidi, proteine e ceneri), ricalcando quelle dei risi integrali. Per quanto concerne le altre proprietà, ogni varietà ha esibito delle peculiarità che le rendono uniche. In Figura 1 sono riportati i grafici radar per ciascuna tipologia di riso.



**Figura 1.** Grafici radar delle sette varietà esaminate. I valori numerici delle singole proprietà sono stati parametrati su una scala da 1 a 10.

Questo studio presenta quindi un primo approfondimento sulle varietà pigmentate italiane. In futuro, sarà condotto un'ulteriore valutazione al fine di approfondire la caratterizzazione sul cotto (consistenza, biometrie sul cotto, incremento di massa sul cotto, sostanze perse), che richiede però una preliminare validazione delle metodiche, al momento applicabili a riso lavorato. Sarà inoltre approfondita la validazione al RMVA Brabender con le varietà integrali e in particolare con quelle pigmentate.

## **Ringraziamenti**

Un ringraziamento a E. Bertolone, D. Borando, M. Martinotti (Lugano Sementi), A. Pavesi (AN FED Agri S.r.l.), G. Polenghi (Tecnoseed), che hanno messo a disposizione le loro varietà per la conduzione del presente studio.

## **Bibliografia**

Aa.Vv 2008. *Il Riso*, Collana Coltura & Cultura, Bayer CropScience. Ed. Script, Bologna (pagg. 162-164).

Fondazione Umberto Veronesi 2017. Il Riso, un cereale da riscoprire. *La salute in tavola. I consigli alimentari della Fondazione Umberto Veronesi*.

Petroni K., Landoni M., Tomay F., Calvenzani V., Simonelli C., Cormegna M. 2017. Proximate Composition, Polyphenol Content and Anti-Inflammatory Properties of White and Pigmented Italian Rice Varieties. *Universal Journal of Agricultural Research*, 5(5): 312-321.

Reddy C. K., Kimi L., Haripriya S., Kang N. 2017. Effects of polishing on proximate composition, physico-chemical characteristics, mineral composition and antioxidant properties of pigmented rice. *Rice Science*, 24(5): 241-252.

Saxena A. 2014. Save the Red Rice: A Unique Gift of Nature. *International Journal of Current Research in Bioscience and Plant Biology*, 1(5): 32-34.

Simonelli C., Cormegna M., Tonello M. 2016. Valutare i risi aromatici. *L'Assaggio n°56*, Inverno 2016, 55-57.

## **Impiego di varietà colorate di frumento tenero in impasti per prodotti da forno “funzionali”** *A. Romano<sup>1,2</sup>, G. D’Auria<sup>1\*</sup>, P. Ferranti<sup>1</sup>, M. Blandino<sup>3</sup>, G. Mamone<sup>4</sup>, L. Di Stasio<sup>4</sup>, P. Masi<sup>1,2,3</sup>*

<sup>1</sup>Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Università 100, 80055 Portici (NA).

<sup>2</sup>CAISIAL, Università degli Studi di Napoli ‘Federico II’, Via Università 133, 80055 Portici (NA).

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino, 10095 Grugliasco (TO).

<sup>4</sup>ISA-CNR, Via Roma 64, 83100 Avellino (AV).

\*E-mail: [giovanni.dauria@unina.it](mailto:giovanni.dauria@unina.it)

### **Abstract**

In the last decade, colored wheat varieties have raised increasing interest in their functional properties. These grains are high in carotenoids, anthocyanins, and polyphenols with antioxidant activity. Thus, the introduction of colored wheat as an ingredient in the human diet may have beneficial effects on health. The study is aimed at developing wholegrain bakery products, with increased nutritional quality, by using two selected grains with high content of functional components, including anthocyanins (T. vulgare cv Skorpion) and carotenoids (T. vulgare cv Bonavita) and commercial whole wheat flour. The impact of colored wheat varieties on the microstructure and functional and nutritional properties of whole wheat bread was evaluated. The proteomic analysis attested that the investigated grains showed different degrees of expression of the protein families typical of flours. SDS-PAGE showed that Bonavita had the highest amount of high molecular weight glutenins, associated with good technological properties. The overall results showed that these colored wheat varieties may improve the technological and nutritional properties of formulations of bakery products.

### **Riassunto**

Nell'ultimo decennio, le varietà di frumento colorate hanno suscitato un crescente interesse per le loro proprietà funzionali. Questi cereali sono infatti ricchi di carotenoidi, antociani e polifenoli con attività antiossidante. Pertanto, l'impiego delle varietà colorate di frumento tenero rappresenta quindi una materia prima molto interessante per l'industria alimentare in termini di nuovi prodotti. Obiettivo dello studio è stato valutare il potenziale impiego di sfarinati di varietà colorate di frumento tenero, come T. vulgare cv Skorpion e T. vulgare cv Bonavita per lo sviluppo di prodotti da forno integrali rispetto ad uno sfarinato integrale commerciale di controllo. A tale scopo è stata esaminata la microstruttura, le proprietà chimico- fisiche, tecnologiche e nutrizionali, la proteomica e i metaboliti (carotenoidi) degli sfarinati, e le proprietà di impasti preparati con Skorpion e Bonavita. L'analisi proteomica ha attestato che i grani studiati mostravano diversi gradi di espressione delle famiglie proteiche tipiche delle farine. L'analisi elettroforetica SDS-PAGE ha mostrato che Bonavita possedeva la più alta quantità di glutenine ad alto peso molecolare, associate a buone proprietà tecnologiche. In conclusione, i dati ottenuti forniscono nuove ed interessanti informazioni per l'impiego di varietà colorate di frumento tenero nel settore dei prodotti da forno.

**Parole chiave:** frumento tenero colorato, miscelazione, prodotti da forno, proteomica.

### **Introduzione**

Attualmente i frumenti colorati sono oggetto di grande attenzione per il loro elevato valore nutrizionale, legato alla presenza di polifenoli, fibre alimentari, sali minerali, carboidrati ed altri

nutrienti (Wang *et al.*, 2000), che li rendono potenziali ingredienti funzionali per l'industria alimentare (Sharma *et al.*, 2021). Numerose ricerche scientifiche riportano infatti gli effetti benefici degli antiossidanti fenolici e dei carotenoidi per la salute umana, come la diminuzione del diabete di tipo 2, di malattie cardiovascolari, di alcuni tipi di cancro (in particolare quello al colon-retto), della regolazione della glicemia e dell'obesità, e l'azione nei vari disordini del tratto gastro-intestinale, dove svolgono attività prebiotica (Alves-Santos *et al.*, 2020). La loro presenza negli sfarinati di frumento integrali e soprattutto in quelli colorati rendono lo studio e la potenziale applicazione di alcune varietà colorate di frumento molto interessanti per la ricerca scientifica. Obiettivo del presente studio è stato valutare il potenziale impiego di sfarinati di varietà colorate di frumento tenero, come Skorpion (S) e Bonavita (B) per lo sviluppo di prodotti da forno integrali. A tale scopo è stata esaminata la proteomica e i metaboliti (carotenoidi) degli sfarinati, e le proprietà di impasti preparati con S, B e con uno sfarinato integrale di controllo (C).

## **Materiale e metodi**

### ***Materiali***

Le prove sperimentali sono state effettuate con la farina integrale commerciale Caputo® (C) e due varietà di frumenti colorati: Bona Vita (BV) e Skorpion (S) coltivate nei campi sperimentali del dipartimento di Scienze Agrarie Forestali e Alimentari dell'Università di Torino.

### ***Metodi***

#### ***Preparazione del campione***

Gli impasti sono stati preparati con 32 g di ogni sfarinato, 0,59 g di lievito, 0,69 g sale e la quantità di acqua necessaria all'impasto per raggiungere una consistenza di 500 Unità Brabender, utilizzando un farinografo Brabender AT (Belotti strumenti S.r.l., Milano, Italy).

L'impasto dopo la fase di miscelazione è stato posto in una cella ( $35 \pm 1$  °C, U.R. 75±5%) per il tempo ottimale di lievitazione stabilito precedentemente (dati non mostrati). Gli impasti lievitati sono stati quindi cotti a 175°C per 30 minuti in forno elettrico statico (Smeg, mod ALFA43, made in Italy).

Sono stati preparati tre lotti di produzione indipendenti.

#### ***Analisi microstrutturale***

Gli sfarinati sono stati liofilizzati a -50 °C per 30 ore e ricoperti d'oro con un metallizzatore (Agar, mod. sputtercoater, figura 4). La microstruttura è stata esaminata con un microscopio elettronico a scansione (SEM, LEO EVO 40-Zeiss, Germania) con una tensione di accelerazione di 20kV ad un ingrandimento di 2000x.

#### ***Analisi chimico-fisiche degli sfarinati e dei prodotti finiti***

Sono state effettuate l'analisi del contenuto di umidità mediante metodo AACC gravimetrico (1999, AACC metodo numero 44-15.02); del pH mediante un pHmetro da banco (XS, modello pH-8, Carpi, Italy), indici colorimetrici mediante un occhio elettronico IRIS e il software AlphaSoft (Alpha M.O.S., visualanalyzer VA400, Toulou, France). Le coordinate colorimetriche valutate sono state:  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ . Ogni risultato rappresenta la media di 3 ripetizioni.

#### ***Prove farinografiche degli impasti***

Gli indici farinografici valutati mediante un farinografo Brabender AT (Belotti strumenti S.r.l., Milano, Italy) sono stati: il tempo di sviluppo (min) per raggiungere la massima consistenza, il tempo di stabilità (min), l'elasticità (UB), che è fornita dallo spessore della banda, il grado di rammollimento (UB), che rappresenta la differenza tra la massima consistenza e quella che si riscontra dopo 12 minuti. Ogni risultato rappresenta la media di 3 ripetizioni.

#### ***Determinazione della densità dei prodotti da forno***

Il peso dei campioni è stato determinato con una bilancia tecnica (Mark Balance Electronic). Il volume di ogni campione è stato determinato applicando il metodo AACC dei semi di miglio (1999, AACC metodo numero 10-05. 01). La densità è stata calcolata mediante il rapporto tra il

peso ed il volume dei campioni, ed è espressa in grammi su millilitri. Ogni risultato rappresenta la media di 5 ripetizioni.

### **Analisi proteomica**

Le proteine totali sono state estratte disciogliendo gli sfarinati in Laemmli buffer (Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, 5% SDS, 20% glicerolo, 5%  $\beta$ -mercaptoetanolo, 0.02% blu di bromofenolo). Attraverso il frazionamento di Osborne, sono anche state estratte selettivamente le gliadine e le glutenine. Le proteine totali e le frazioni proteiche ottenute sono state analizzate attraverso SDS-PAGE (8% acrilamide, colorazione con Brilliant Blue Coomassie G-250 colloidale). L'identificazione delle bande è stata ottenuta mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione utilizzando uno spettrometro Orbitrap Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

### **Analisi dei carotenoidi**

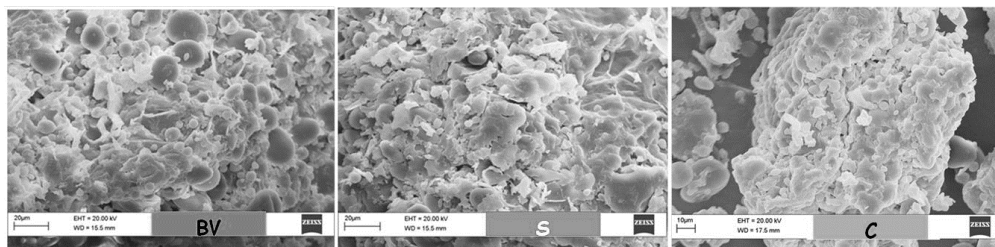
I carotenoidi estratti sono stati estratti seguendo la procedura di Granado et al., 2001 e analizzati mediante RP-HPLC con rivelatore a serie di diodi (DAD) (Agilent HP1100, Palo Alto, CA). Le separazioni sono state effettuate utilizzando una colonna C30 da 250 x 4,6 mm, 3  $\mu$ m, la temperatura della colonna era stata settata a 25°C. Il solvente A era metanolo/acqua 95/5 allo 0,1% BHT, il solvente B era diclorometano allo 0,1% BHT. Per la separazione è stata applicata inizialmente una eluizione isocratica (1 ml/min) di tampone A per 20 minuti, dopodiché è stato applicato un un gradiente di B da 0% a 50 % per un tempo di 20 min e per altri 20 minuti il flusso è stato mantenuto al 50% di B. I segnali sono stati acquisiti a 471 nm.

### **Elaborazione Statistica dei dati**

Tutti i dati sperimentali sono stati sottoposti all'analisi della varianza ANOVA e al test di Duncan ( $p < 0,05$ ) utilizzando il software SPSS versione 19,0 per Windows.

## **Risultati e discussione**

Dall'analisi microstrutturale degli sfarinati (Fig. 1) mediante microscopia elettronica a scansione (SEM), si osserva la presenza di granuli di amido grandi (oltre 10 $\mu$ m) e piccoli (meno di 10 $\mu$ m), filamenti proteici e materiale fibroso in tutti gli sfarinati: BV, S e C.



**Figura 1.** Microstruttura mediante SEM degli sfarinati in esame: BV, S e C con 20kV ed a 2.00 kx

In particolare, nella farina BV si notano maggiormente i filamenti proteici e le membrane fibrose (Fig. 1), come riportato anche da altri autori.

Nella Tabella 1 sono riportate proprietà chimico-fisiche degli sfarinati. Il contenuto d'umidità ed il pH sono tra i principali fattori che influenzano le proprietà funzionali di un ingrediente/alimento come la digeribilità, la capacità di assorbimento dell'acqua e l'accettabilità (Klang *et al.*, 2019).

**Tabella 1.** Contenuto d'umidità, pH ed indici colorimetri degli sfarinati: controllo (C), Bona Vita (BV), Skorpion (S).

Sfarinati	Umidità (%)	pH	L*	a*	b*
C	11.4 $\pm$ 0.9a	5.35 $\pm$ 0.08c	96.1 $\pm$ 0.4d	3.03 $\pm$ 0.11a	16.3 $\pm$ 1.2a
BV	11.3 $\pm$ 0.2a	5.13 $\pm$ 0.05b	82.0 $\pm$ 1.0b	1.78 $\pm$ 0.03c	24.2 $\pm$ 0.6c
S	12.7 $\pm$ 0.3b	5.00 $\pm$ 0.02a	84.5 $\pm$ 2.0c	0.35 $\pm$ 0.12b	19.5 $\pm$ 0.2b

Lettere differenti nell'ambito della stessa colonna indicano differenze significative ( $p < 0.05$ , Duncan test)

Tutti gli sfarinati mostrano valori inferiori al limite legale pari al 14,5%. In particolare, C e BV presentano il valore minore e non differiscono significativamente tra loro ( $p < 0,05$ ). Mentre, la varietà S presenta il valore maggiore ( $p < 0,05$ ). Generalmente le farine di frumento sono caratterizzate da un pH acido con valori compresi tra 4-6, per cui i valori di pH degli sfarinati in esame, che sono compresi tra 5.0 e 5,4 (Tab. 1) sono nella norma. In particolare, la varietà S presenta il valore minore ( $p < 0,05$ ), per il fatto che questi campioni hanno un contenuto più elevato di composti bioattivi, come antiossidanti, tannini, acido fitico, fenoli e acido  $\gamma$ -amminobutirrico (GABA), i quali vengono rilasciati in soluzione (Belobrajdic e Bird, 2013).

In tabella 2 sono riportati gli indici farinografici degli impasti ottenuti con gli sfarinati in esame.

**Tabella 2.** Indici farinografici degli impasti con gli sfarinati: controllo (C), Bona Vita (BV), Skorpion (S).

IMPASTI	t. di sviluppo (min)	t. di stabilità (min)	Elasticità (UB)	Grado di rammollimento (UB)
<b>C</b>	9.43 $\pm$ 0.36c	14.69 $\pm$ 0.19c	55.0 $\pm$ 5.0a	35.0 $\pm$ 5.0a
<b>BV</b>	6.67 $\pm$ 1.14b	10.97 $\pm$ 0.67b	65.0 $\pm$ 5.0a	35.0 $\pm$ 1.5a
<b>S</b>	4.22 $\pm$ 0.05a	4.16 $\pm$ 0.08a	55.0 $\pm$ 5.0a	186.0 $\pm$ 6.0b

Lettere differenti nell'ambito della stessa colonna indicano differenze significative ( $p < 0.05$ , Duncan test)

I parametri esaminati mostrano differenze significative ( $p < 0,05$ ) tra i campioni. In particolare, i tempi di sviluppo e di stabilità degli impasti discriminano gli sfarinati in tre gruppi ( $p < 0,05$ ), evidenziando la buona performance di BV rispetto ad S.

Le proprietà tecnologiche di C, BV e S (Tab. 2) determinano direttamente il loro impiego finale e le proprietà dei pani prodotti C-B, BV-B e S-B riportate in Tabella 3.

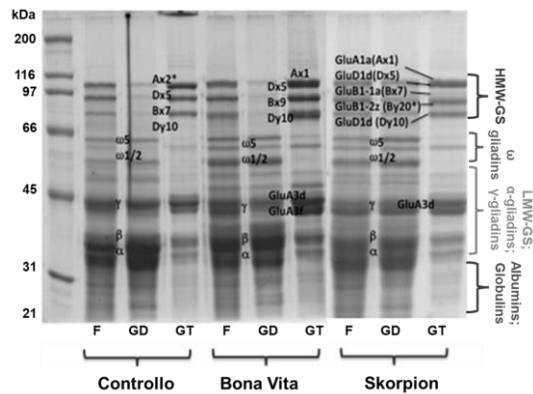
**Tabella 3.** Contenuto di umidità, densità, pH indici colorimetri dei pani prodotti con gli sfarinati: controllo (C), Bona Vita (BV), Skorpion (S).

Pane	Umidità (%)	Densità (g/ml)	pH	L*	a*	b*
<b>C-B</b>	44.4 $\pm$ 0.57a	0.43 $\pm$ 0.03a	5.37 $\pm$ 0.01b	33.9 $\pm$ 1.4a	8.23 $\pm$ 1.15a	19.0 $\pm$ 2.2a
<b>BV-B</b>	46.3 $\pm$ 0.33b	0.45 $\pm$ 0.03b	5.14 $\pm$ 0.07a	43.2 $\pm$ 0.6b	10.9 $\pm$ 0.73b	27.4 $\pm$ 1.6b
<b>S-B</b>	45.6 $\pm$ 0.25b	0.46 $\pm$ 0.02b	5.66 $\pm$ 0.06c	44.6 $\pm$ 1.9b	9.68 $\pm$ 0.14b	28.8 $\pm$ 0.4b

Lettere differenti nell'ambito della stessa colonna indicano differenze significative ( $p < 0.05$ , Duncan test)

Per quanto attiene il contenuto di umidità, la densità ed i parametri colorimetrici di BV-B e S-B non ci sono differenze significative tra loro (Tab. 3), mentre il pane prodotto con C è diverso ( $p < 0,05$ ) ed è caratterizzato dal più basso valore di L\*, che implica un colore più scuro.

L'elettroforesi SDS-PAGE (Fig. 2) degli sfarinati e delle frazioni glutiniche mostra un proteoma molto complesso. L'analisi inoltre attesta che C, BV e S manifestano diversi gradi di espressione delle famiglie proteiche tipiche degli sfarinati.



**Figura 2.** SDS-PAGE degli sfarinati tal quali (F) e delle relative frazioni di Osborne: gliadine (GD) e glutenine (GT).

Nella fattispecie, le bande relative alle glutenine ad alto peso molecolare (HMW-GS) in BV sono più intense rispetto a C e a S, confermando le buone capacità panificatorie di questo sfarinato. Inoltre, in BV è stato riscontrato un maggior contenuto (mg/kg) di carotenoidi totali e di luteina rispetto agli altri campioni ( $p < 0,05$ ) (dati non mostrati).

In conclusione, per le proprietà analizzate, la varietà BV ha mostrato le performances più interessanti.

### Ringraziamenti

Si ringrazia la dott. ssa Giovanna Cataldo per il supporto tecnico.

### Bibliografia

- AACC 1999. *American Association of Cereal Chemists, Approved Methods*, Methods: 44-15.02. Moisture-Air-Oven e 10-05. 01. Measurement of Volume by Rapeseed Displacement. St. Paul, MN.
- Alves-Santos, A. M., Sugizaki, C. S. A., Lima, G. C., & Naves, M. M. V. (2020). Prebiotic effect of dietary polyphenols: A systematic review. *Journal of Functional Foods*, 74: 104169.
- Granado F., Olmedilla B., Gil-Martinez E., Blanco I. 2001. A fast, reliable and low-cost saponification protocol for analysis of carotenoids in vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14(5): 479-489.
- Sharma S., Kapoor P., Kaur S., Kumari A., Sharma N., Kumar A., Chunduri V., Garg M. 2021. Changing Nutrition Scenario: Colored Wheat-A New Perspective. In *Physiological, Molecular, and Genetic Perspectives of Wheat Improvement*, Springer, Cham, pp. 71-88.
- Belobrajdic D.P., Bird A.R. 2013. The potential role of phytochemicals in wholegrain cereals for the prevention of type-2 diabetes. *Nutrition Journal*, 12: 62-74.
- Klang J.M., Tambo T.S., Nguemguo K.L.G., Teboukeu B.G., Ndomou H.S.C., Kohole F.H.A., Womeni H.M. 2019. Effect of bleaching and variety on the physico-chemical, functional and rheological properties of three new Irish potatoes (Cipira, Pamela and Dosa) flours grown in the locality of Dschang (West region of Cameroon). *Heliyon*, 5(12): 29-82.

## Il ruolo dei geni delle polifenol-ossidasi nella storia evolutiva dei frumenti tetraploidi

P. De Vita<sup>1\*</sup>, G. Mangini<sup>2</sup>, M. M. Miazzi<sup>3</sup>, P. Stevanato<sup>4</sup>, F. Taranto<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di Ricerca Cerealicoltura e colture Industriali (CREA-CI), SS 673 km 25+200, 71122 Foggia (FG).

<sup>2</sup>CNR, Istituto di Bioscienze e BioRisorse (IBBR), Via Giovanni Amendola 165/A, 70126 Bari (BA).

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", Via Giovanni Amendola 165/A, 70126 Bari (BA).

<sup>4</sup>DAFNAE, Università degli Studi di Padova, 35020 Legnaro (PD).

\*E-mail: [pasquale.devita@crea.gov.it](mailto:pasquale.devita@crea.gov.it); [francesca.taranto@ibbr.cnr.it](mailto:francesca.taranto@ibbr.cnr.it)

### Abstract

Polyphenol-oxidase (PPO) enzymes are responsible for the enzymatic browning of wheat flour, an aspect that consumers consider negatively. The objective of this study was to examine the genetic variability of PPO activity present in a collection of tetraploid wheat (TWC), consisting of durum wheat varieties (DWC) and wild and domesticated accessions. The entire collection was genotyped using the Illumina 90k Infinium SNP array. The genetic materials were grown in field trials over three growing seasons and the PPO activity was determined by spectrophotometric dosage on the grain. The genome-wide association analysis (GWA), conducted separately on the TWC and DWC, identified 23 and 85 significant associations for PPO levels in the grain, respectively. On the basis of these associations, it was possible to identify two contrasting haplotypes for PPO activity, while the analysis of the genetic divergence ( $F_{ST} > 0,25$ ) between the subspecies of *T. turgidum*, provided useful information to understand the evolutionary process of wheat, and in particular of Persian wheat. The SNP marker "IWA572", identified on chromosome 2A, validated by pyrosequencing, and confirmed the allelic discrimination between the two haplotypes associated with high and low PPO activity.

### Riassunto

Gli enzimi delle polifenol-ossidasi (PPO) sono responsabili dell'imbrunimento enzimatico delle farine di frumento, un aspetto giudicato negativamente dai consumatori. L'obiettivo di questo studio è stato quello di esaminare la variabilità genetica dell'attività delle PPO presente in una collezione di frumenti tetraploidi (TWC), composta da varietà di frumento duro (DWC) ed accessioni selvatiche e domesticate. L'intera collezione è stata genotipizzata mediante la piattaforma Illumina 90k Infinium SNP array. I materiali genetici sono stati allevati in campo nel corso di tre annate agrarie e l'attività PPO è stata determinata mediante dosaggio spettrofotometrico sulla granella. L'analisi di associazione genome-wide (GWA), condotta separatamente sulla TWC e DWC, ha permesso di identificare rispettivamente 23 e 85 associazioni significative per i livelli di PPO nella granella. Sulla base di queste associazioni, è stato possibile individuare due aplotipi contrastanti per attività PPO, mentre, l'analisi della divergenza genetica ( $F_{ST} > 0,25$ ), eseguita tra le sottospecie di *T. turgidum*, ha fornito informazioni utili per comprendere il processo evolutivo dei frumenti ed in particolare del frumento Persiano. Il marcatore "IWA572", identificato sul cromosoma 2A e validato tramite pirosequenziamento, ha confermato la discriminazione allelica tra i due aplotipi associati ad alta e bassa attività PPO.

### Introduzione

Il complesso meccanismo che regola l'espressione dei geni associati all'attività delle PPO nelle piante non è stato ancora del tutto chiarito (Jukanti, 2017). Tuttavia, diversi studi hanno evidenziato un aumento della sintesi delle PPO in condizioni di stress di natura biotica/abiotica, suggerendo un loro ruolo nell'acclimatazione e nella resilienza delle specie agrarie ai cambiamenti



climatici (Boeckx *et al.*, 2015; Jukanti, 2017; Taranto *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2019). Inoltre, i danni prodotti dai parassiti, dai patogeni e dalle calamità ambientali sulle colture, così come il danneggiamento della materia prima durante le fasi di raccolta, stoccaggio e trasformazione, stimolano l'attività delle PPO e dei fenomeni di imbrunimento e deterioramento delle caratteristiche qualitative dei prodotti al consumo.

Nei frumenti tetraploidi (*Triticum turgidum* L.,  $2n = 4x = 28$ ; AABB) ed esaploidi (*Triticum aestivum* L.,  $2n = 6x = 42$ ; AABBDD), l'attività PPO è stata studiata prevalentemente in relazione allo scolorimento e all'imbrunimento delle farine in seguito al processo di molitura (Taranto *et al.*, 2012). Pochissimi, invece, sono gli studi che hanno approfondito il ruolo di questi enzimi nei meccanismi di resistenza agli stress nelle specie cerealicole (Jukanti, 2017; Taranto *et al.*, 2017). In frumento, i geni PPO sono localizzati sul gruppo di omeologia 2 ed organizzati in due famiglie geniche paraloghe, denominate *Ppo-1* e *Ppo-2* (Martin *et al.*, 2011; Beecher 2011; Taranto *et al.*, 2015). QTL (*Quantitative trait loci*) con effetto minore sono stati identificati anche sui cromosomi 3, 5, 6 e 7 (Taranto *et al.*, 2017; Zhai *et al.*, 2020). Tuttavia, studi condotti in precedenza hanno evidenziato come il maggiore effetto sull'attività PPO sia associato alla variazione allelica del gene *Ppo-A1* sul cromosoma 2A (He *et al.*, 2007; Mangini *et al.*, 2014).

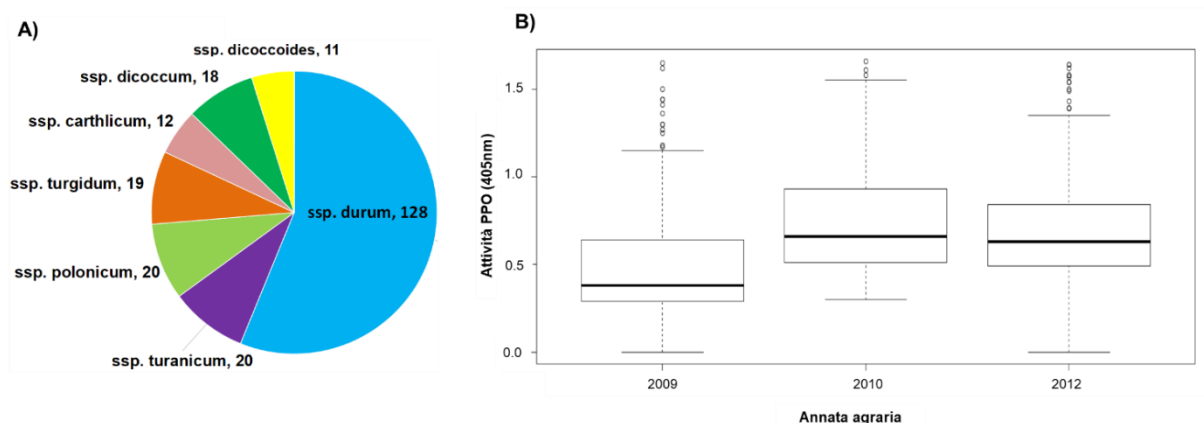
Recentemente, la disponibilità di piattaforme di genotipizzazione *high-throughput* derivate da *microarray* o *genotyping-by sequencing* ed il rilascio dei genomi di riferimento del farro selvatico (Avni *et al.*, 2017) e del frumento duro (Maccaferri *et al.*, 2019), hanno offerto la possibilità di identificare, mediante studi GWA, geni candidati associati alle variazioni dell'attività PPO (Zhai *et al.*, 2020; Sadeque *et al.*, 2018).

L'analisi GWA è uno strumento robusto per identificare geni candidati coinvolti sia nei meccanismi di resistenza a stress biotici/abiotici che nel metabolismo di caratteri qualitativi (Saccomanno *et al.*, 2018; Taranto *et al.*, 2020; Marone *et al.*, 2020; Taranto *et al.*, 2018). Uno dei fattori chiave gli studi di associazione è rappresentato dal tipo di materiale genetico impiegato per le analisi (Sadeque *et al.*, 2018). In genere, le collezioni di genotipi utilizzate nell'analisi GWA sono rappresentate da centinaia di individui che includono ecotipi locali (landraces), vecchie cultivar, varietà moderne ed accessioni selvatiche; queste ultime rappresentano una fonte inestimabile di varianti alleliche naturali (Taranto *et al.*, 2020).

In questo contesto, l'obiettivo del presente lavoro è stato quello di analizzare una collezione molto ampia di frumenti tetraploidi, mediante analisi di associazione GWA, per i) identificare loci/geni associati all'attività polifenol-ossidasi; ii) comprendere le basi genetiche dei meccanismi che regolano l'attività PPO e, iii) sviluppare un marcatore funzionale in grado di discriminare tra genotipi a bassa ed alta attività PPO.

## **Materiale e metodi**

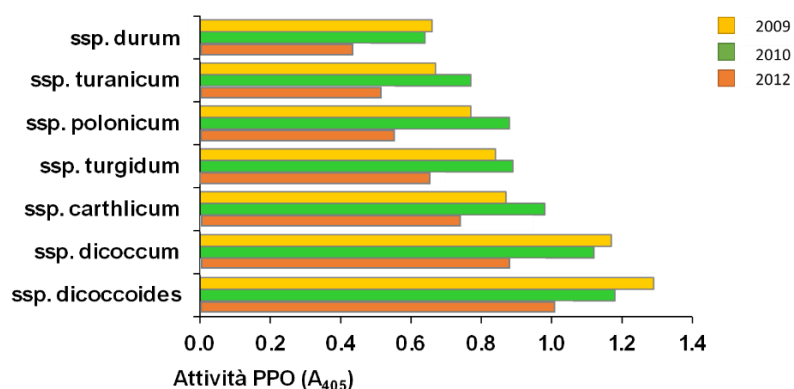
Una collezione di 220 frumenti tetraploidi (*T. turgidum* ssp.), composta da varietà di frumento duro (*T. turgidum* ssp. *durum*), accessioni selvatiche (*T. turgidum* ssp. *dicocoides*) ed accessioni domestiche (*T. turgidum* ssp. *dicoccum*=Farro; *T. turgidum* ssp. *turgidum*=Turgido; *T. turgidum* ssp. *polonicum*=Polonico; *T. turgidum* ssp. *carthlicum*=Persiano), è stata genotipizzata mediante l'impiego della piattaforma Illumina 90k Infinium SNP array (TraitGenetics GmbH, Gatersleben, DE). I materiali genetici sono stati allevati in campo nel corso di tre annate agrarie e l'attività PPO è stata determinata mediante dosaggio spettrofotometrico sulla granella (Taranto *et al.*, 2012) (Fig. 1). L'analisi di associazione genetica (GWA) è stata condotta sia sull'intera collezione di frumenti tetraploidi (TWC) che sul dataset delle varietà di frumento duro (DWC), utilizzando l'algoritmo Mixed linear model (MLM) + Principal component analysis (PCA) + la matrice di Kinship (K). Il marcatore «IWA572» è stato validato tramite pirosequenziamento, utilizzando la piattaforma Pyromark Q48 (Qiagen, Germany).



**Figura 1.** A) Materiale genetico analizzato nel presente lavoro mediante la piattaforma Illumina 90k Infinium SNP array e dosaggio spettrofotometrico sulla granella. B) Box plot che mostra la distribuzione dell'attività PPO nella collezione di frumenti tetraploidi, per le tre annate agrarie.

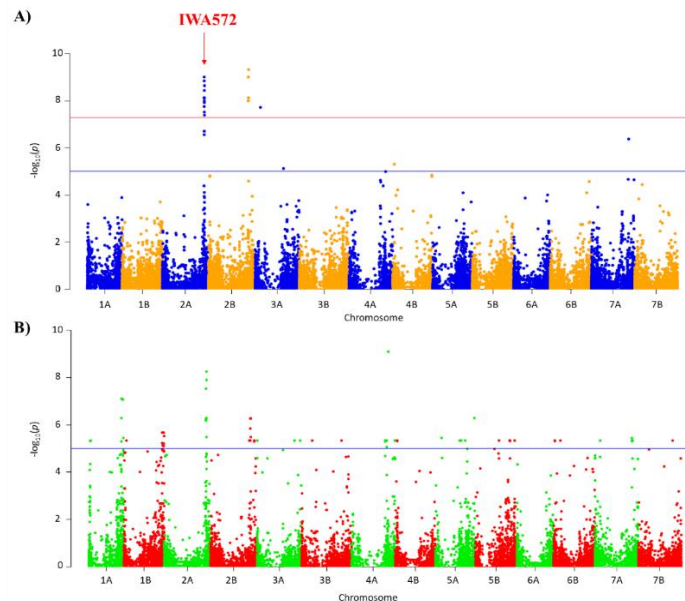
## Risultati e discussione

L'analisi spettrofotometrica ha mostrato un'ampia variabilità per l'attività PPO nella collezione, con i valori minimi registrati nelle varietà di frumento duro e quelli massimi nelle accessioni domestiche e selvatiche (Fig. 2).



**Figura 2.** Distribuzione dei valori di attività PPO per sub-specie nelle tre annate agrarie.

L'analisi GWA ha permesso l'identificazione di 23 e 85 associazioni significative per l'attività PPO, rispettivamente nella TWC e nella DWC. La maggioranza delle associazioni co-localizzava in prossimità dei geni *Ppo* sui cromosomi 2A e 2B (Fig. 3). Successivamente, i marcatori risultati associati nella TWC sono stati utilizzati per valutare la divergenza genetica tra le sub-specie dei frumenti tetraploidi ed i risultati hanno evidenziato una marcata divergenza tra la ssp. *carthlicum* (frumento Persiano) e le restanti ssp. Il marcatore "IWA572", identificato sul cromosoma 2A e validato tramite pirosequenziamento, ha confermato la discriminazione allelica tra i due aplotipi associati alla bassa ed alta attività PPO e quindi la possibilità di essere impiegato in programmi di *marker-assisted selection* (MAS).



**Figura 3.** Manhattan plot generato dall'analisi GWA condotta A) sulla collezione di frumenti tetraploidi (TWC) e B) sulla collezione di frumenti duro. Le due linee indicano la significatività per la correzione di Bonferroni allo 0,05 (rossa) e 0,01 (blu).

## Conclusioni

L'analisi GWA condotta in questo studio ha rivelato l'importante ruolo svolto dai geni PPO sia nel processo evolutivo che di addomesticamento delle specie del genere *Triticum*. La stretta associazione tra i geni *Ppo* ed i gruppi di geni coinvolti nella risposta all'adattamento sembra supportare l'ipotesi che queste regioni genomiche siano coinvolte nella risposta delle piante agli stress ambientali. Inoltre, questo studio ha sottolineato la divergenza genetica esistente tra il frumento Persiano e gli altri frumenti tetraploidi, evidenziando il potenziale utilizzo che questa sub-specie potrebbe avere in futuri programmi di miglioramento genetico come fonte di nuovi alleli. Inoltre, questi risultati aggiungono nuove informazioni riguardo agli effetti prodotti dal miglioramento genetico sul frumento duro. In particolare, la pressione selettiva esercitata sui nuovi materiali genetici per aumentare la produttività, ridurre l'altezza delle piante e/o modificare la durata delle fasi fenologiche, sembra aver influenzato, indirettamente, anche il livello di attività PPO della granella del frumento duro. Questa potrebbe essere la ragione per cui le varietà moderne, iscritte in Italia a partire dalla seconda metà del secolo scorso, presentano livelli di PPO significativamente più bassi rispetto alle varietà antiche e/o ai loro progenitori (i.e. farro).

## Bibliografia

- Boeckx T., Winters A. L., Webb K. J., Kingston-Smith A. H. 2015. Polyphenol oxidase in leaves: is there any significance to the chloroplastic localization? *Journal of Experimental Botany*, 66(12): 3571-3579.
- Jukanti A. 2017. Polyphenol Oxidases (PPOs) in Plants. Springer.
- Taranto F., Pasqualone A., Mangini G., Tripodi P., Miazzi M. M., Pavan S., Montemurro C. 2017. Polyphenol oxidases in crops: Biochemical, physiological and genetic aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2): 377.
- Sharma A., Shahzad B., Rehman A., Bhardwaj R., Landi M., Zheng B. 2019. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules*, 24(13): 2452.

- Taranto F., Delvecchio L. N., Mangini G., Del Faro L., Blanco A., Pasqualone A. 2012. Molecular and physico-chemical evaluation of enzymatic browning of whole meal and dough in a collection of tetraploid wheats. *Journal of Cereal Science*, 55(3): 405-414.
- Martin J. M., Berg J. E., Hofer P., Kephart K. D., Nash D., Bruckner P. L. 2011. Allelic variation of polyphenol oxidase genes impacts on Chinese raw noodle color. *Journal of Cereal Science*, 54(3): 387-394.
- Beecher B., Skinner D. Z. 2011. Molecular cloning and expression analysis of multiple polyphenol oxidase genes in developing wheat (*Triticum aestivum*) kernels. *Journal of Cereal Science*, 53(3): 371-378.
- Taranto F., Mangini G., Pasqualone A., Gadaleta A., Blanco A. 2015. Mapping and allelic variations of Ppo-B1 and Ppo-B2 gene-related polyphenol oxidase activity in durum wheat. *Molecular Breeding*, 35(2): 1-10.
- Zhai S., He Z., Wen W., Liu J., Jin H., Yan J., Xia X. 2020. Genetic architecture of polyphenol oxidase activity in wheat flour by genome-wide association study. *Crop Science*, 60(3): 1281-1293.
- He X. Y., He Z. H., Zhang L. P., Sun D. J., Morris C. F., Fuerst E. P., Xia X. C. 2007. Allelic variation of polyphenol oxidase (PPO) genes located on chromosomes 2A and 2D and development of functional markers for the PPO genes in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 115(1): 47-58.
- Mangini G., Taranto F., Delvecchio L. N., Pasqualone A., Blanco A. 2014. Development and validation of a new Ppo-A1 marker useful for marker-assisted selection in tetraploid wheats. *Molecular Breeding*, 34(2): 385-392.
- Avni R., Nave M., Barad O., Baruch K., Twardziok S. O., Gundlach H., ... Distelfeld A. 2017. Wild emmer genome architecture and diversity elucidate wheat evolution and domestication. *Science*, 357(6346): 93-97.
- Maccaferri M., Harris N. S., Twardziok S. O., Pasam R. K., Gundlach H., Spannagl M., ... Cattivelli L. 2019. Durum wheat genome highlights past domestication signatures and future improvement targets. *Nature Genetics*, 51(5): 885-895.
- Sadeque A., Turner M., Khan A., Ahmed N., Adhikari K. 2018. Identification of quantitative trait loci markers using diversity arrays technology for polyphenol oxidase activity in hexaploid wheat. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 46(3): 243-253.
- Saccomanno A., Matny O., Marone D., Laidò G., Petruzzino G., Mazzucotelli E., ... Mastrangelo A. M. 2018. Genetic mapping of loci for resistance to stem rust in a tetraploid wheat collection. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12): 3907.
- Taranto F., D'Agostino N., Catellani M., Laviano L., Ronga D., Milc J., ... Francia E. 2020. Characterization of Celiac Disease-Related Epitopes and Gluten Fractions, and Identification of Associated Loci in Durum Wheat. *Agronomy*, 10(9): 1231.
- Marone D., Rodriguez M., Saia S., Papa R., Rau D., Pecorella I., ... De Vita P. 2020. Genome-wide association mapping of prostrate/erect growth habit in winter durum wheat. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2): 394.
- Taranto F., Nicolìa A., Pavan S., De Vita P., D'Agostino N. 2018. Biotechnological and digital revolution for climate-smart plant breeding. *Agronomy*, 8(12): 277.
- Taranto F., D'Agostino N., Rodriguez M., Pavan S., Minervini A. P., Pecchioni N., De Vita P. 2020. Whole genome scan reveals molecular signatures of divergence and selection related to important traits in durum wheat germplasm. *Frontiers in Genetics*, 217.

## **Analisi proteomica per l'identificazione di nuovi marcatori del germe di grano**

L. Di Stasio<sup>1\*</sup>, G. Mamone<sup>1</sup>, A. Reale<sup>1</sup>, M. C. Messia<sup>2</sup>, E. Marconi<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Istituto di Scienze dell'Alimentazione, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Roma 64, 83100 Avellino (AV).

<sup>2</sup>Dipartimento Agricoltura, Ambiente e Alimenti (DiAAA), Università degli Studi del Molise, Via Francesco De Sanctis, 86100 Campobasso (CB).

<sup>3</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (CREA-AN), Via Ardeatina 546, 00178 Roma (RM).

\*E-mail: [luigia.distasio@isa.cnr.it](mailto:luigia.distasio@isa.cnr.it)

### **Abstract**

The wheat germ is an important by-product of the flour milling industry, rich in high-value nutrients. In recent years, the growing interest in whole grain foods or flours blended with wheat germ raised the interest of the research community in monitoring biomarkers of germ in processed wheat-based foods. To date, the Wheat Germ Agglutinin (WGA) is considered the only protein biomarker of wheat germ. The unique chemical/physical properties of WGA hamper a clear identification and quantification by mass spectrometry-based techniques. Currently, ELISA and immunoblotting are the tools most commonly used for WGA detection. The aim of this study was to enlarge the inventory of protein markers of wheat germ using bottom-up shotgun approach. Overall, 2000 proteins were identified. Identified proteins were functionality classified by Gene Ontology database, after aligned with the *Oryza sativa* database using Blast2Go software. The molecular functions of identified proteins were classified as “catalytic activity” (46%) and “binding” (54%). Histones and enzymes such as 1-Cys peroxiredoxin A, were the most abundant proteins, according to the iBAQ value. Because high expressed and “easily” detectable by mass spectrometry, these proteins may represent potential new germ biomarkers. This study sets the stage for developing a sensitive shotgun proteomics workflow for the identification of wheat germ in processed and transformed foods.

### **Riassunto**

La WGA è attualmente l'unico bio-marcatore del germe di grano. Le uniche tecniche in grado di rilevare la presenza della WGA sono l'ELISA e il Western blot. L'applicazione di tecniche proteomiche all'avanguardia (proteomica shotgun) ha permesso l'identificazione di nuovi possibili bio-marcatori del germe di grano duro in alternativa alla WGA. Istoni e proteine con importante attività enzimatica quali ossido-reduttasi, deidrogenasi, idrolasi e perossidasi sono state le principali proteine identificate e caratterizzate dalla proteomica shotgun del germe di grano.

### **Introduzione**

Il germe di grano è considerato un prezioso sottoprodotto dell'industria molitoria. Negli ultimi anni il crescente aumento dell'utilizzo di sfarinati miscelati al germe di grano ha reso necessaria l'applicazione di tecniche all'avanguardia in grado di ricercare dei marcatori del germe all'interno di prodotti trasformati. La WGA (wheat germ agglutinin), considerata ad oggi l'unico bio-marcatore del germe di grano, è una piccola proteina (lectina) prevalentemente espressa nel tessuto germinale coinvolta nel sistema immunitario della pianta. Diversi approcci analitici sono stati utilizzati per la purificazione e il rilevamento della WGA, ma ad oggi le uniche tecniche performanti sono l'ELISA e il Western blotting. Il problema relativo a questi metodi è la scarsa specificità degli anticorpi anti-WGA disponibili in commercio per ELISA e le difficoltà analitiche associate all'analisi quantitativa delle misurazioni Western blot (Marengo *et al.* 2022). Una

alternativa alle tecniche immunochimiche è la proteomica, basata sulla spettrometria di massa tandem (MS/MS) ad alta risoluzione accoppiata a tecniche cromatografiche e/o elettroforetiche.

### **Materiali e metodi**

Le proteine del germe di grano duro sono state estratte con buffer riducente (62.5mM Tris-HCl pH 8.5, 2% SDS, 20 mM DTT) carbossimetilate ed idrolizzate con tripsina. Il campione è stato successivamente desalficato su colonna PD10 (desalting). Le proteine purificate sono state analizzate inizialmente mediante elettroforesi (SDS-PAGE) e immunoblotting, utilizzando un anticorpo anti-lectina (*Triticum vulgare* antibody produced in rabbit, Sigma cod. T4144) al fine di rilevare la presenza della WGA.

Successivamente, l'estratto proteico è stato sottoposto ad analisi proteomica shotgun. L'analisi di spettrometria di massa è stata eseguita utilizzando uno spettrometro di massa Q Exactive Orbitrap, accoppiato con uno strumento di cromatografia liquida Ultimate 3000 (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA).

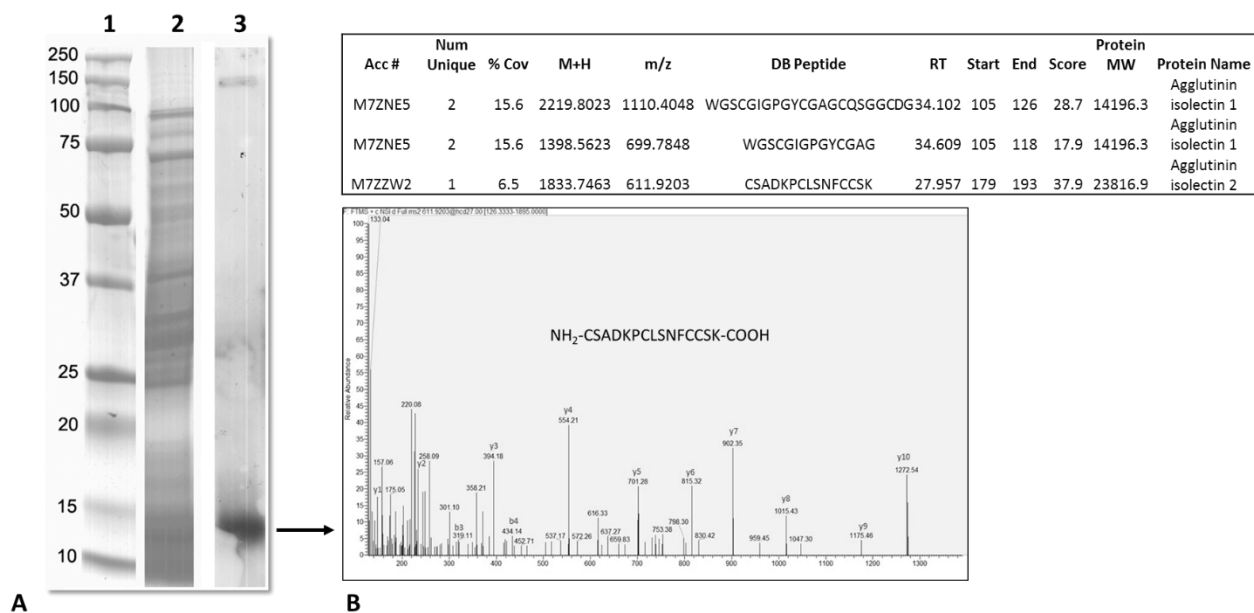
Gli spettri MS/MS risultanti sono stati ricercati contro database del *Triticum* (<https://uniprot.org>), utilizzando il tool bioinformatico MaxQuant (<https://maxquant.org>) (versione 1.6.2.10). I parametri di ricerca in database sono stati impostati in questo modo: carbossimetilazione della Cys e ossidazione della Met, rispettivamente come modificazione fissa e variabile; valore di tolleranza di massa di 10 ppm per lo ione precursore e 20 ppm per i frammenti MS/MS.

Il software Perseus (version 1.6.5.0, Max-Planck-Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany, <https://maxquant.net/perseus>) è stato utilizzato successivamente per effettuare un'analisi statistica dei risultati quantitativi (label free quantitative LFQ) ottenuti dal MaxQuant. Infine, le proteine identificate sono state "blastate" (Blast Search) contro database dell'*Oryza sativa* (tassonomia 4530) mediante software Blast2GO per ottenere una classificazione Gene Ontology. Tale approccio ha permesso di categorizzare ciascuna proteina sulla base dei processi biologici, delle funzioni molecolari e/o dei componenti cellulari e in aggiunta in relazione ad una classificazione enzimatica (EC) e dei pathway metabolici (KEGG).

### **Risultati e discussione**

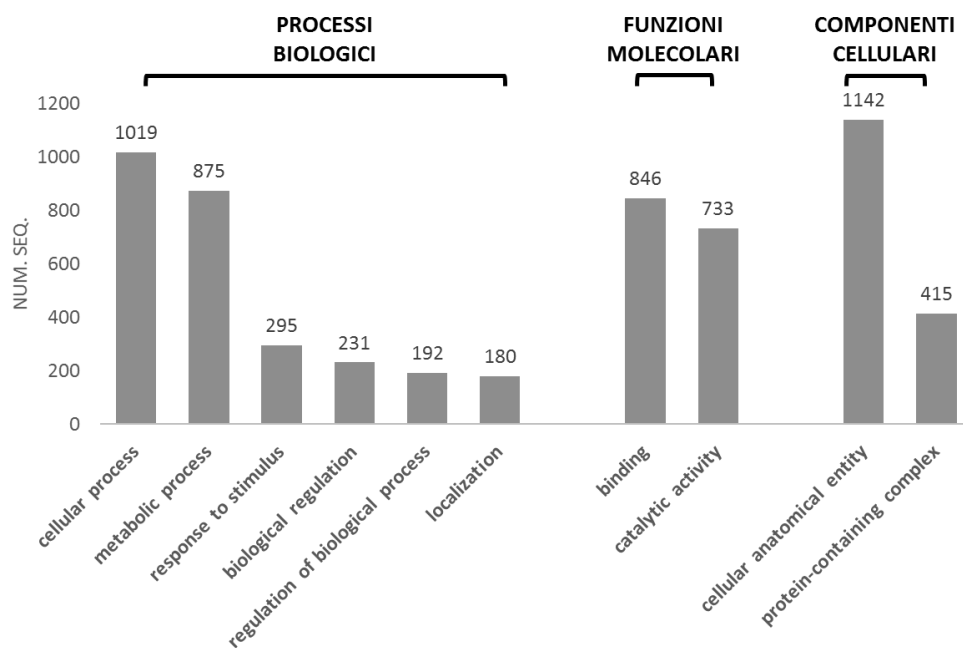
La prima fase del lavoro ha previsto l'applicazione di tecniche elettroforetiche ed immunochimiche per il rilevamento della WGA all'interno della miscela proteica estratta dal germe di grano duro.

La banda nell'SDS-PAGE corrispondente alla WGA, visualizzata mediante immunoblotting con un anticorpo monoclonale anti-lectina (Fig. 1A), è stata identificata mediante analisi di spettrometria di massa (Fig. 1B). L'identificazione mediante LC-HR-MS/MS della WGA ha permesso l'identificazione di solo 2 peptidi a causa della complessa struttura primaria e secondaria della proteina. Ad oggi, tecniche immunochimiche quali ELISA e Western blotting rimangono le uniche in grado di rilevare la WGA, considerato l'unico bio-marcatore del germe di grano (Killilea *et al.* 2020)



**Figura 1.** SDS-PAGE, immunoblotting e analisi di spettrometria di massa dell'estratto di germe di grano. Panel A: Lane 1, marker molecolare. Lane 2, estratto proteico del germe. Lane 3, immunoblotting con anticorpo anti-lectina. Panel B: spettro di massa e identificazione della banda relativa alla WGA.

Considerando questa problematica, lo scopo del lavoro è stato quello di individuare nuovi possibili bio-marcatori proteici del germe di grano duro utilizzando tecniche all'avanguardia quali proteomica shotgun. L'analisi shotgun ha permesso l'identificazione di oltre 2000 proteine. Le proteine identificate sono state successivamente "blastate" contro database dell'*Oryza sativa* per avere una classificazione gene ontology mediante software Blast2GO (Conesa A., Götz S. 2008).

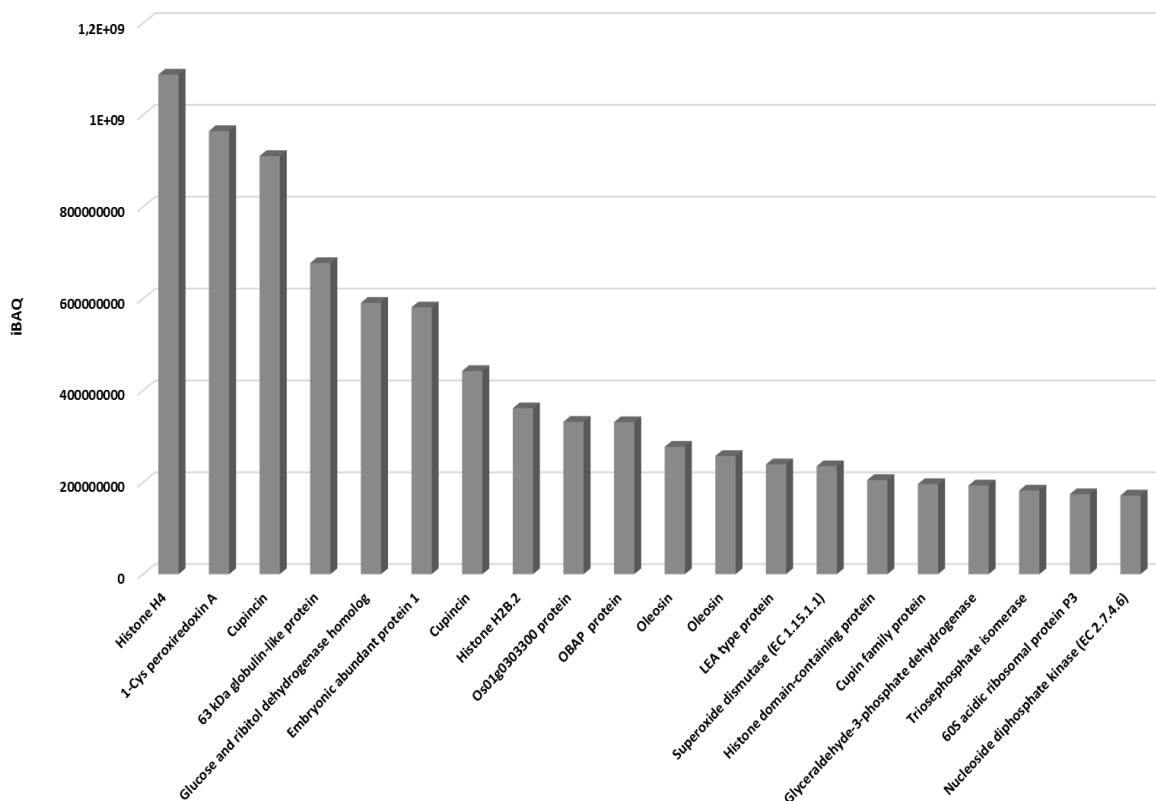


**Figura 2.** Classificazione delle proteine del germe di grano nelle principali classi di Gene Ontology: processi biologici, funzioni molecolari e componenti cellulari. L'istogramma riporta il numero di sequenze associate a ciascuna sottoclasse.

Dall'analisi è emerso che all'interno della categoria dei processi biologici, 1019 sequenze sono associate al "cellular process", 875 al "metabolic process", 295 al "response to stimulus", 231 al "biological regulation", 192 al "regulation of biological process" e 180 al "localization". Tra la classe dei componenti cellulari ritroviamo 1142 sequenze associate con "cellular anatomical entity" e 415 sequenze con "protein-containing complex". Infine, per quanto riguarda la classe delle funzioni molecolari, ritroviamo "binding" e "catalytic activity" come principali gruppi funzionali, con 846 e 733 sequenze rispettivamente assegnate (Fig. 2).

Benché la sua presenza all'interno dell'estratto di germe di grano sia stata verificata mediante immunoblotting, la WGA non è stata identificata mediante analisi shotgun a causa delle caratteristiche chimico-fisiche ad essa attribuite. Ritroviamo una "ricin B-like lectin", una proteina con le caratteristiche funzionali (carbohydrate-binding) simili alla WGA, ma non rilevante in termini quantitativi. Infatti, dall'analisi quantitativa (iBAQ) è emerso che le proteine più rappresentative sono istoni (histone H4 e H2B), cupine, oleosine ed enzimi quali deidrogenasi, superossido dismutasi e perossidasi (Fig. 3). La presenza di queste proteine non sorprende in quanto tutte coinvolte nei sistemi di difesa e di crescita della pianta. I risultati ottenuti infatti sono in linea con Mak Y. e colleghi (2006), i quali hanno evidenziato che circa 2/3 delle proteine identificate nel germe di grano mediante elettroforesi bidimensionale sono coinvolte nello sviluppo e nella crescita dell'embrione attraverso processi come trascrizione e traduzione, energia e metabolismo, trasporto e divisione cellulare.

Alla luce di questi risultati, la proteomica shotgun ha mostrato la possibilità di considerare nuovi bio-marcatori in alternativa alla WGA. In conclusione, questo studio pone le basi per lo sviluppo di nuove strategie analitiche per la caratterizzazione qualitativa e quantitativa di bio-marcatori del germe di grano duro all'interno dei prodotti trasformati.



**Figura 3.** Istogramma rappresentante le 20 proteine più abbondanti in termini iBAQ del germe di grano duro.



## **Bibliografia**

- Conesa A., Götze S. 2008. Blast2GO: a comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *International Journal of Plant Genomics*, 2008.
- Marengo M., Carpen A., Mamone G., Ferranti P., Iametti S. 2022. Quantification of Protein “Biomarkers” in Wheat-Based Food Systems: Dealing with Process-Related Issues. *Molecules*, 27(9): 2637.
- Mak Y., Skylas D.J., Willows R., Connolly A., Cordwell S.J., Wrigley C.W., Sharp P.J., Copeland L. 2006. A proteomic approach to the identification and characterisation of protein composition in wheat germ. *Functional & Integrative Genomics*, 4: 322-37.
- Killilea D.W., McQueen R., Abegania J.R. 2020. Wheat germ agglutinin is a biomarker of whole grain content in wheat flour and pasta. *Journal of Food Science*, 85(3): 808-815.

## **Analisi del proteoma di riserva di farine di frumenti (*T.durum* e *T.aestivum*) cresciuti in presenza di biostimolanti e ammendanti**

S. Graziano<sup>1\*</sup>, M. Caldara<sup>2</sup>, M. Gullì<sup>1,2</sup>, E. Maestri<sup>1,2</sup>, N. Marmiroli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Interdipartimentale SITEIA.PARMA, Università di Parma, Parco Area delle Scienze 181/A, 43124 Parma (PR).

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità Ambientale, Università degli studi di Parma, Parco Area delle Scienze 11/A,43124 Parma (PR).

\*E-mail: [sara.graziano@unipr.it](mailto:sara.graziano@unipr.it)

### **Abstract**

The use of growth-promoting microorganisms (PGPMs) is considered an important strategy to increase the sustainability of agriculture, in a perspective of the reduction of chemical fertilizer input. Under controlled conditions, PGPMs can improve the germination efficiency and vigor, while in field conditions PGPMs can improve soil fertility, resistance to plant pathogens and environmental stresses and hence increase crop productivity and nutritional quality. In this research, *T. turgidum* spp. *durum* cv Svevo and *T. aestivum* cv Bramante were grown in Emilia-Romagna in two years (2019 and 2020) with different treatments that included the presence of a commercial biostimulant and a microbial carrier, biochar from plant biomass, also in combination.

### **Riassunto**

L'uso di microrganismi promotori della crescita (PGPM) è considerato un'importante strategia per aumentare la sostenibilità dell'agricoltura, in un'ottica di riduzione dell'apporto di fertilizzanti chimici. In condizioni controllate, i PGPM sono in grado di migliorare l'efficienza di germinazione e il vigore delle piante, mentre in condizioni di campo i PGPM possono migliorare la fertilità del suolo, la resistenza ai patogeni e agli stress ambientali e quindi aumentare la produttività delle colture e la qualità nutrizionale. In questa ricerca, *T. turgidum* spp. *durum* cv Svevo e *T. aestivum* cv Bramante sono stati coltivati in Emilia-Romagna in due annate (2019 e 2020) con diversi trattamenti che includevano la presenza di un biostimolante commerciale e di un carrier microbico, il biochar ottenuto da biomassa vegetale, anche in combinazione.

### **Introduzione**

Il frumento rappresenta una delle tre più importanti colture di cereali a livello mondiale, insieme a mais e riso. La sua produzione ammonta a 775 milioni di tonnellate nel 2020/2021 (<https://www.statista.com/>) e i maggiori produttori mondiali sono la Cina e l'India. In particolare, la specie *Triticum turgidum* spp. *durum* è utilizzata per la produzione di pasta e di pane tradizionale tipico del bacino del Mediterraneo ed è alla base della dieta di milioni di persone nel mondo. Per sostenere un aumento della produzione per poter fornire cibo sufficiente a soddisfare le richieste di una popolazione mondiale in continuo aumento, è necessario trovare soluzioni più sostenibili dal punto di vista ambientale e sociale per la fertilizzazione delle colture. L'obiettivo è quello di diminuire l'utilizzo di pesticidi e fertilizzanti chimici e valorizzare i microrganismi promotori della crescita (PGPM), naturalmente presenti nel suolo o da inoculare artificialmente. Tali microrganismi stimolano la crescita delle piante attraverso svariati meccanismi: fissano l'azoto molecolare rendendolo prontamente disponibile per le piante; solubilizzano il fosforo rendendolo assimilabile dalla vegetazione; producono fitormoni (auxine, citochinine, gibberelline) influenzando lo sviluppo vegetale e producono siderofori. Per migliorare le performance dei PGPM, è possibile impiegare anche degli ammendanti, come il char (prodotto dalla pirogassificazione di biomasse vegetali), al fine di stimolare la crescita microbica. Il frumento è oggetto di numerosi studi che prevedono l'impiego di PGPM e char, al fine di

sperimentare nuove tecniche più sostenibili per migliorare la resa delle colture (Graziano *et al.*, 2022; Dal Cortivo *et al.*, 2017). A questo si aggiunge anche una selezione di varietà con elevato contenuto proteico e indice di forza del glutine per migliorare le proprietà tecnologiche delle farine e delle semole. Inoltre, è noto che tale variabilità può dipendere sia dalla cultivar ma anche da fattori ambientali come le alte temperature in fase di maturazione e l'impiego di fertilizzanti (Hurkman *et al.* 2013).

In questo lavoro, cultivar di frumento duro e tenero sono state coltivate in Emilia-Romagna in due anni (2019 e 2020) con diversi trattamenti che hanno previsto l'uso di Micosat F1, un biostimolante commerciale, e di un ammendante, biochar di origine vegetale, usati anche in combinazione, per un totale di 4 condizioni di crescita. L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare l'effetto di PGPM e ammendanti su: i) microbioma del suolo rizosferico; ii) parametri agronomici di produttività; iii) componente proteica, in particolar modo la frazione del glutine.

## **Materiali e metodi**

### ***Prove in campo***

Le sperimentazioni in campo sono state eseguite nel corso del 2019 e 2020, in un'azienda agricola (Azienda Stuard, <http://www.stuard.it/>), vicino alla città di Parma (Nord, Italia), (Lat. 44\_4802300N; Long .10\_1603000E; 58 m slm). Le cultivar scelte sono state: Svevo (*T. turgidum* spp. *durum*) e Bramante (*T. aestivum*). I trattamenti scelti sono stati: i) controllo; ii) biochar che è stato applicato prima della semina in ragione di 0,2 kg/m<sup>2</sup> (2 ton/ha), e interrato a una profondità di 10 cm; iii) Micosat F1 contenente sia funghi che batteri promotori della crescita (*Glomus* spp. GB 67, *G. mosseae* GP 11, *G. viscosum* GC 41, *Trichoderma harzianum* TH 01, *Pochonia chlamydosporia* PC 50, *Agrobacterium radiobacter* AR 39, *Bacillus subtilis* BA 41, *Streptomyces* spp. SB 14, *Pichia pastoris* PP59) fornito da CCS Aosta (Aosta, Italia) in forma granulata, è stato applicato nel rapporto 1:1 p/p per gr di semi (che corrispondevano a 14 g/m<sup>2</sup> per Bramante e 20 g/m<sup>2</sup> per Svevo); iv) biochar e Micosat F1. Il biochar impiegato in questa sperimentazione era stato precedentemente caratterizzato (Marmioli *et al.*, 2018). L'esperimento è stato allestito considerando quattro trattamenti con cinque repliche per trattamento. I parametri meteorologici sono stati raccolti giornalmente da una stazione meteorologica automatica, installata vicino al campo sperimentale.

### ***Parametri fisiologici, agronomici e di produttività***

I parametri fisiologici della pianta come l'altezza e la biomassa vegetale sono stati misurati su tre piante di ciascuna parcella. La resa in biomassa di ciascuna pianta è stata determinata misurando separatamente il peso fresco e secco della biomassa aerea e radicale al termine dell'antesi (Z69, scala Zadock). I tessuti vegetali sono stati essiccati in stufa a 70°C e il peso di ogni singola pianta è stato misurato separatamente. Il contenuto di clorofilla, valutato utilizzando il misuratore di clorofilla portatile SPAD-502 plus (Konika Minolta Business Solution Italia Spa, Milano, Italia) e l'analisi della conduttanza stomatica valutata con porometro portatile AP4 (Delta-T Devices, Cambridge, UK), sono stati misurate in fase di botticella (Z49) e in fioritura (Z59). Al termine della prova sono stati valutati i seguenti parametri agronomici: la resa in granella (GY) (t/ha), il peso di 1000 semi (TKW) (g), umidità e peso ettolitrico (kg/hL).

### ***Estrazione e quantificazione del proteoma di riserva***

Il protocollo utilizzato è stato modificato come descritto in Graziano *et al.* (2019). L'estrazione prevede l'impiego di 30 mg di farina da cui separare le tre frazioni del glutine. Il contenuto di gliadine e glutenine ad alto e basso peso molecolare è stato determinato mediante il metodo di Bradford (Bio-Rad Protein Assay Kit, Bio-Rad®, Hercules, CA, USA).

### ***SDS-PAGE e analisi densitometrica***

L'analisi monodimensionale SDS-PAGE è stata condotta sulla componente gliadinica delle due varietà di frumento coltivate nelle quattro condizioni. La separazione è avvenuta con il sistema PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad®) con gel di acrilammide al 12% (per gliadine e glutenine LMW)

e 9% (per glutenine HMW). L'analisi densitometrica delle bande ottenute è stata effettuata mediante il software Image Lab™ (Bio-Rad®).

### Analisi metabarcoding del suolo rizosferico

Cinque-sei g di terreno fresco della rizosfera sono stati raccolti per ciascuna pianta in fase di fioritura (Z59) e conservati a -80 °C fino al momento dell'uso. Il DNA genomico è stato isolato da 250 mg di ciascun campione di terreno della rizosfera raccolto a 60 DAS, utilizzando NucleoSpin® Soil (Macherey-Nagel, Duren, Germania) secondo le istruzioni del produttore. Il sequenziamento Next Generation Sequencing (NGS) è stato eseguito da BMR Genomics Srl (Padova, Italia) applicando procedure standardizzate (Basciani *et al.* 2020, Juhmani *et al.* 2020).

## Risultati e discussione

### Analisi agronomiche

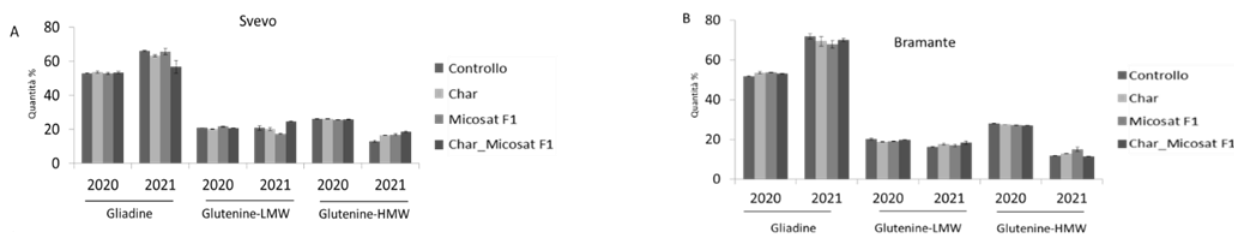
I diversi trattamenti utilizzati hanno determinato variazioni non statisticamente significative sui principali caratteri produttivi presi in considerazione che vengono mostrati in Tabella 1. Le variazioni riscontrate nei parametri analizzati erano riconducibili principalmente all'annata di produzione. Considerando le rese, si è potuto notare che erano in linea con le rese medie osservate sia per il grano duro che per tenero in entrambe le annate in Italia. In particolare, si è riscontrato che in Svevo il trattamento Char\_Micosat F1 ha determinato un incremento produttivo rispetto al controllo sia nel 2020 (+5.4%) che nel 2021 (+11.9%).

**Tabella 1.** Effetti di Biochar, Biochar e Micosat sui caratteri agronomici principali per la produzione del grano

Parametri	Cultivar	Controllo		Char		Micosat F1		Char_Micosat F1	
		2020	2021	2020	2021	2020	2021	2020	2021
Resa produttiva al 13% umidità (t/ha)	Svevo	3.5±0.3	5.1±0.3	3.4±0.3	5.4±0.3	3.4±0.9	5.7±0.3	3.7±0.5	5.7±0.9
	Bramante	3.2±0.4	6.2±0.3	2.6±0.5	6.2±0.5	2.6±0.5	6.1±0.5	3.0±0.3	5.6±1.2
Peso mille semi (g)	Svevo	35.9±1.1	54.0±2.7	47.5±2.2	50.5±1.9	47.7±2.2	52.7±5.3	34.1±0.6	50.9±4.4
	Bramante	34.8±1.8	47.6±4	45.7±1.1	46.5±3.7	49.4±1.6	45.8±2.1	34.6±0.7	44.7±1.0
Umidità (%)	Svevo	11.0±0.2	11.9±0.1	11.7±0.4	11.9±0.1	11.4±0.2	11.7±0.1	10.6±0.4	16.2±8.1
	Bramante	11.2±0.4	12.9±0.1	11.5±0.1	12.9±0.1	11.5±0.2	12.7±0.1	10.8±0.1	12.7±0.1
Peso ettolitrico (kg/hL)	Svevo	84.6±1.7	83.3±0.1	84.8±2.9	83.1±0.1	87.4±1.1	83.2±0.1	84.2±1.8	83.0±0.3
	Bramante	85.2±2.0	81.1±0.3	84.5±0.8	81.4±0.4	86.8±1.7	80.8±0.1	83.8±1.8	80.9±0.5

### Caratterizzazione del proteoma di riserva

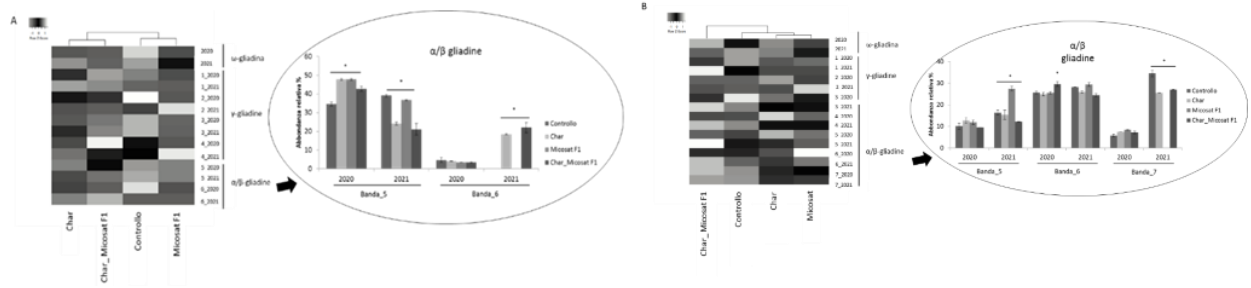
Le proteine del glutine sono state analizzate in Svevo e Bramante in tutti i trattamenti applicati al fine di valutare l'influenza del genotipo e dei trattamenti. I campioni del raccolto 2021 rispetto ai campioni del 2020 sono caratterizzati da un aumento di gliadine e una diminuzione di glutenine HMW in tutte le condizioni analizzate (Fig. 1). L'unica eccezione riguarda i campioni di Svevo trattati con Char\_Micosat F1 in cui si osserva un valore inferiore di gliadine e un aumento di glutenine LMW (Fig. 1A).



**Figura 1.** Resa

d'estrazione in % delle diverse frazioni proteiche di A) Svevo e B) Bramante nel 2020 e 2021 e in funzione dei quattro trattamenti impiegati.

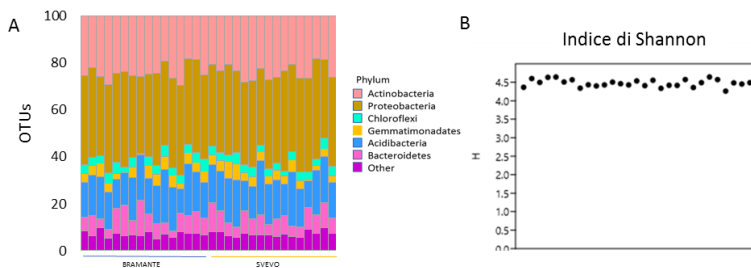
Successivamente è stata effettuata una separazione delle gliadine e delle glutenine LMW mediante SDS-PAGE e un'analisi densitometrica per la quantificazione relativa delle singole bande. Considerando che la frazione più abbondante e più variabile è rappresentata dalle gliadine. Nelle Figure 2A e 2B vengono mostrati i risultati delle analisi densitometriche in cui si osservano variazioni significative per le subunità delle  $\alpha/\beta$ -gliadine in entrambe le cultivars nei due anni in funzione del trattamento impiegato.



**Figura 2.** Visualizzazione dell'abbondanza relativa della componente gliadinica valutata mediante analisi densitometrica dei gel monodimensionali (1D-SDS-PAGE) delle cultivar Svevo (A) e Bramante (B) nei diversi trattamenti.

### Analisi metagenomiche del suolo rizosferico

Le analisi del sequenziamento del gene 16S sono state condotte per entrambe le cultivars nei due anni per tutti i trattamenti impiegati. I risultati ottenuti hanno identificato alcuni phyla dominanti: Proteobacteria. Actinobacteria. Chloroflexi. Gemmatimonadates. Acidobacteria e Bacteroidetes che costituiscono il "core batterico". Inoltre, non sono state riportate variazioni significative della composizione della comunità microbica tra i trattamenti (Controllo. Char. Micosat F1 e Char\_Micosat F1) (Fig. 3A). È stato valutato anche l'indice di diversità  $\alpha$  di Shannon che si mantiene costante nei vari campioni (Fig. 3B).



**Figura 3.** Abbondanza relativa di OTU a livello di phylum (A) e analisi dell'indice Shannon (B) dei dati del sequenziamento del gene 16S dei campioni del 2020.

### Ringraziamenti

Attività finanziata dal programma europeo di Ricerca e innovazione Horizon 2020 (grant agreement No. 818431 (SIMBA)).

### Bibliografia

Basciani S., Camajani E., Contini S., Persichetti A., Risi R., Bertoldi L., Strigari L., Prossomariti G., Watanabe M., Mariani S., Lubrano C., Genco A., Spera G., Gnassi L. 2020. Very-Low-Calorie Ketogenic Diets with Whey. Vegetable. or Animal Protein in Patients with Obesity: A Randomized Pilot Study. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*. 105: 2939-2949. doi:10.1210/clinem/dgaa336.

- Dal Cortivo C., Ferrari M., Visioli G., Lauro M., Fornasier F., Barion G., Panozzo A., Vamerali T. 2020. Effects of Seed-Applied Biofertilizers on Rhizosphere Biodiversity and Growth of Common Wheat (*Triticum aestivum* L.) in the Field. *Frontiers in Plant Sciences*, 11:72. doi: 10.3389/fpls.2020.00072.
- Graziano S., Marando M., Prandi B., Boukid F., Marmiroli N., Francia E., Pecchioni N., Sforza S., Visioli G., Gullì M. 2019. Technological Quality and Nutritional Value of Two Durum Wheat Varieties Depend on Both Genetic and Environmental Factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 67: 2384-2395. Doi: 10.1021/acs.jafc.8b06621.
- Graziano S., Caldara M., Gullì M., Bevivino A., Maestri E., Marmiroli N. 2022. A Metagenomic and Gene Expression Analysis in Wheat (*T. durum*) and Maize (*Z. mays*) Biofertilized with PGPM and Biochar. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18): 10376.
- Hurkman W.J., Tanaka C.K., Vensel W.H., Thilmony R., Altenbach S.B. 2013. Comparative proteomic analysis of the effect of temperature and fertilizer on gliadin and glutenin accumulation in the developing endosperm and flour from *Triticum aestivum* L. cv. Butte 86. *Proteome Science*, 11:8.
- Juhmani A.S., Vezzi A., Wahsha M., Buosi A., De Pascale F., Schiavon R., Sfriso A. 2020. Diversity and Dynamics of Seaweed Associated Microbial Communities Inhabiting the Lagoon of Venice. *Microorganisms*. 8: 1-23. doi:10.3390/microorganisms8111657.
- Marmiroli M., Bonas U., Imperiale D., Lencioni G., Mussi F., Marmiroli N., Maestri E. 2018. Structural and Functional Features of Chars From Different Biomasses as Potential Plant Amendments. *Frontiers in Plant Sciences*, 9:1119. doi: 10.3389/fpls.2018.01119.

## Accessioni di farro dicocco: caratterizzazione bio-agronomica e qualitativa

A. Iori\*, A. Belocchi, A. Cammerata, E. Galassi, E. Gosparini, M. Fornara, V. Mazzon, F. Taddei, F. Quaranta

Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari, Via Manziana 30, 00189 Roma (RM).

\*E-mail: [angela.iori@crea.gov.it](mailto:angela.iori@crea.gov.it)

### Abstract

It is essential to safeguard biodiversity to improve qualitative and quantitative characteristics of productions and reduce the “genetic erosion” of plant species. CREA-IT, Rome, has a collection of numerous *Triticum turgidum* L. subsp. *dicoccum* (emmer) accessions and participates in the "Plant Genetic Resources"(PGRs) programs of FAO. PGRs are more resilient to abiotic and biotic stresses, which can help overcoming challenges such as climate change and/or fungal outbreaks. PGRs have a broad gene pool that could be used for plant genetic breeding to increase food production. This study was conducted in 6 farming growing seasons (from 2014-15 to 2019-20) on 19 emmer accessions. Beside allowing the conservation and enhancement of the germplasm, our study made possible to improve knowledge and obtain information on the main bio-agronomic and qualitative characteristics of the accessions (yield, protein content, SDS test, gluten index and yellow index) and on their resistant or susceptible behaviour towards several fungal diseases.

### Riassunto

La salvaguardia della biodiversità è fondamentale per migliorare le caratteristiche qualitative e quantitative delle produzioni e ridurre «l'erosione genetica» delle specie vegetali. Il CREA-IT, sede di Roma, dispone di una collezione di numerose accessioni di *Triticum turgidum* L. subsp. *dicoccum* (farro dicocco) e partecipa ai programmi “Risorse Genetiche Vegetali” (RGV) della FAO. Le specie RGV sono più rustiche e resilienti agli stress abiotici e biotici, aspetto importante in questo periodo di forti cambiamenti climatici che espongono le piante a notevoli condizioni avverse e/o a epidemie fungine, e costituiscono un serbatoio di geni a cui eventualmente attingere per il miglioramento genetico. L'attività, condotta in 6 annate agrarie (dal 2014-15 al 2019-20), ha riguardato 19 accessioni di farro e, oltre alla conservazione e valorizzazione del germoplasma, ha consentito di potenziare le conoscenze e acquisire informazioni sulle principali caratteristiche bio-agronomiche e qualitative (produzione, contenuto in proteine, SDS test, indice di glutine e colore) delle accessioni e sul loro comportamento, resistente o suscettibile, verso diverse fitopatie.

### Introduzione

Contrastare la fame nel mondo e soddisfare le esigenze alimentari di una popolazione in forte crescita demografica (9,7 miliardi di persone nel 2050, stime ONU 2019) rappresentano le sfide principali per l'agricoltura del XXI secolo. Purtroppo, il numero di persone che non hanno accesso a fonti sicure e adeguate di cibo è in aumento, secondo quanto riportato nel rapporto FAO “*The State of Food Security and Nutrition in the World*” (2021), in parte anche a causa dei prolungati effetti della recente pandemia. La situazione sembra destinata a peggiorare, soprattutto nei Paesi poveri, come conseguenza della guerra in Ucraina, importante snodo commerciale dei cereali nel mondo, e per l'emergenza climatica in corso. A livello globale, le recenti azioni dell'uomo hanno provocato inoltre un'elevata “erosione genetica” delle specie vegetali e animali, minando gli equilibri degli ecosistemi e della sostenibilità ambientale. La salvaguardia della biodiversità, realizzata mediante la valorizzazione delle risorse genetiche vegetali per l'alimentazione, potrebbe risultare strategica anche per preservare un'imprescindibile produttività. Queste specie vegetali

costituiscono un utile serbatoio di geni a cui attingere per il miglioramento genetico, al fine di ottenere cultivar più produttive e resilienti agli stress abiotici (temperature elevate, siccità, salinità, riduzione della sostanza organica, ecc.) e biotici (patogeni fungini, insetti, batteri, ecc.) in questo periodo di forti cambiamenti climatici che espongono le piante a notevoli condizioni avverse (Konvalina *et al.*, 2010).

Il Consiglio per la Ricerca e l'analisi dell'Economia Agraria - Centro ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari (CREA-IT), di Roma, partecipa da molti anni ai programmi RGV-FAO ed è impegnato nella conservazione e rinnovamento di germoplasma cerealicolo (Quaranta *et al.*, 2018; 2014). In particolare, dispone di numerose accessioni di *Triticum turgidum* L. subsp. *dicoccum* (farro dicocco) un cereale che è stato tra i primi ad essere domesticato dall'uomo. Oltre ad aver avuto un ruolo basilare nel processo evolutivo che ha portato alle attuali cultivar di frumento, questa specie potrebbe essere ancora utile negli ambienti svantaggiati e marginali, essendo più rustica e tollerante agli stress; inoltre, è valida e concreta materia prima alternativa per l'agricoltura biologica (Iori *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2017). Attualmente si osserva infine un crescente interesse verso i "cereali minori" integrali per il loro contenuto di componenti regolatori di importanti funzioni vitali, come le fibre, le sostanze antiossidanti e i fitosteroli, che ne permettono la trasformazione in alimenti funzionali ad elevato valore dietetico e/o nutrizionale (Spina e Zingale, 2022).

### **Materiali e metodi**

Nel poliennio 2015-2020, 19 accessioni di farro sono state saggiate in due epoche di semina nel campo sperimentale di Roma, secondo un disegno sperimentale a blocchi randomizzati in parcelle di 10 m<sup>2</sup> con 3 ripetizioni. Per i diversi genotipi è stato valutato il comportamento (resistente o suscettibile) verso le principali malattie fungine, considerando sia l'altezza raggiunta dalla malattia sulla pianta sia la severità dell'attacco (Pasquini *et al.*, 2003). Sono state acquisite le principali caratteristiche bio-agronomiche: data di spigatura, altezza delle piante, produzione, peso 1000 spighe e peso 1000 cariossidi. In alcune annate, inoltre, sulla granella sono state effettuate alcune analisi qualitative: contenuto in proteine (Leco FP428), test SDS (volume di sedimentazione in sodio-dodecilsolfato, mediante metodo indiretto per la valutazione della qualità del glutine - Metodo ICC n. 151 con concentrazione di SDS al 3%) (Dexter *et al.*, 1980), Gluten Index (GI) con metodo diretto per la valutazione della qualità del glutine (Glutomatic System, metodo ICC 158) e colore (indice di giallo) determinato mediante colorimetro a riflessione Minolta Chromameter CR 400. Nell'annata 2017-18 è stata anche effettuata l'analisi della capacità antiossidante totale (TAC), seguendo il metodo diretto di Martini *et al.* (2014). Al fine di evidenziare eventuali inquinamenti del materiale in conservazione e di verificare quindi il mantenimento in purezza delle accessioni, sono state analizzate le cariossidi per le loro proteine di riserva mediante elettroforesi in SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis), secondo quanto riportato in Pogna *et al.* (1990), le subunità gluteniniche ad alto peso molecolare (HMW-GS) sono state identificate secondo la nomenclatura di Payne *et al.* (1983).

### **Risultati e discussione**

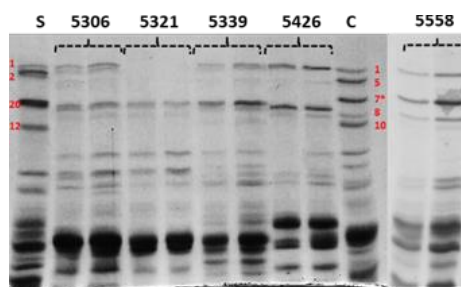
Nel poliennio l'attività svolta ha consentito la conservazione e valorizzazione del germoplasma; inoltre, le accessioni sono state caratterizzate per la loro risposta alla semina autunnale (5) o primaverile (14), utilizzando anche i risultati degli anni precedenti ottenuti in ambienti marginali (Tab. 1).



**Tabella 1.** Caratterizzazione delle accessioni di farro per la risposta all'epoca di semina.

Semina autunnale		Semina primaverile					
Accessione	Origine	Accessione	Origine	Accessione	Origine	Accessione	Origine
5306	Etiopia	3521	--	5276	Iran	5402	Iran
5321	Germania	4365	--	5277	Iran	5404	Iran
5339	Etiopia	4366	--	5329	India	5405	Iran
5426	Iran	4368	--	5347	Etiopia	5418	Iran
5558	Armenia	4388	--	5392	Etiopia		

In base ai profili proteici evidenziati dall'elettroforesi in SDS-PAGE (Fig. 1) è stato possibile rilevare come tutte le accessioni di farro siano diverse l'una dall'altra e non mostrino inquinamenti al loro interno, a conferma del mantenimento in purezza del materiale conservato e riprodotto in campo.



**Figura 1.** Frazionamento in SDS-PAGE delle proteine di riserva di 5 accessioni di farro. Cultivar testimoni: San Pastore (S) e Centauro (C). High Molecular Weight-Gluten Subunits: 1, 20, 2+12 e 1, 7\*+8, 5+10 rispettivamente)

Il monitoraggio fitopatologico ha permesso di individuare la presenza di varie malattie (complesso della septoriosi, ruggine bruna, ruggine nera e, soprattutto, ruggine gialla) causate dai patogeni fungini che colpiscono le specie appartenenti al genere *Triticum* (Tab. 2). Due accessioni a semina autunnale (5306 e 5558) hanno mostrato un comportamento resistente o moderatamente resistente verso gli agenti causali delle principali fitopatie. Tutti i genotipi a semina primaverile hanno subito l'attacco di *Puccinia striiformis* (agente causale della ruggine gialla) in uno o più anni di prova; tuttavia, sembra interessante sottolineare che sulle accessioni: 4365, 4366, 4388 e 5392 non è stata riscontrata nessuna delle altre malattie.

Le principali caratteristiche bio-agronomiche e qualitative delle accessioni in prova hanno indicato una certa variabilità (tab. 3). Lo sviluppo in altezza dei genotipi è risultato mediamente alto, mentre le rese sono state decisamente contenute (tra 0,41 e 1,61 t/ha) con il peso 1000 cariossidi compreso tra 25,3 g e 46,2 g. Per quanto riguarda i principali indici di qualità, sono stati riscontrati: un elevato tenore proteico della granella (13,8-21,0% s.s.), una grande differenza di GI (1-56) e un valore SDS maggiore nelle accessioni a semina primaverile (media 29,7 mL), rispetto a quelle a semina autunnale (26,7 mL); anche l'indice di giallo ha mostrato una differenza tra le due epoche di semina (14,5 e 12,3, rispettivamente).

**Tabella 2.** Risposta delle accessioni all'attacco dei patogeni fungini.

	Accessione	Complesso della septoriosi	Ruggine bruna	Ruggine gialla						Ruggine nera
				2015	2016	2017	2018	2019	2020	
Semina primaverile	3521	4	0	6	9	4	6	4	5,8	0
	4365	0	0	4	4	0	3	3	2,8	0
	4366	0	0	4	-	0	3	3	2,5	0
	4368	0	0	2	7	0	4	3	3,2	7
	4388	0	0	7	7	0	3	5	4,4	0
	5276	2	2	7	9	0	8	7	6,2	0
	5277	0	5	3	9	0	4	3	3,8	0
	5329	5	2	5	-	1	6	9	5,1	0
	5347	3	3	3	-	1	7	0	2,6	0
	5392	0	0	8	8	7	8	8	7,8	0
	5402	2	0	6	9	4	8	8	7,0	0
	5404	5	0	7	-	2	8	9	6,5	0
	5405	2	0	7	9	1	7	9	6,5	0
	5418	2	1	7	9	0	7	3	5,2	0
<b>Media</b>	<b>1,8</b>	<b>0,9</b>	<b>5,4</b>	<b>8,0</b>	<b>1,3</b>	<b>5,9</b>	<b>5,3</b>	<b>5,0</b>	<b>0,5</b>	
Semina autunnale	5306	0	2	3	-	0	NS	0	1,0	NS
	5321	0	0	4	5	0	NS	2	2,8	NS
	5339	0	3	4	3	0	NS	3	2,5	NS
	5426	-	-	4	5	2	NS	7	4,5	NS
	5558	0	0	2	-	0	NS	2	1,3	NS
	<b>Media</b>	<b>0</b>	<b>1,3</b>	<b>3,4</b>	<b>4,3</b>	<b>0,4</b>	<b>NS</b>	<b>2,8</b>	<b>2,4</b>	<b>NS</b>

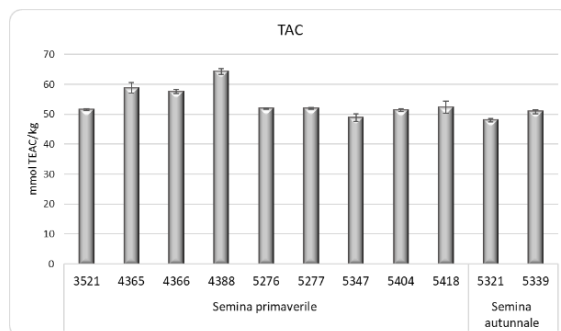
0-1: resistente; 2-3: moderatamente resistente; 4-6: moderatamente suscettibile; 7-9: suscettibile. NS= semina non effettuata

**Tabella 3.** Caratterizzazione bio-agronomica e qualitativa delle accessioni di farro.

	Accessione	Spigatura gg da 1/4 n.	Altezza pianta cm	Produzione t.q. t/ha	Peso 1000 spigchette g	Peso 1000 cariossidi g	Proteine granella % s.s.	SDS mL	Gluten Index	Indice di giallo
Semina primaverile	331	38	88	0,93	80,0	33,0	15,7	24	3	14,0
	3521	45	100	1,01	61,2	29,0	15,5	32	6	15,2
	4365	55	114	1,00	62,6	26,1	18,8	33	6	14,1
	4366	54	118	0,67	59,6	25,3	20,7	29	12	14,0
	4368	49	115	0,93	67,0	26,3	21,0	29	10	14,1
	4388	51	108	1,11	73,2	30,2	19,8	29	30	14,5
	5276	46	96	0,85	64,2	31,8	15,9	31	27	14,1
	5277	46	91	0,97	67,7	30,8	17,6	28	2	15,0
	5329	41	91	0,86	68,7	30,8	16,5	30	32	14,0
	5347	46	90	1,24	64,7	30,6	15,4	33	56	15,3
	5392	46	107	0,76	70,1	31,0	16,6	28	14	14,1
	5402	48	95	0,64	63,6	28,7	17,0	37	50	15,6
	5404	48	92	0,79	56,9	27,4	17,0	32	24	15,5
	5405	46	104	1,21	61,5	28,6	13,8	21	1	13,9
5418	44	94	0,79	58,5	26,7	15,1	30	24	14,2	
<b>Media</b>	<b>46,8</b>	<b>100,1</b>	<b>0,92</b>	<b>65,3</b>	<b>29,1</b>	<b>17,1</b>	<b>29,7</b>	<b>20,0</b>	<b>14,5</b>	
Semina autunnale	5306	43	113	1,61	74,9	35,3	14,3	32	30	12,6
	5321	40	113	1,42	75,3	28,2	14,2	23	56	12,0
	5339	37	115	1,18	94,7	46,2	15,1	27	43	11,7
	5426	36	121	1,07	76,9	36,0	15,8	20	--	--
	5558	40	116	1,18	69,4	26,8	16,2	31	3	12,9
	<b>Media</b>	<b>39,2</b>	<b>115,7</b>	<b>1,29</b>	<b>78,2</b>	<b>34,5</b>	<b>15,1</b>	<b>26,7</b>	<b>33,0</b>	<b>12,3</b>

Nella sola annata 2017-18, su alcune accessioni, è stata effettuata l'analisi della capacità antiossidante totale (TAC). I dati preliminari (Fig. 2) mostrano una discreta variabilità nei livelli di TAC tra le linee di farro a semina primaverile (valori tra  $48,8 \pm 1,0$  e  $64,3 \pm 1,0$  mmol TEAC/kg), mentre per le due linee a semina autunnale i livelli di TAC risultano leggermente inferiori ( $48,0 \pm 0,5$  e  $50,9 \pm 0,7$  mmol TEAC/kg) rispetto al valore medio riscontrato nella semina primaverile ( $54,28 \pm 0,6$  mmol TEAC/kg).

In conclusione, lo studio sulle risorse genetiche ha fornito informazioni utili per eventuali futuri programmi di miglioramento genetico per lo sviluppo di nuove varietà caratterizzate da una migliore capacità di adattamento ai diversi ambienti di coltivazione presenti nel territorio e dotate di buona potenzialità produttiva associata a resistenza/tolleranza ai principali patogeni fungini.



**Figura 2.** Risultati preliminari della TAC di 11 farri (9 a semina primaverile e 2 a semina autunnale)

Lavoro svolto nell'ambito del programma "Trattato internazionale sulle risorse fitogenetiche per l'alimentazione e l'agricoltura RGV-FAO", finanziato dal MiPAAF".

### Bibliografia

- Dexter J. E., Matsuo R. R., Kosmolak F. G., Leisle D., and Marchylo B. 1980. The suitability of the SDS-sedimentation test for assessing gluten strength in durum wheat. *Canadian Journal of Plant Science*, 60: 25-29.
- Iori A., Belocchi A., Fornara M., Quaranta F. 2022. Incidenza di fitopatie fungine su farro e spelta. *L'Informatore Agrario*, 2: 47-49.
- Konvalina P., Moudrý J., Dotlačil L., Stehno Z. & Moudrý J. Jr. 2010. Drought tolerance of land races of emmer wheat in comparison to soft wheat. *Cereal Research Communications*, 38: 429-439.
- Liu W., Maccaferri M., Chen X., Laghetti G., Pignone D., Pumphrey M., Tuberosa R. 2017. Genome-wide association mapping reveals a rich genetic architecture of stripe rust resistance loci in emmer wheat (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccum*). *Theoretical and Applied Genetics*, 130: 2249-2270
- Martini D., Taddei F., Nicoletti I., Ciccoritti R., Corradini D., D'Egidio MG. 2014. "Effects of genotype and environment on phenolic acids content and total antioxidant capacity in durum wheat". *Cereal Chemistry*, 91(4): 310-317.
- Pasquini M., Pancaldi D., Casulli F., Iori A., Riccardi M., Gazza L., Cacciatori P., Faccini N., Corazza L., Santori A., Vallega V., Rubies-Autonell C., Delogu G. 2003. Metodi per il rilievo delle malattie in campo, 79-86. In: *Malattie dei cereali*. Pasquini M. e Delogu G. Failli Editore.
- Payne P. I., Lawrence G. J. 1983. Catalogue of alleles for the complex gene loci, Glu-A1, Glu-B1, and Glu-D1 which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Research Communications*, 29-35.
- Pogna N. E., Autran J. C., Mellini F., Lafiandra D., Feillet P. 1990. Chromosome 1B-encoded gliadins and glutenin subunits in durum wheat: genetics and relationship to gluten strength. *Journal of Cereal Science*, 11(1): 15-34.
- Quaranta F., Belocchi A., Cammerata A., Fornara M., Gosparini E., Iori A., Melloni S. 2018. Caratterizzazione di una collezione di frumenti vestiti. Convegno Progetto RGV-FAO. Mipaaf - Roma 06-07/06/2018.
- Quaranta F., Belocchi A., Camerini M., Cecchini C., Fornara M., Pucciarmati S., D'Egidio M.G. 2014. Evaluation of a hulled wheat (emmer and spelt) collections. Proceedings of the International Symposium on Genetics and Breeding of Durum Wheat, 127-130.
- Rapporto FAO "The State of Food Security and Nutrition in the World". 2021.
- Spina A., Zingale S. 2022. Health Benefits of Minor Cereals. doi:org/10.1016/B978-0-12-823960-5.00009-3.

## **Valutazione dell'uniformità genetica di varietà autoctone siciliane di frumento duro attraverso lo studio delle proteine del glutine**

*S. Masci<sup>1\*</sup>, S. Palombieri<sup>1</sup>, S. Potestio<sup>1</sup>, M. Bonarrigo<sup>1</sup>, F. Sestili<sup>1</sup>, D. Lafiandra<sup>1</sup>, C. Miceli<sup>2</sup>, B. Messina<sup>3</sup>, G. Russo<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Università degli Studi della Tuscia, DAFNE, Via San Camillo de Lellis snc, 01100 Viterbo (VT).

<sup>2</sup>CREA - DC, Viale Regione Siciliana Sud Est 8669 - 90121 Palermo (PA).

<sup>3</sup>Consorzio Gian Pietro Ballatore, Z.I. Dittaino, 90010, Assoro (EN).

\*E-mail: [masci@unitus.it](mailto:masci@unitus.it)

### **Abstract**

Whereas modern varieties can enter the national register only if meeting the “Distinguishability, Uniformity and Stability” criteria as well as a high "overall quality index", local conservation varieties escape this regulation and can be certified under different EU Directives having, as overall objective, the preservation of biodiversity and the containment of genetic erosion. In recent years there has been a growing consumer interest in ancient grains whose derived products are perceived as healthier, with consequent higher market prices. Since 23 ancient durum wheat varieties, out of a total of 27 registered in the national register of conservation varieties, are Sicilian, it is obvious that there is a great interest in these materials. Ancient varieties, compared to modern grains, have a wide genetic variability, making them vulnerable of fraud because they are difficult to trace. It is important, therefore, to determine the genetic profiles of autoctonous Sicilian varieties. This can be done by electrophoretic profiling of gluten proteins, which also gives information on the technological properties of derived products. Fifty-five accessions belonging to 22 ancient varieties of Sicilian durum wheat were analyzed; the results obtained contribute to their traceability, allowing local farmers and producers to valorize their products and assure consumers about the transparency of the entire supply chain.

### **Riassunto**

Mentre le varietà moderne possono essere iscritte nel registro nazionale solo se soddisfano i criteri di Distinguibilità, Uniformità e Stabilità (DUS) e presentano un alto indice di qualità globale, le varietà locali da conservazione sfuggono a questa normativa e possono essere certificate in base ad altre direttive dell'UE il cui obiettivo generale è la conservazione della biodiversità e il contenimento dell'erosione genetica. Negli ultimi anni è cresciuto l'interesse dei consumatori per i grani antichi, i cui prodotti sono percepiti come più salubri, con conseguenti prezzi di mercato più elevati. Poiché 23 varietà di grano duro antico, su un totale di 27 iscritte al registro nazionale delle varietà da conservazione, sono siciliane, è evidente che l'interesse sia grande. Le varietà antiche, rispetto ai grani moderni, presentano un'ampia variabilità genetica, che le rende vulnerabili alle frodi perché difficilmente rintracciabili. È importante, quindi, determinarne i profili genetici. Ciò può essere fatto attraverso il profilo elettroforetico delle proteine del glutine, che fornisce anche informazioni sulle proprietà tecnologiche dei prodotti. Sono state analizzate 55 accessioni appartenenti a 22 varietà antiche di grano duro siciliano; i risultati ottenuti contribuiscono alla loro tracciabilità, consentendo agli agricoltori e ai produttori locali di valorizzare i loro prodotti e di garantire ai consumatori la trasparenza dell'intera filiera.

### **Introduzione**

Le “varietà locali da conservazione” (comunemente indicate come “grani antichi”) sono popolazioni che non rientrano negli standard normativi che oggi definiscono le cosiddette varietà moderne. Queste ultime soddisfano i requisiti previsti dalla Legge 25/11/1971, n. 1096 (più recentemente modificata dal D.lgs. 2/2/2021, n. 20), che fa sì che tali varietà possano essere iscritte

al registro nazionale solo se posseggono requisiti DUS, oltre ad un elevato “indice di qualità globale”. Le varietà locali da conservazione, invece, sfuggono, per alcuni aspetti, a questo binario normativo e possono essere certificate nell’ambito delle direttive UE 2008/62/CE e 2009/145/CE (recepite con D. Leg. 149/ 2009 e Decreto 17/12/2010, anche queste inglobate dal D.lgs. 2/2/2021 n. 20). Tali direttive hanno come obiettivo generale la salvaguardia della biodiversità e il contenimento dell’erosione genetica in agricoltura.

Negli ultimi anni si assiste a un interesse crescente dei consumatori verso i “grani antichi” i cui prodotti derivati vengono percepiti come più salubri, fino a riconoscerne un valore aggiunto e prezzi di mercato elevati.

Sui grani autoctoni siciliani si è acceso un interesse non solo locale, in quanto tra essi vi sono genotipi popolari, i cui prodotti sono presenti nella GDO nazionale. Le antiche varietà però, rispetto ai grani moderni, presentano un’ampia variabilità genetica, che, se da un lato rappresenta la loro ricchezza, in quanto le rende adattabili a diversi ambienti sebbene associata a bassa produttività, dall’altro le rende vulnerabili di frode perché difficilmente tracciabili.

Attualmente sono iscritte al Registro nazionale delle varietà da conservazione 27 varietà di frumento duro e 23 di queste sono siciliane. Negli ultimi anni è aumentato anche l’interesse del mondo scientifico per queste varietà grazie alla loro variabilità genetica, non essendo uniformi come le varietà moderne, e la loro maggiore adattabilità alle condizioni ambientali, che le rende appetibili come fonti di geni di interesse per il miglioramento genetico (Ruisi *et al.*, 2015; Taranto *et al.*, 2020).

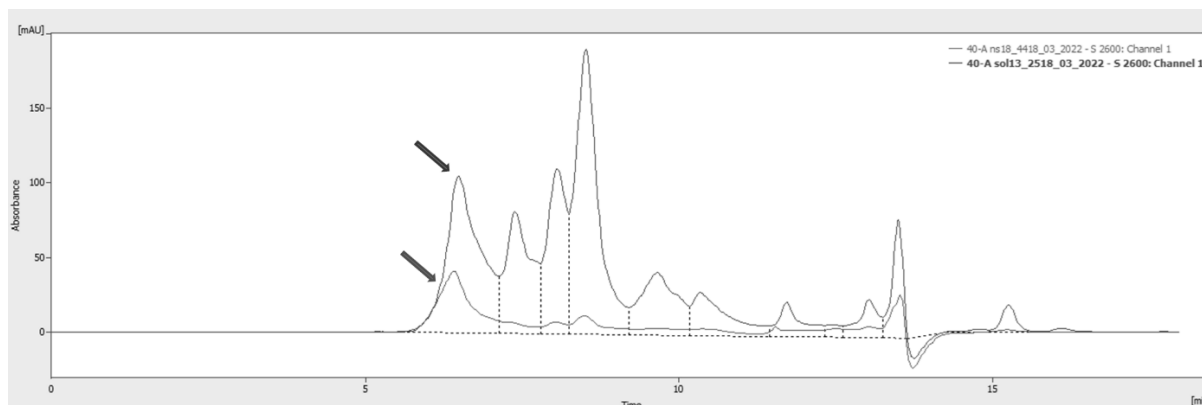
La composizione delle proteine di riserva del frumento è interessante sia perché correlata con la qualità tecnologica degli sfarinati sia perché utilizzabile per la valutazione della variabilità genetica e a scopi di tracciabilità (Visioli *et al.*, 2021). Queste sono composte da gliadine e glutenine e la loro variabilità può essere studiata tramite tecniche di elettroforesi su gel di poliacrilammide.

L’obiettivo del seguente lavoro è stato quello di valutare la variabilità genetica e di determinare la qualità tecnologica di diverse accessioni di 22 varietà da conservazione siciliane di frumenti tetraploidi.

## **Materiali e metodi**

Sono state analizzate 21 varietà autoctone siciliane di frumento duro (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) e una di frumento turanico (*Triticum turgidum* L. subsp. *turanicum*) ottenute da diversi agricoltori custodi per un totale di 55 accessioni; 4 cultivar di frumento duro sono state usate come riferimento (Senatore Cappelli, Core, Iride, Saragolla). Tutti i materiali sono stati coltivati nell’annata 2019 a Palermo (PA) e nell’annata 2020 a Vicari (PA) sotto regime convenzionale. Per ogni accessione, definita secondo le Linee Guida per la Conservazione e la Caratterizzazione della Biodiversità Vegetale di Interesse per l’Agricoltura (*G.U. n. 171 del 24 luglio 2012*), sono state analizzate separatamente 10 spighe e un bulk.

Per verificare la presenza o meno di eterogeneità, sia intra-accessione che intra-varietà, sono stati analizzati i pattern elettroforetici delle proteine di riserva del frumento. Le gliadine e le glutenine sono state estratte sequenzialmente come riportato da Pfluger *et al.* (2001), dopodiché la loro composizione è stata studiata rispettivamente tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni acide (A-PAGE) e in presenza di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE). Per valutare la qualità tecnologica degli sfarinati delle varietà autoctone e per confrontarla con le varietà moderne è stata effettuata la quantificazione della percentuale di proteine polimeriche non estraibili (%UPP) tramite cromatografia ad esclusione molecolare (SE-HPLC) come descritto da Gagliardi *et al.* (2020) (Fig. 1).



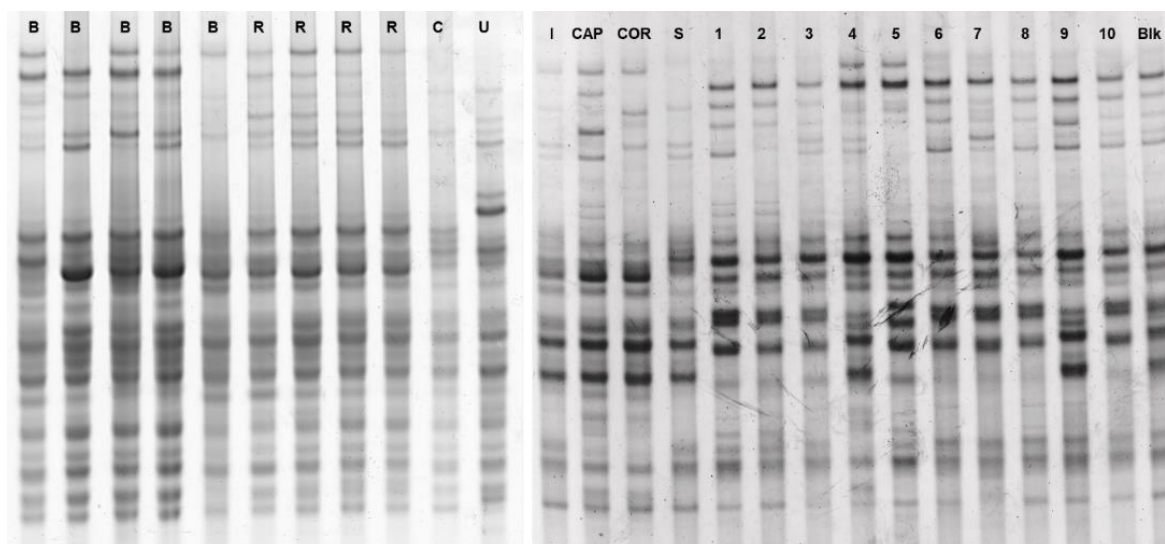
**Figura 1:** Esempio di cromatogramma ottenuto dall'analisi SE-HPLC della frazione proteica solubile in soluzione contenente SDS (sodio dodecil solfato) (linea superiore) e della frazione proteica insolubile (linea inferiore) misurando l'assorbanza a 214nm. La %UPP si calcola come area del primo picco (freccie) della frazione insolubile diviso la somma dell'area del primo picco della frazione sia solubile che insolubile.

Per l'analisi cromatografica è stato usato un sistema HPLC Knauer AZURA equipaggiato con due pompe Smartline 1000, un autocampionatore HT300L ed un UV detector Smartline 2600. Le analisi della %UPP sono state condotte in triplicato e tutte le elaborazioni statistiche sono state effettuate utilizzando il linguaggio di programmazione R (R Core Team, 2022).

## Risultati e discussione

### *Analisi delle gliadine e delle glutenine (proteine del glutine)*

I risultati dei profili elettroforetici di gliadine e glutenine delle singole spighe hanno mostrato la presenza di variabilità sia intra-accensione sia tra le accessioni della stessa varietà. In generale le gliadine hanno mostrato pattern elettroforetici più variabili rispetto alle glutenine, rendendo le prime più adatte per la valutazione della variabilità (Fig. 2).



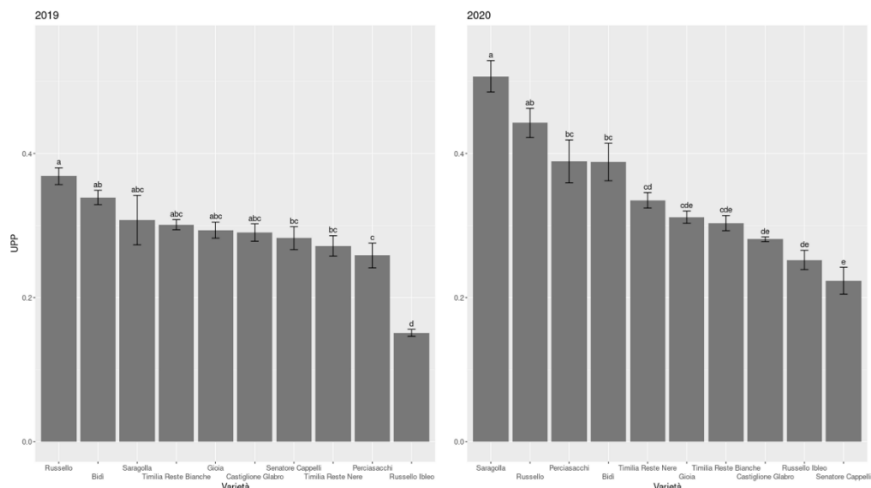
**Figura 2.** A sinistra, A-PAGE delle gliadine dei *bulk* delle accessioni di Bidì (B), Russello Ibleo (R), Capeiti 8 (C) e Urria (U). A destra A-PAGE delle gliadine di 10 differenti spighe e del *bulk* di un'accessione di Russello e dei controlli (S = Saragolla, COR = Core, CAP = Senatore Cappelli, I = Iride).

Nonostante la presenza di variabilità tra le accessioni fornite da diversi agricoltori custodi, le analisi dei *bulk* hanno evidenziato la presenza di uniformità intra-varietale (Fig. 1), e ciò rende l'analisi elettroforetica delle proteine del glutine una tecnica utile per il riconoscimento varietale.

Le uniche accessioni che sono risultate omogenee dall'analisi elettroforetica SDS-PAGE e A-PAGE sono Bivona e Ciciredda.

**Analisi della percentuale di proteine polimeriche non estraibili (%UPP)**

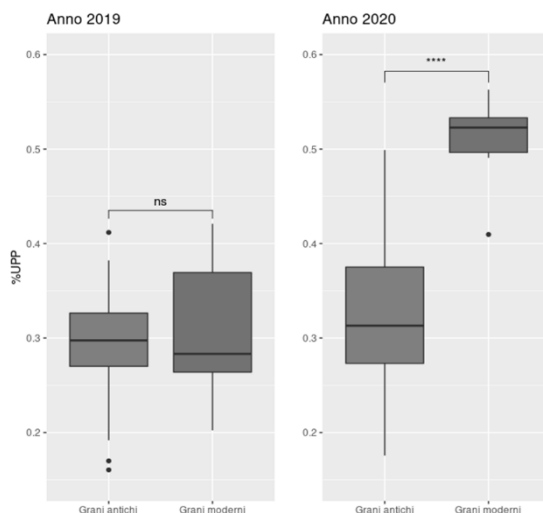
L'analisi della %UPP tramite SE-HPLC ha mostrato variabilità tra le accessioni di grani antichi analizzate (Fig. 3).



**Figura 3.** Grafico a barre della %UPP delle diverse varietà analizzate nelle annate 2019 e 2020. La barra di errore rappresenta 2 volte l'errore standard, i campioni senza lettere in comune mostrano differenze significative (ANOVA con test HSD di Tukey, p-value < 0,05).

Tendenzialmente i grani moderni hanno mostrato una %UPP maggiore, e ciò era prevedibile poiché i programmi di miglioramento genetico hanno permesso di selezionare genotipi con migliori combinazioni di proteine del glutine.

È interessante notare però che nell'anno 2019 nei grani antichi tetraploidi il valore %UPP è comparabile al contenuto di Saragolla, frumento duro moderno usato come riferimento (Fig. 4).



**Figura 4.** Boxplot della %UPP di grani antichi e grani moderni nelle annate 2019 e 2020. Le medie sono state confrontate tramite t-test di Student ( $\alpha=0,05$ ; ns = non significativo, \*\*\*\* = p-value < 0,0001).

Ciò potrebbe essere dovuto a condizioni di coltivazione meno favorevoli che si sono presentate nel 2019 e che evidenzerebbe una maggiore resilienza da parte delle varietà antiche. Inoltre, per la varietà Russello è stato ottenuto anche nell'annata 2020 un contenuto di %UPP comparabile

con quello di Saragolla, indicando il potenziale di questa varietà autoctona per la produzione di prodotti trasformati.

### **Ringraziamenti**

Questa ricerca è finanziata dal Progetto della Regione Siciliana e del MIPAAF “CA.VA.SI.F.D. (Caratterizzazione di varietà autoctone siciliane di frumento duro)” al CREA – Difesa e Certificazione (Palermo) e al Consorzio di Ricerca Gian Pietro Ballatore (Palermo) e, in parte, dal progetto PSR Sicilia 2014-2020 CIRCE (Certificazione attraverso Interventi di innovazione e Ricerca nella filiera locale dei Cereali da conservazione - Grani Antichi) al Consorzio di Ricerca Gian Pietro Ballatore (Palermo) e all’Università della Tuscia.

### **Bibliografia**

Gagliardi A., Carucci F., Masci S., Flagella Z., Gatta G., Giuliani M. M. 2020. Effects of genotype, growing season and nitrogen level on gluten protein assembly of durum wheat grown under Mediterranean conditions. *Agronomy*, 10(5): 755. <https://doi.org/10.3390/agronomy10050755>.

Pflüger L. A., D’Ovidio R., Margiotta B., Peña R., Mujeeb-Kazi A., Lafiandra D. 2001. Characterisation of high- and low-molecular weight glutenin subunits associated to the D genome of *Aegilops tauschii* in a collection of synthetic hexaploid wheats. *Theoretical and Applied Genetics*, 103(8): 1293-1301.

R Core Team. 2021. R: A Language and Environment for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>

Ruisi P., Frangipane B., Amato G., Frenda A. S. Plaia, A., Giambalvo D., Saia S. 2015. Nitrogen uptake and nitrogen fertilizer recovery in old and modern wheat genotypes grown in the presence or absence of interspecific competition. *Frontiers in Plant Science*, 6(MAR).

Taranto F., D’Agostino N., Rodriguez M., Pavan S., Minervini A. P., Pecchioni N., Papa R., De Vita P. 2020. Whole Genome Scan Reveals Molecular Signatures of Divergence and Selection Related to Important Traits in Durum Wheat Germplasm. *Frontiers in Genetics*, 11.

Visioli G., Giannelli G., Agrimonti C., Spina A., Pasini G. 2021. Traceability of Sicilian durum wheat landraces and historical varieties by high molecular weight glutenins footprint. *Agronomy*, 11(1): 143.



## **Recupero e valorizzazione di antichi frumenti caucasici: *Triticum zhukovskyi* e *Triticum timopheevii***

F. Nocente<sup>1\*</sup>, E. Galassi<sup>1</sup>, F. Taddei<sup>1</sup>, C. Natale<sup>1</sup>, R. Ciccoritti<sup>2</sup>, L. Sereni<sup>1</sup>, P. Cacciatori<sup>1</sup>, L. Gazza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari (CREA-IT), Via Manziana 30, 00189 Roma (RM).

<sup>2</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura (CREA-OFA), Via di Fioranello 52, 00134 Roma (RM).

\*E-mail: [francesca.nocente@crea.gov.it](mailto:francesca.nocente@crea.gov.it)

### **Abstract**

Ancient Caucasian wheats *Triticum timopheevii* (A<sup>u</sup>G) and *Triticum zhukovskyi* (A<sup>m</sup>A<sup>u</sup>G) represent important genetic resources to increase biodiversity and to face the effects of climatic change on crops production by “low-input” agriculture. Within the RGV-FAO Project, focused on the maintenance and conservation of plant genetic resources, one genotype of *Triticum zhukovskyi* (Far 75) and one of *Triticum timopheevii* (Far 72) were recovered and grown for three years in Central Italy. The two genotypes were analyzed for agronomical and nutritional traits, in order to evaluate their qualitative characteristics and to encourage their cultivation in marginal areas, in which they adapted well. Interestingly, the two Caucasian wheats showed a high protein content, with a mean value of 18% in *T. zhukovskyi* and of 19% in *T. timopheevii*, and a total antioxidant activity ranging from 80 to 90 mmolTEAC/kg. No differences respect to durum wheat were observed in the total polyphenol (TPC) and in the alkylresorcinol (AR) contents. Both species had good yield (about 3 t/ha) and resulted to be resistant to the most important fungal wheat diseases as rusts, powdery mildew and Septoria complex, confirming their species immunity.

### **Riassunto**

I frumenti antichi caucasici *Triticum timopheevii* (A<sup>u</sup>G) e *Triticum zhukovskyi* (A<sup>m</sup>A<sup>u</sup>G), rappresentano un'importante risorsa genetica per aumentare la biodiversità e rispondere, attraverso un'agricoltura “low-input”, ai rischi che i cambiamenti climatici hanno sulla produzione agricola, e quindi sulla disponibilità di cibo. Nell'ambito del progetto RGV-FAO, volto alla salvaguardia e conservazione delle risorse genetiche vegetali, sono stati recuperati e messi in coltivazione un genotipo di *Triticum zhukovskyi* (Far 75) e uno di *Triticum timopheevii* (Far 72). I due genotipi sono stati analizzati, per un triennio, per alcuni caratteri agronomici e nutrizionali al fine di valutarne le potenzialità e promuoverne la coltivazione anche in ambienti marginali, ai quali ben si adattano. I due frumenti caucasici sono risultati interessanti per l'elevato contenuto proteico, pari in media al 18% in *T. zhukovskyi* e al 18,5% in *T. timopheevii*, e per la capacità antiossidante (TAC), con valori compresi tra gli 80 e i 90 mmolTEAC/kg. Sia il contenuto di polifenoli totali (TPC) che di alchilresorcinoli (AR) è risultato invece simile al frumento duro. Entrambe le specie hanno mostrato buoni valori di resa (circa 3 t/ha) e un ottimo comportamento in campo verso le principali malattie fungine quali ruggini, oidio e complesso della septoriosi, confermando la loro già nota immunità di specie.

### **Introduzione**

Attualmente, una delle maggiori sfide dell'agricoltura è quella di limitare gli effetti negativi dei cambiamenti climatici sulle produzioni delle piante agrarie. Nel caso del frumento, la domesticazione ed il successivo miglioramento genetico hanno portato ad una drastica erosione del patrimonio genetico, indispensabile per poter sviluppare nuove varietà adatte a rispondere alle necessità di un'agricoltura sostenibile, resiliente e capace di garantire la sicurezza alimentare. In

questo scenario, i frumenti antichi *Triticum timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. subsp. *timopheevii* (A<sup>u</sup>G) e *Triticum zhukovskyi* Menabde et Erizian (A<sup>m</sup>A<sup>u</sup>G), coltivati da secoli nelle regioni del Trans Caucaso, tra i principali centri di diversità e domesticazione del frumento, rappresentano un'importante risorsa genetica per affrontare alcune delle sfide proposte dal “New Green Deal” europeo riguardo il cambiamento climatico, la conservazione della biodiversità e la produzione di alimenti sostenibili lungo l'intera filiera. La specie *T. zhukovskyi* ha avuto origine dall'ibridazione tra *T. monococcum* e *T. timopheevii*, quest'ultimo anche progenitore del farro dicocco e del frumento tenero. Le caratteristiche distintive che rendono questi frumenti particolarmente adatti ad una coltivazione “low input” sono l'elevata “rusticità”, la capacità di crescere anche in ambienti marginali, la resistenza alla salinità e all'eccessiva umidità. Inoltre, queste due specie hanno mostrato un'innata immunità di specie verso le principali malattie fungine del frumento come le ruggini, l'oidio e la fusariosi della spiga (Jorjadze *et al.*, 2014; Brown-Guedira *et al.*, 1996). Dal punto di vista nutrizionale sono caratterizzati da un contenuto proteico elevato (14-20% s.s.), anche in assenza di concimazione. Poiché la coltivazione di questi frumenti antichi è stata quasi del tutto abbandonata, tranne in alcune aree marginali dell'Europa mediterranea, balcanica e del Caucaso, nel 2019 il Ministero dell'Ambiente e Agricoltura della Georgia ha fatto richiesta di un loro inserimento nel patrimonio intangibile dell'UNESCO come “eredità culturale urgentemente bisognosa di salvaguardia”. Considerate le potenzialità di queste specie antiche, nell'ambito del “Programma RGV FAO per la conservazione, caratterizzazione, uso e valorizzazione delle risorse genetiche vegetali per l'alimentazione e l'agricoltura” i due frumenti caucasici sono stati coltivati in Italia per un triennio e analizzati per alcuni caratteri agronomici e nutrizionali, con l'obiettivo di promuoverne un loro ritorno in coltivazione anche in ambienti marginali, ai quali ben si adattano.

### **Materiale e metodi**

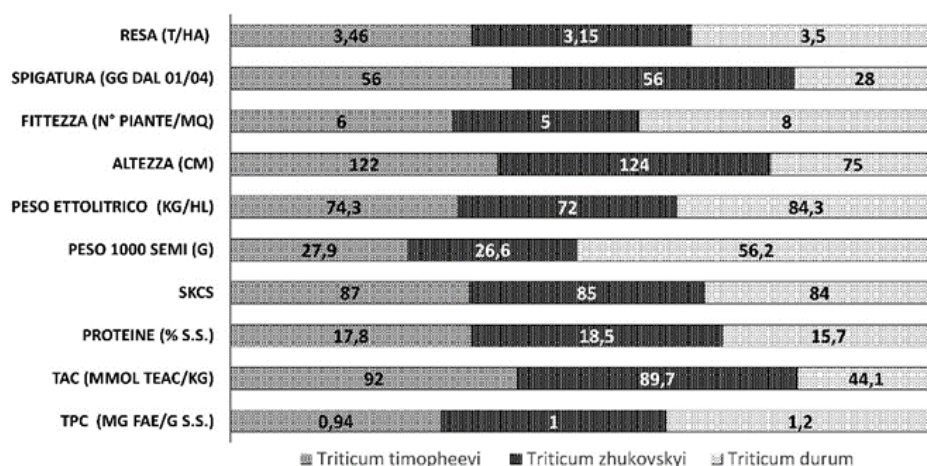
*T. timopheevii* (accessione Far 72) e *T. zhukovskyi* (accessione Far 75) sono stati coltivati per un triennio (2018-2020), in parcelle di 10 mq a blocchi randomizzati con tre repliche, presso i campi sperimentali del CREA-Centro di Ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari, situati a Montelibretti (RM). Prima della trebbiatura, sulle parcelle è stata determinata la fittezza, mentre su 10 piante di ciascuna accessione è stata misurata l'altezza. Dopo la trebbiatura i frumenti caucasici sono stati svestiti e le tre repliche sono state riunite per effettuare le successive analisi. Il peso 1000 semi e il peso ettolitrico sono stati determinati seguendo rispettivamente i metodi ISO 520:2010 e ISO 7971-1:2009. La durezza della cariosside è stata determinata con lo strumento Perten SKCS 4100 (Perten, Springfield, IL, USA), impostato in un range di durezza (HI) tra -40 e +120. Le determinazioni del contenuto proteico, dell'attività antiossidante totale (TAC) e del contenuto in polifenoli solubili (TPC), sono state condotte in triplicato sugli sfarinati integrali. Il contenuto proteico è stato determinato con il metodo Kjeldhal in accordo col metodo ICC 105/2 usando il fattore di conversione  $N \times 5.7$ . La TAC è stata determinata seguendo il metodo riportato in Ciccoritti *et al.* (2017), mentre il contenuto in polifenoli solubili (TPC) è stato determinato come riportato da Menga *et al.* (2017). La composizione in omologhi degli AR è stata determinata seguendo il metodo riportato in Ciccoritti *et al.* (2015).

### **Risultati e discussione**

I frumenti caucasici *T. timopheevii* e *T. zhukovskyi* hanno mostrato rese di circa 3t/ha, paragonabili a quelle del frumento duro utilizzato come controllo. I rilievi effettuati in campo hanno evidenziato nei frumenti caucasici un'epoca di spigatura più tardiva (+28 giorni) e una fittezza inferiore rispetto al frumento duro (Fig.1). Inoltre, i rilievi fitopatologici condotti sulle parcelle hanno evidenziato una completa assenza di sintomi di malattie quali ruggini, oidio, septoriosi e fusariosi della spiga. Il peso 1000 semi ed il peso ettolitrico sono tra i principali parametri per valutare la qualità della granella e la resa in farina. I due frumenti caucasici hanno mostrato valori di peso

1000 semi molto simili (Fig. 1), risultati circa la metà di quelli osservati nel frumento duro, ma comparabili a quelli determinati in altri frumenti antichi vestiti come il monococco, il farro dicocco e spelta (Belcar *et al.*, 2020). Anche per il peso ettolitrico, non sono state osservate differenze significative tra *T. timopheevii* e *T. zhukovskyi*, i quali hanno mostrato mediamente, nei tre anni di prova, valori di 72 kg/hL (Fig. 1), inferiori a quelli rilevati in frumento duro, a causa delle dimensioni ridotte dei semi dei frumenti caucasici.

La tessitura della cariosside del frumento è un carattere che influisce indirettamente su una serie di parametri qualitativi come la resa in farina, le proprietà degli impasti, il volume del pane e la struttura della crosta. In entrambi i frumenti caucasici sono stati riscontrati valori di SKCS > 80 (Fig. 1), come quelli riscontrati normalmente nei frumenti tetraploidi caratterizzati da una tessitura extra-hard. Nel frumento, il contenuto proteico è un parametro importante non solo dal punto di vista nutrizionale ma anche tecnologico. La determinazione del contenuto proteico, effettuata sui due frumenti caucasici, ha confermato la superiorità di questi frumenti vestiti rispetto al frumento duro. Infatti, in *T. timopheevii* e in *T. zhukovskyi* è stato rilevato un contenuto proteico medio rispettivamente pari a 17,8% e 18,5%, mentre nel frumento duro il valore medio è risultato pari a 15,7% (Fig.1). Questi risultati evidenziano come queste due specie antiche di frumento siano più efficienti nell'utilizzo di azoto, caratteristica già osservata in altre specie di frumenti vestiti, indicandole come particolarmente adatte ad una coltivazione "low input" (Rachon *et al.*, 2020).

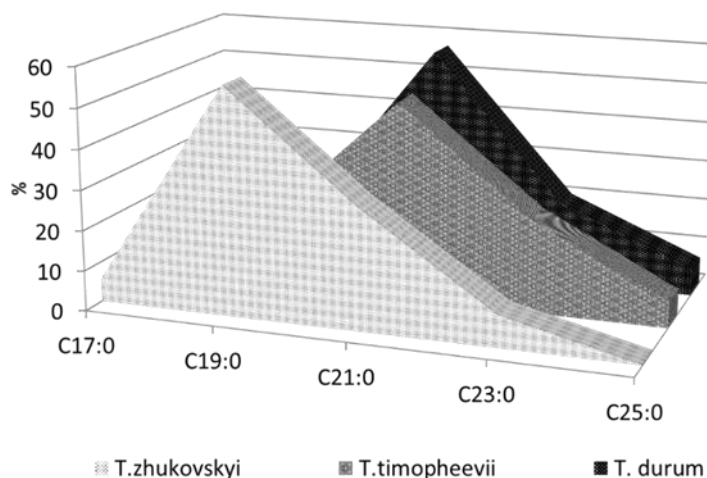


**Figura 1.** Caratterizzazione dei frumenti antichi caucasici *T. zhukovskyi* e *T. timopheevii* messi a confronto con il frumento duro (*T. durum*)

La caratterizzazione nutrizionale di queste due specie ha inoltre evidenziato elevati livelli di capacità antiossidante totale (TAC). I valori di TAC sono risultati, infatti, significativamente superiori in *T. zhukovskyi* (+103%) e in *T. timopheevii* (+108%) rispetto al frumento duro di controllo (Fig. 1). L'elevata attività antiossidante osservata nei frumenti caucasici non può essere dovuta ad una maggiore presenza di polifenoli, il cui contenuto normalmente influisce su questo parametro, in quanto il loro contenuto nei frumenti caucasici è risultato paragonabile al frumento duro (Fig. 1). Anche altri studi effettuati su alcuni frumenti antichi tetraploidi hanno evidenziato un minore contenuto di TPC rispetto ai frumenti moderni, indicando che queste specie antiche non possono essere usate nel breeding per aumentare il contenuto in polifenoli nelle varietà moderne. Pertanto, i livelli elevati di TAC in *T. timopheevii* e in *T. zhukovskyi* potrebbero essere dovuti alla presenza di altri composti antiossidanti, come ad esempio i carotenoidi.

Inoltre, sui due frumenti caucasici e sul frumento duro è stata condotta un'analisi GC-MS per determinare il contenuto di alchilresorcinoli (AR) e la loro composizione in catene omologhe. Gli AR sono lipidi fenolici presenti principalmente nelle piante, funghi e batteri. Recentemente, questi composti sono diventati di interesse nutrizionale viste le loro proprietà antiossidanti,

antimutagene, anticancerogene, antifungine e antibatteriche e per la loro capacità di interagire con le membrane biologiche, grazie alla loro natura anfifilica (Stasiuk e Kozubek, 2010). L'analisi GC-MS non ha evidenziato differenze significative nel contenuto di AR tra *T. timopheevii* e *T. zhukovskyi* (213 e 224 µg/g s.s., rispettivamente), mentre nel frumento duro i valori sono risultati leggermente superiori (250 µg/g s.s.). Il risultato interessante emerso da questa analisi ha riguardato la composizione in catene omologhe dei frumenti caucasici (Fig.2). Infatti, mentre in *T. timopheevii* la composizione degli AR è risultata come quella del frumento duro, ovvero con una prevalenza dell'omologo C21:0, in *T. zhukovskyi* si è osservata una composizione caratteristica degli AR, con una mancanza dell'omologo C25:0 e una prevalenza dell'omologo C19:0. Alla luce di questi risultati, si può ipotizzare un possibile utilizzo degli AR come marcatori per il riconoscimento di queste due specie.



**Figura 2.** Composizione % in catene omologhe degli AR in *T. zhukovskyi*, *T. timopheevii* e nel frumento duro (*T. durum*)

In conclusione, la caratterizzazione dei due frumenti antichi caucasici *T. timopheevii* e *T. zhukovskyi* ne ha evidenziato le potenzialità sia in termini agronomici che nutrizionali, incoraggiando ulteriori studi su queste specie, sia per un loro ritorno in coltivazione per la produzione di nuovi alimenti, ma anche come donatori di caratteri interessanti per il breeding.

## Bibliografia

- Belcar J., Sobczyk A., Sobolewska M., Stankowski S., Gorzelany J. 2020. Characteristics of Technological Properties of Grain and Flour from Ancient Varieties of Wheat (Einkorn, Emmer and Spelt). *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology*, 24: 269-278.
- Brown-Guedira G.L., Gill B.S., Bockus W.W., Cox T.S., Hatchett J.H., Leath S., Peterson C.J., Thomas J.B., Zwer P.K. 1996. Evaluation of a collection of wild Timopheevii wheat for resistance to disease and arthropod pests. *Plant Disease*, 80: 928-933.
- Ciccoritti R., Pasquini M., Sgrulletta D., Nocente F. 2015. Effect of 5-n-alkylresorcinol extracts from durum wheat whole grain on the growth of Fusarium head blight (FHB) causal agents. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(1): 43-50.
- Ciccoritti R., Taddei F., Nicoletti I., Gazza L., Corradini D., D'Egidio M.G., Martini D. 2017. Use of bran fractions and debranned kernels for the development of pasta with high nutritional and healthy potential. *Food Chemistry*, 225: 77-86.

- International Association for Cereal Science and Technology. ICC Standard Methods (Methods No. 105/2); ICC: Vienna, Austria, 2003.
- International Organization for Standardization (ISO 2010). Cereals and Pulses-Determination of the Mass of 1000 Grains; Method 520:2010; ISO: Geneva, Switzerland, 2010; p. 10.
- International Organization for Standardization (ISO 2009). Determination of Bulk Density, Called Mass per Hectolitre-Part 1: Reference Method; Method 7971-1:2009; ISO: Geneva, Switzerland, 2009; p. 8.
- Jorjadze M., Berishvili T., Shatberashvili E. 2014. The ancient wheats of Georgia and their traditional use in the southern part of the country. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26: 192-202.
- Landberg R., Andersson A.A., Åman P., Kamal-Eldin A. 2009. Comparison of GC and colorimetry for the determination of alkylresorcinol homologues in cereal grains and products. *Food Chemistry*, 113(4): 1363-1369.
- Menga V., Amato M., Phillips T.D., Angelino D., Morreale F., Fares C. 2017. Gluten-free pasta incorporating chia (*Salvia hispanica* L.) as thickening agent: An approach to naturally improve the nutritional profile and the in vitro carbohydrate digestibility. *Food Chemistry*, 221: 1954-1961.
- Rachon L., Bobryk-Mamczarz A., Kiełtyka-Dadasiewicz A. 2020. Hulled Wheat Productivity and Quality in Modern Agriculture Against Conventional Wheat Species. *Agriculture*, 10, 275.
- Stasiuk M., Kozubek A. 2010. Biological activity of phenolic lipids. *Cellular and Molecular Life Science*, 67: 841-860.

## **Banca del Germoplasma di mais del CREA: arricchimento e innovazione tramite cooperazione Italia-Bolivia e Network europeo EVA**

*C. Balconi, A. Torri, G. De Luise, P. Valoti, R. Redaelli*

Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali (CREA-CI), Via Stezzano 24, 24126 Bergamo (BG).

\*E-mail: [carlotta.balconi@crea.gov.it](mailto:carlotta.balconi@crea.gov.it)

### **Abstract**

The Italian maize germplasm presents a wide genetic variability. The specific geography of Italy and the heterogeneous pedoclimatic situations have given rise to numerous local varieties with vitreous or semi-vitreous kernels, a high flour yield and an interesting suitability to the food production. The CREA Research Center for Cereal and Industrial Crops in Bergamo is equipped with a Genebank, which contains the largest Italian collection of maize, one of the richest in Europe: over 5,700 accessions stored *ex-situ* in cold rooms at 7° C and periodically regenerated in the field. As part of the three-years program 2020-2022 RGV-FAO (Law n.101, April 6, 2004,) funded by MiPAAF (D.M. 9037962, 03.08.2020), CREA Bergamo activity is mainly focused on the conservation, management, and valorisation of Italian maize genetic resources. With the aim of achieving these objectives, CREA researchers in Bergamo use numerous Italian varieties of the Genbank collection to participate in various projects involving other germplasm banks and international research centres dedicated to safeguard agricultural biodiversity of maize, improving genetic features for nutrition and cope with environmental adversities that can affect the maize cultivation.

**Keywords:** maize, germplasm, valorisation, international cooperation

### **Riassunto**

Il germoplasma di mais italiano è caratterizzato da un'ampia variabilità genetica. La particolare geografia dell'Italia e l'eterogeneità delle situazioni pedoclimatiche hanno dato luogo a numerose varietà locali con granella di tipo vitreo o semi-vitreo, una buona resa alla macinazione e una particolare idoneità alla produzione di farine per l'alimentazione. Il CREA Centro di ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali, Sede di Bergamo, dispone di una Banca del Germoplasma che conserva la collezione di mais più ampia in Italia e tra le più ricche d'Europa: oltre 5.700 accessioni conservate *ex-situ* in celle a 7°C e rigenerate periodicamente in campo. Nell'ambito del Programma triennale 2020-2022 RGV-FAO (Legge 6 aprile 2004, n. 101) finanziato dal MiPAAF (D.M. 9037962 del 03.08.2020), il CREA di Bergamo provvede alla conservazione, gestione e valorizzazione delle risorse genetiche maidicole italiane. Con lo scopo di raggiungere i suddetti obiettivi, i ricercatori del CREA di Bergamo impiegano le numerose varietà italiane della propria collezione per partecipare a diversi progetti che coinvolgono altre banche del germoplasma e centri di ricerca internazionali dediti alla salvaguardia della biodiversità agricola del mais e al miglioramento genetico per l'alimentazione e per fronteggiare le avversità ambientali che possono compromettere la coltivazione del mais.

**Parole chiave:** mais, germoplasma, valorizzazione, cooperazione internazionale

### **Introduzione**

La Banca del Germoplasma del CREA Centro di ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali di Bergamo custodisce migliaia di accessioni di mais, che costituiscono una preziosa base genetica per il breeding. Attraverso il Programma RGV-FAO (triennio 2020-2022, finanziato dal MiPAAF

con D.M. 9037962 del 03.08.2020), il Centro si occupa della conservazione, gestione e valorizzazione della collezione, con lo scopo di tutelare l'agrobiodiversità e caratterizzare accessioni interessanti per l'alimentazione o per la resistenza a stress ambientali.

Nell'ambito del Progetto di cooperazione tra Italia e Bolivia ("P.S.G.O. km 0, Piccoli Semi Grandi Opportunità – agro ecologia campesina familiare e filiere a km 0 in Bolivia", 2018-2021, finanziato da AICS - Agenzia Italiana per la Cooperazione allo Sviluppo), alcune varietà locali italiane sono state incrociate con risorse genetiche di mais "Morado" boliviano e "Azul" messicano al fine di costituire nuove varietà pigmentate di mais, rispettivamente viola e blu, ricche di antociani, composti vegetali bioattivi ad elevata proprietà antiossidante (Suriano *et al.*, 2021). Il CREA di Bergamo partecipa, inoltre, all'iniziativa internazionale EVA – Network Europeo di Valutazione delle Risorse Genetiche di Mais (2020-2023 - [www.ecpgr.cgiar.org/eva-network](http://www.ecpgr.cgiar.org/eva-network)). Il network coinvolge nove nazioni europee, nove banche del germoplasma, nove istituti di ricerca e nove compagnie sementiere e si propone di scambiare, genotipizzare, valutare e moltiplicare circa 500 accessioni europee di mais in 20 siti sperimentali (Balconi *et al.*, 2020).

La raccolta di dati si focalizza principalmente su varietà locali proposte da ciascun partner; i dati raccolti confluiscono nel database europeo EURISCO delle risorse genetiche. L'interscambio di materiali e dati attraverso i diversi stati europei contribuisce all'arricchimento delle risorse genetiche da cui attingere per lo sviluppo di programmi di miglioramento genetico mirati e condotti dalle singole nazioni.

## Materiali e metodi

### *Mais pigmentati*

Il progetto "P.S.G.O. km 0" ha portato alla costituzione di 64 popolazioni derivanti da incroci tra alcune varietà italiane di mais, conservate nella Banca del germoplasma e impiegate come portaseme, con accessioni di origine boliviana (Morado) e messicana (Azul), rispettivamente con una colorazione viola e blu, utilizzate come impollinatori. Nella Tabella 1 sono elencate le varietà parentali.

**Tabella 1.** Varietà utilizzate negli incroci per la costituzione di mais pigmentati

Codice CREA	Nome	Codice CREA	Nome
VA37w	Quarantino bianco	VA571	Sintetico Zanchi
VA44	Tayolone cremonese	VA572	Nostrano Finardi
VA83w	Bianco perla	VA862w	Dinte de cal
VA86	Bianco perla	VA887	Mais coniglio
VA116w	Wisconsin locale	VA1239	Ottofile bianco
VA117w	Perla basso	VA1240	Ottofile rosso
VA181w	Bianco perla	VA1245	Ostenga
VA185w	Rostrato tardivo	VA1269	Rostrato Esine nero
VA353w	Grano turco di Pantano	VA1308	Rostrato rosso di pianura
VA522w	Rosso Piave	B 8	Morado
VA569	Sacra famiglia	MEX 7	Azul

### *Mais Network EVA*

Durante la stagione 2021, nell'ambito Network Europeo di Valutazione delle Risorse Genetiche di Mais (EVA), il CREA di Bergamo ha riprodotto presso l'Azienda "La Salvagna" (45°68'N; 9°64'E) 55 varietà europee di cui 7 italiane, 44 spagnole e 4 romene. I materiali derivati dalle prove di campo sono stati raccolti manualmente allo stadio di maturazione fisiologica, le brattee sono state quindi rimosse e le spighe essiccate fino al raggiungimento del 14% di umidità relativa. Una volta sgranate le spighe, i semi sono stati conservati a 7°C fino all'effettuazione delle analisi.



### Analisi NIRS

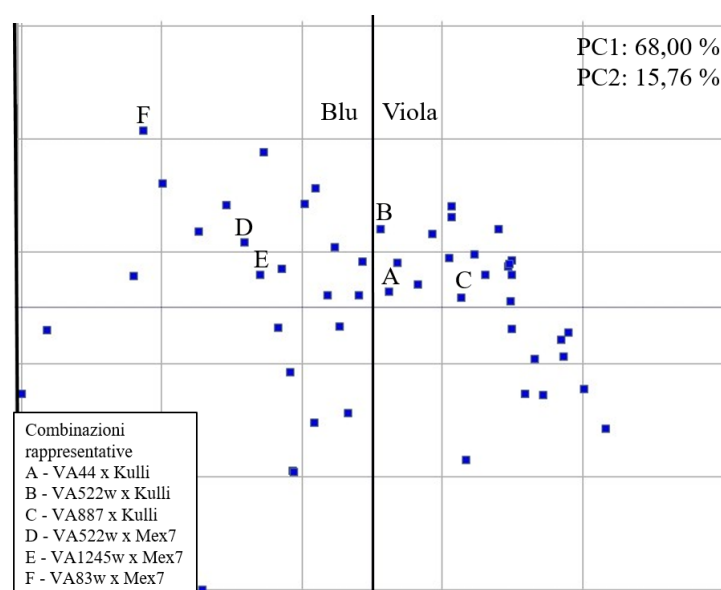
Le cariossidi mature intere delle 64 popolazioni ricavate dal progetto P.S.G.O. km 0 sono state sottoposte ad analisi degli spettri NIR con uno strumento SpectraStar XT-R, dotato di un range di lettura da 680 nm a 2600 nm.

Tra le 55 varietà europee in valutazione nell'ambito del progetto EVA, sono state selezionate 15 accessioni per le analisi chimiche delle farine tramite NIRS. Per ciascuna delle varietà selezionate un'aliquota di seme è stata macinata usando un mulino Retsch ZM200 (vaglio 0,5 mm). Le farine ottenute sono state conservate a 7°C fino al momento dell'analisi.

## Risultati

### Mais pigmentati

In seguito all'analisi degli spettri delle cariossidi appartenenti ai 64 incroci Italia-Bolivia è stata eseguita un'analisi delle componenti principali PCA (Fig. 1).



**Figura 1.** Grafico relativo all'analisi delle componenti principali sui dati degli spettri ottenuti dalle cariossidi intere. Le lettere indicano sei popolazioni rappresentative.

L'analisi ha mostrato un'alta variabilità tra gli spettri, consentendo di discriminare lungo la PC1 due gruppi, in base al colore blu o viola. Il colore viola si osserva negli incroci con l'accessione Morado, mentre il colore blu deriva dal parentale Azul. Questo tipo di indagine pone le basi per future ricerche che possano introdurre in Italia la coltivazione di varietà dotate di elevate concentrazioni di composti antiossidanti, utili per la salute (Suriano *et al.*, 2021). Le accessioni sudamericane non sono facilmente coltivabili in Italia a causa del diverso fotoperiodo e delle differenti condizioni climatiche e ambientali. Tuttavia, un programma di breeding potrebbe garantire la coltivabilità delle generazioni successive.

Nel corso della stagione 2022 i materiali ottenuti dagli incroci sono stati inseriti in una prova di campo per poter raccogliere informazioni utili per continuare la ricerca tramite un'ulteriore selezione

### Mais Network EVA

Le farine delle 15 varietà EVA selezionate per questa ricerca hanno mostrato una certa variabilità nei valori per proteine, lipidi, fibra, ceneri e amido (Tab. 2). In particolare, le varietà ZMV0209 e VA154 hanno mostrato valori alti di contenuto proteico e lipidico. Al contrario, i valori più bassi per proteine e lipidi sono stati registrati rispettivamente per SVGB8022 e VGB7774, quest'ultima



ha inoltre mostrato un basso contenuto di amido. Il contenuto di fibra era più alto per ZMV0168 e più basso per SVGB8022. I valori di ceneri erano alti per VA154 e bassi per VA336. Il contenuto di amido era maggiore per VA71 e ZMV0254.

Quest'analisi preliminare consente di valutare le possibili combinazioni tra le diverse varietà sotto studio che potrebbero essere interessanti da un punto di vista nutrizionale, partendo dalla biodiversità europea custodita dal network EVA.

**Tabella 2.** Dati ottenuti dalla spettroscopia nel vicino infrarosso eseguita sulle farine ricavate dalle 15 varietà europee selezionate.

Origine	Codice varietà	Composizione chimica farina (s.s. %)				
		Proteine	Lipidi	Fibra	Ceneri	Amido
Italia	VA55	13,53	4,86	3,04	1,20	70,44
	VA71	12,03	5,12	2,97	1,16	71,94
	VA143	13,96	4,63	2,94	1,14	69,02
	VA154	14,26	5,72	2,86	1,56	69,74
	VA336	12,38	4,44	2,94	1,05	69,28
	VA373	13,22	4,77	2,87	1,31	67,37
	VA477	11,79	5,25	3,06	1,41	69,78
Spagna	ZMV0309	13,34	4,67	2,93	1,15	70,96
	ZMV0168	13,83	5,38	3,18	1,60	66,95
	ZMV0209	14,34	4,67	3,16	1,43	66,28
	ZMV0254	12,97	4,94	2,98	1,06	71,10
Romania	SVGB7774	13,84	4,01	2,81	0,88	65,33
	SVGB8012	13,42	5,64	2,81	1,65	66,31
	SVGB8013	12,70	4,14	2,76	1,16	68,74
	SVGB8022	11,33	5,31	2,69	1,30	70,82
	<b>Media</b>	<b>13,13</b>	<b>4,90</b>	<b>2,93</b>	<b>1,27</b>	<b>68,94</b>
	<b>Dev. St.</b>	<b>0,92</b>	<b>0,50</b>	<b>0,14</b>	<b>0,22</b>	<b>2,00</b>

### Ringraziamenti

Ricerca finanziata dal Programma triennale 2020-2022 FAO (Legge 6 aprile 2004, n. 101) finanziato dal MiPAAF (D.M. 9037962 del 03.08.2020).

Le attività relative alla selezione di mais pigmentati si sono svolte nell'ambito del Progetto "P.G.S.O. Km 0 Bolivia" finanziato da AICS Agenzia Italiana per la Cooperazione allo Sviluppo (2018-2021) Delibera 103 AD 011.457.

Scambio dei materiali europei avvenuto nell'ambito di EVA – Network Europeo di Valutazione delle Risorse Genetiche di Mais (2020-2023) - [www.ecpgr.cgiar.org/eva-network](http://www.ecpgr.cgiar.org/eva-network).

### Bibliografia e sitografia

Balconi C., Valoti P., Pecchioni N. 2019. La biodiversità del mais: una grande opportunità di cooperazione internazionale tra Italia e Bolivia. *Mangimi & Alimenti*, XI (3): 14-16.

Balconi C., Redaelli R., Valoti P., Pecchioni N. 2020. Il progetto EVA - European Evaluation Network: un'opportunità strategica per valorizzare le risorse genetiche del mais italiano. *Mangimi & Alimenti*, XII (3): 26-28.

EVA (European Evaluation Network): <https://www.ecpgr.cgiar.org/european-evaluation-network-eva>

EURISCO (European Search Catalogue for Plant Genetic Resources): [https://eurisco.ipk-gatersleben.de/apex/eurisco\\_ws/r/eurisco/home](https://eurisco.ipk-gatersleben.de/apex/eurisco_ws/r/eurisco/home)

Suriano, S., Balconi, C., Valoti, P., Redaelli, R. 2021. Comparison of total polyphenols, profile anthocyanins, color analysis, carotenoids and tocopherols in pigmented maize. *LWT Food Sci. and Technol.*, 144, 111257

UPOV (The International Union for the Protection of New Varieties of Plants): <https://www.upov.int/portal/index.html.en>

## **Micronutrienti chiave in popolazioni locali di grani siciliani**

S. Ruggeri<sup>1\*</sup>, P. Buonocore<sup>1</sup>, P. Gabrielli<sup>1</sup>, M. Canale<sup>2</sup>, S. Blangiforti<sup>3</sup>, A. Spina<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Alimenti e Nutrizione (CREA-AN), Via Ardeatina 546, 00178 Roma (RM).

<sup>2</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali (CREA-CI), Corso Savoia 190, 95021 Acireale (CT).

<sup>3</sup>Stazione Consorziale Sperimentale di Granicoltura per la Sicilia Via Sirio 1, 95041 Santo Pietro Fraz. di Caltagirone (CT).

\*E-mail: [stefania.ruggeri@crea.gov.it](mailto:stefania.ruggeri@crea.gov.it)

### **Abstract**

Today there is a great interest in local grain cultivars both for their nutritional and commercial potentiality and to protect biodiversity and the peculiar beauty of Italian landscapes. Sicily is a particularly interesting region due to their numerous durum wheat and soft wheat indigenous variety. In the framework of a research line that has as the purpose of mapping Sicilian local grain cultivars, ten autochthonous genotypes of durum and soft wheat, a "vintage" tester of durum wheat (Cappelli) and two modern testers, Anapo (soft wheat) and Simeto (durum wheat) were analyzed for their minerals and folate content.

The results showed a significant variability in mineral content between ecotypes. Castiglione Glabro ecotype showed the highest content of calcium, magnesium and potassium as well of folate, respect to all analyzed durum and soft wheat samples.

### **Riassunto**

I grani locali sono oggi di grande interesse non solo per le loro potenzialità nutrizionali e commerciali ma per garantire e tutela della biodiversità e dei paesaggi del nostro Paese. Nell'ambito cerealicolo la Sicilia è una regione particolarmente interessante per la numerosità delle varietà di frumento duro e frumento tenero.

Nell'ambito di una linea di ricerca che ha come scopo la "mappatura" delle varietà autoctone siciliane è stato condotto uno studio su dieci ecotipi autoctoni di frumento duro e tenero, su un tester "vintage" di grano duro (Cappelli) e due tester moderni, Anapo (grano tenero) e Simeto (grano duro).

I risultati hanno mostrato una variabilità significativa nel contenuto in sali minerali tra gli ecotipi analizzati, con elevati contenuti di calcio e altri minerali come magnesio e potassio nella varietà Castiglione Glabro, che presenta anche i livelli di folati più elevati.

**Parole chiave:** grani autoctoni siciliani, biodiversità, sali minerali, folati.

### **Introduzione**

I grani locali sono oggi di grande interesse in relazione alla tutela e al mantenimento della biodiversità, come richiesto dal "Green Deal" europeo e rappresentano una risorsa importante per alcune peculiari proprietà nutrizionali, per la produzione di prodotti locali e per la valorizzazione dei territori.

La Sicilia è la regione d'Italia con la più ampia variabilità genetica di grani: è un territorio molto ricco di genotipi di frumenti locali, alcuni già abbastanza diffusi in coltura e quindi molto conosciuti, altri ancora poco diffusi, altri ancora non coltivati e sconosciuti al grande pubblico e da valutare per le loro caratteristiche agronomiche e nutrizionali. Le particolari condizioni climatiche di questa regione, come scarsa piovosità e le elevate temperature primaverili, riducono fortemente la possibilità di attacchi fungini, facendo registrare nella quasi totalità dei campioni di grani siciliani assenza o contaminazioni irrilevanti da micotossine (Russo, 2018) e possono potenziare i livelli dei composti bioattivi.

L'interesse di questa ricerca è stato quello di valutare il contenuto in micronutrienti di elevato interesse nutrizionale come folati, ferro, calcio e zinco in popolazioni siciliane di grani autoctoni siciliani, alcune diffuse ma ancora poco oggetto di studio.

### Materiali e metodi

Lo studio è stato condotto su tredici genotipi di frumento duro e tenero: dieci varietà autoctone, un tester “vintage” (Cappelli) e due tester moderni (Simeto e Anapo) (Tab. 1).

Le varietà provengono da una prova di campo allestita a Santo Pietro, frazione di Caltagirone (CT), nel 2020/21 presso l'azienda sperimentale della Stazione Consorziale Sperimentale di Granicoltura per la Sicilia (37°05'58"N., 14°29'56"E., 280 m s.l.m.), coltivate nella stessa annata e con le stesse tecniche agronomiche. I campioni, prima delle analisi, sono stati macinati con un molinetto Cyclotec type 120 (Falling Number, Huddinge, Sweden) (setaccio = 0,95 mm).

Il contenuto in folati totali è stato determinato con il metodo ufficiale microbiologico (DeVries *et al.*, 2005), utilizzando come microrganismo il *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* (ATCC 7469), previa estrazione secondo Pfeiffer *et al.*, 1997 e Ruggeri *et al.*, 2004. Il campione certificato CRM 121 “Wholemeal flour” (Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgium- content = 51.3 ± 7.1 µg/100 g è stato analizzato con ogni set di campioni.

Il contenuto dei minerali (Mg, Ca, Fe, Zn, Cu, K) è stato determinato mediante spettrofotometria ad assorbimento atomico ICP-OES (Optima TM 8000, Perkin Elmer), previa mineralizzazione dei campioni mediante idrolisi acida (6 mL di HNO<sub>3</sub> al 69% + 1 mL di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%) in forno a microonde (ETHOS One, Milestone). Per la valutazione dell'accuratezza dell'analisi è stato utilizzato il campione certificato NBS 1568 “Rice flour”.

L'analisi statistica è stata effettuata mediante il software IBM® SPSS® STATISTICS Version 20 attraverso l'analisi della varianza (ANOVA) con test Tukey.

**Tabella 1.** Campioni di genotipi autoctoni di frumento duro e tenero siciliani.

GENOTIPO	CLASSIFICAZIONE TASSONOMICA
<b>Bidì</b>	<i>T. turgidum ssp. durum</i>
<b>Castiglione Glabro</b>	<i>T. turgidum ssp. durum</i>
<b>Ciciredda</b>	<i>T. turgidum ssp. durum</i>
<b>Margherito</b>	<i>T. turgidum ssp. durum</i>
<b>Paola</b>	<i>T. turgidum ssp. durum</i>
<b>Russello Ibleo</b>	<i>T. turgidum ssp. durum</i>
<b>Timilia</b>	<i>T. turgidum ssp. durum</i>
<b>Urria</b>	<i>T. turgidum ssp. durum</i>
<b>Farro Lungo</b>	<i>T. turgidum ssp. turanicum</i>
<b>Maiorca</b>	<i>T. aestivum. ssp. aestivum</i>
<b>Cappelli (Tester “vintage”)</b>	<i>T. turgidum ssp. durum</i>
<b>Simeto (Tester moderno)</b>	<i>T. turgidum ssp. durum</i>
<b>Anapo (Tester moderno)</b>	<i>T. aestivum. ssp. aestivum</i>

### Risultati e discussione

In Tabella 2 è riportato il contenuto di sali minerali delle tredici varietà esaminate con le differenze significative per ogni minerale ( $P \leq 0,05$ ).

Tra i minerali più “interessanti” dal punto di vista nutrizionale negli ecotipi siciliani oggetto di studio c’è il calcio con contenuti che vanno da 33,02 mg/100 g nella cultivar Maiorca a 48,91 mg/100 g nella cultivar Timilia. La varietà Castiglione Glabro presenta in generale un buon profilo in sali minerali, con alti contenuti di calcio (42,22 mg/100 g) e potassio (432,73 mg/100 g) e buoni di ferro (2,13 mg/100 g) e magnesio (102,94 mg/100 g). I valori determinati nei dieci ecotipi sono significativamente più elevati rispetto ai tester e rispetto ai livelli medi riportati nelle Tabelle di Composizione CREA (<https://www.crea.gov.it/-/tabella-di-composizione-degli-alimenti>) sul frumento duro (30 mg/100g tal quale) e sul frumento tenero (35 mg/100 g tal quale) commercializzati in Italia. In letteratura non sono presenti dati sul contenuto in sali minerali di queste varietà autoctone siciliane; alcuni autori riportano l’elevato contenuto in ceneri, con valori compresi tra 1,6g /100g e 2,0g /100 g di sostanza secca (Guarnaccia *et al.*, 2018; Visioli *et al.*, 2021).

In Figura 1 sono riportati i contenuti in folati totali nei campioni di grani locali siciliani. I contenuti in questa vitamina variano tra i 32,1 µg/100g tal quale nell’ecotipo Urria e 45,3 µg/100g tal quale in Castiglione Glabro.

**Tabella 2.** Contenuto in alcuni sali minerali nei campioni di grani autoctoni locali (mg/100 g tal quale).

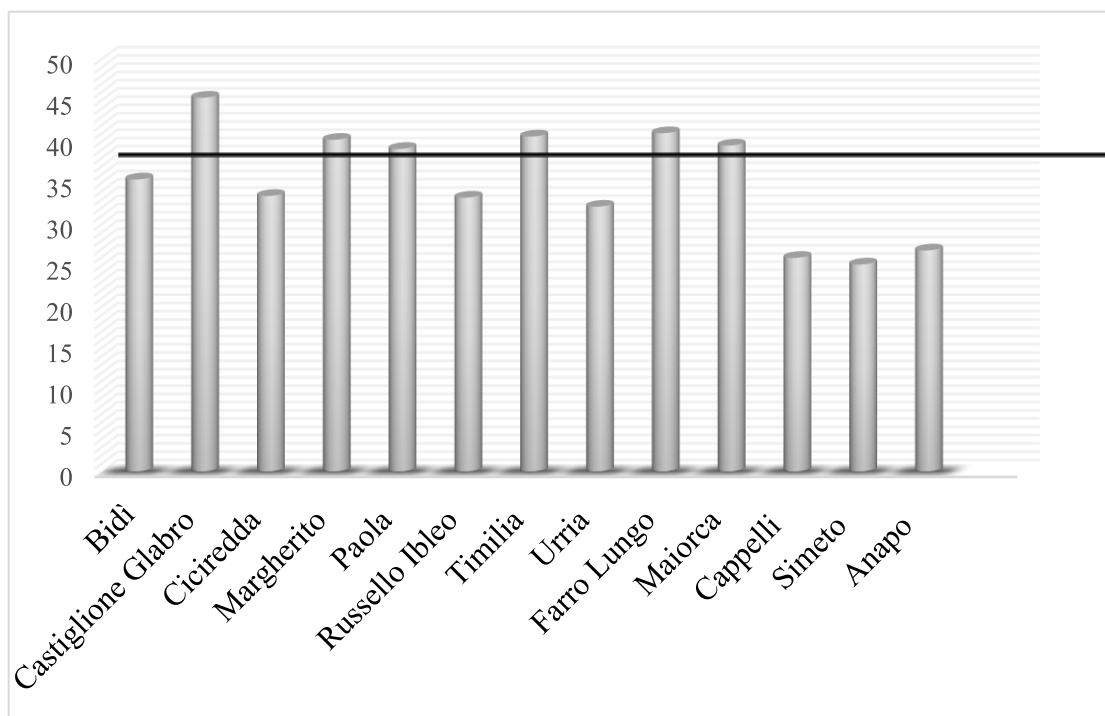
	Mg	Ca	Fe	Zn	Cu	K
<i>Bidi</i>	105,19 ± 2,21 m	42,63 ± 0,34 k	2,35 ± 0,10 j	2,67 ± 0,02 m	0,28 ± 0,01 i	367,11 ± 8,38 d
<i>Castiglione Glabro</i>	102,94 ± 2,44 k	47,62 ± 1,31 l	2,13 ± 0,09 e	2,10 ± 0,03 i	0,23 ± 0,01 b	432,73 ± 20,21 m
<i>Ciciredda</i>	101,36 ± 2,00 i	42,22 ± 0,19 j	2,09 ± 0,04 b	1,77 ± 0,01 d	0,22 ± 0,01 a	373,27 ± 14,37 f
<i>Margherito</i>	102,14 ± 7,07 j	36,32 ± 1,65 c	2,11 ± 0,12 d	1,95 ± 0,11 g	0,26 ± 0,02 h	387,79 ± 30,77 j
<i>Paola</i>	95,69 ± 3,69 f	39,82 ± 1,14 h	2,15 ± 0,06 f	1,99 ± 0,06 h	0,26 ± 0,01 g	347,12 ± 11,88 b
<i>Russello Ibleo</i>	97,23 ± 6,17 h	38,88 ± 3,75 g	2,17 ± 0,17 h	1,52 ± 0,09 b	0,25 ± 0,02 e	407,46 ± 32,41 k
<i>Timilia</i>	103,58 ± 2,41 l	48,91 ± 2,24 m	2,47 ± 0,08 m	1,79 ± 0,05 e	0,26 ± 0,01 f	372,65 ± 16,07 e
<i>Urria</i>	94,83 ± 3,99 d	37,09 ± 0,60 d	2,09 ± 0,07 c	1,88 ± 0,04 f	0,24 ± 0,01 c	419,45 ± 20,27 l
<i>Farro Lungo</i>	95,36 ± 3,38 e	37,86 ± 0,57 e	2,21 ± 0,17 i	2,39 ± 0,09 l	0,31 ± 0,01 m	386,34 ± 19,93 i
<i>Maiorca</i>	90,91 ± 4,49 b	33,02 ± 0,29 a	2,16 ± 0,05 g	1,42 ± 0,02 a	0,24 ± 0,01 d	373,60 ± 8,67 g
<i>Cappelli (Tester V.)</i>	94,26 ± 0,69 c	34,98 ± 0,16 b	2,04 ± 0,01 a	2,39 ± 0,00 k	0,29 ± 0,00 j	355,46 ± 8,26 c
<i>Simeto (Tester M.)</i>	96,69 ± 1,12 g	38,01 ± 2,49 f	2,39 ± 0,11 k	1,56 ± 0,04 c	0,32 ± 0,00 l	376,48 ± 13,14 h
<i>Anapo (Tester M.)</i>	84,13 ± 4,06 a	41,43 ± 3,06 i	2,45 ± 0,18 l	2,31 ± 0,12 j	0,29 ± 0,00 k	267,90 ± 0,70 a

Per ogni colonna, lettere diverse indicano differenze significative (test di Tukey  $P \leq 0,05$ )

Le varietà locali presentano livelli di folati più elevati rispetto ai tester e il valore medio per le varietà autoctone di grano duro è di 37,7 µg folati/100 g. In letteratura non sono presenti ad oggi studi sul contenuto in folati totali per queste varietà autoctone né di altri grani locali italiani, possiamo quindi considerare questo studio come il primo approccio per la determinazione di questo micronutriente importante per la salute umana.

Da questo primo screening, emerge una variabilità interessante nel contenuto dei sali minerali tra gli ecotipi analizzati. L'ecotipo Castiglione Glabro presenta un buon profilo nutrizionale in relazione sia al contenuto in sali minerali, in particolare calcio, magnesio e potassio e di vitamine come i folati.

Lo studio su questi ecotipi proseguirà con la valutazione dei composti bioattivi in relazione anche alle annate di coltivazione.



**Figura 1.** Contenuto in folati totali (µg/100 g tal quale).

### Bibliografia

- DeVries J.W., Jonathan W., Rader J.I., Keagy P.M., Hudson C.A., Angyal G., Arcot J., Castelli M., Doreanu N., Hudson C., Lawrence P., Martin J., Peace R., Rosner L., Strandler H.S., Szpylka J., van den Berg H., Wo C., Wurz C. 2005. Microbiological assay-trienzyme procedure for total folates in cereals and cereal foods: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(1): 5-15.
- Guarnaccia P., Blangiforti S., Spina A., Caruso P., Amato C., Mattiolo E., Anastasi U. 2015. Old Sicilian wheat landraces as a tool to optimize organic and low-input farming systems. Proceedings ICC/AISTEC Conference “Grains for feeding the world” EXPO 2015, Milan (Italy), 1-3 July: 116-119.
- Pfeiffer C.M., Rogers L.M., Gregory J.F 1997. Determination of folate in cereal- grain food products using trienzyme extraction and combined affinity and reserved-phase liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45: 407-413.
- Ruggeri S., Aguzzi A., Carnovale E. 2004. Adequacy of trienzyme treatment in determination of folate in food. In: First International Conference of Foliates: analysis, bioavalability and health, 11-14 February 2004, Warsaw, Poland, pp. 27-32.
- Russo G. 2018. Frumenti siciliani: qualità e valore nutrizionale. In: *Grani Duri Siciliani. Storia, Antropologia, Gastronomia*; Nocilla N., Silvestri G., Eds.; Kalos: Palermo, Italy, 2018; pp. 131–150.
- Visioli G., Giannelli G., Agrimonti C., Spina A., Pasini G. 2021. Traceability of Sicilian durum wheat landraces and historical varieties by High Molecular Weight glutenins footprint. *Agronomy* 2021, 11(1), 143; <https://doi.org/10.3390/agronomy11010143>

## **Evoluzione del contenuto in folati totali in cereali e pseudocereali crudi e cotti e loro significato nella dieta**

S. Ruggeri<sup>1\*</sup>, V. Di Nardo<sup>2</sup>, A. Aguzzi<sup>1</sup>, E. Marconi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Alimenti e Nutrizione (CREA-AN), Via Ardeatina 546, 00178 Roma (RM).

<sup>2</sup>Facoltà Dipartimentale di Scienze e Tecnologie per l'Uomo e l'Ambiente (STUA), Università Campus Bio-Medico di Roma, Via Álvaro del Portillo 21, 00128 Roma (RM).

\*E-mail: [stefania.ruggeri@crea.gov.it](mailto:stefania.ruggeri@crea.gov.it)

### **Abstract**

In this study folate levels were evaluated in commercial samples of cereals (pearled barley and rice), pseudocereals (buckwheat) and pasta (semolina, whole-grain semolina and whole grain semolina fortified with folic acid) also to assess their retention levels after cooking. Pearled barley, pearled rice and buckwheat folate content is: 69.5 µg/100 g d.w., 50.5 µg/100 g d.w and 160.7 µg/100 g d.w respectively, showing an average folate retention of 82%. Whole-grain pasta samples showed higher folate levels (60.4 µg/100 g f.w.) than semolina pasta, but lower than fortified samples (200.9 µg/100 g f.w.). On the other hand, fortified pasta displayed the lowest folate retention after cooking (27.8%).

### **Riassunto**

In questo studio sono stati valutati i livelli di folati in campioni commerciali di cereali (orzo e riso perlato), pseudocereali (grano saraceno) e pasta (semola, semola integrale e fortificata con acido folico), analizzando anche la percentuale di ritenzione di queste vitamine dopo cottura. I campioni di orzo perlato, riso perlato e grano saraceno presentano un valore medio di folati di 69, 5 µg/100 g s.s., 50,5 µg/100 g s.s e 160,7 µg/100 g s.s rispettivamente, con una percentuale media di ritenzione dopo cottura dell'82% circa. I folati nei campioni di pasta integrale (60,4 µg/100 g s.f.) risultano maggiori rispetto a quelli della pasta di semola, inferiori rispetto ai campioni fortificati (200,9 µg/100 g s.f). Di contro questi ultimi presentano il valore di ritenzione dopo cottura significativamente più basso tra tutti i campioni analizzati (27,8%).

**Parole chiave:** folati, cereali, pseudocereali, pasta, cottura.

### **Introduzione**

I folati sono vitamine fondamentali per la salute umana: sono cofattori per la sintesi del DNA, RNA e delle proteine, e il loro ruolo fisiologico si estende alla prevenzione delle patologie congenite tra cui i difetti del tubo neurale (Li *et al.*, 2016), alcune cardiopatie e malattie cardiovascolari, neurodegenerative e alcune forme di tumori (Ricardo *et al.*, 2015; Passarelli *et al.*, 2019).

Purtroppo, i livelli di assunzione di folati nel nostro paese, così come nella maggior parte degli altri paesi europei, sono al di sotto dei livelli raccomandati –400 µg/die- (LARN, 2014; Zappacosta *et al.*, 2013), a causa dello scarso consumo di cereali integrali, legumi, frutta e verdura, ottime fonti di queste vitamine. Pur essendo i cereali, *staple food*, la fonte principale di queste vitamine, pochi sono i dati disponibili in letteratura sul loro contenuto in folati e soprattutto in relazione alle possibili perdite con la cottura (Bui *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2011; Riaz *et al.*, 2019; Liang *et al.*, 2020). Pochissimi anche i dati relativi ai prodotti presenti sul mercato italiano, (<https://www.alimentinutrizione.it/sezioni/tabelle-nutrizionali>), dati che sarebbero molto utili nell'ambito di campagne istituzionali volte al miglioramento dello stato di nutrizione in folati.

Lo scopo di questa ricerca è stato quindi quello di valutare il contenuto in folati totali in campioni commerciali di cereali (riso e orzo), di uno pseudocereale (grano saraceno) e di paste di semola di

grano duro presenti sul mercato italiano, valutando le eventuali perdite di queste importanti vitamine dopo la cottura.

### Materiali e metodi

Campioni di riso perlato, orzo perlato, grano saraceno (Tab. 1) e paste di grano duro – una fortificata con acido folico- (Tab. 2) delle principali marche vendute sul mercato italiano (<https://www.statista.com/statistics/730642/most-widespread-pasta-brands-in-italy/>) sono stati reperiti nelle grandi catene di distribuzione di Roma in due diversi periodi dell'anno. I campioni sono stati macinati con un mulinetto da laboratorio (IKA A 10, IKA-WERKE GmbH & CO. KG, Staufen, Germany), dotato di refrigerazione. I campioni di cereali e le paste sono stati cotti in acqua di rubinetto (rapporto prodotto:acqua di cottura 1:10) al tempo di cottura ottimale, come indicato sulle confezioni. I campioni sono stati poi scolati, raffreddati a temperatura ambiente per ricreare le normali condizioni di consumo e liofilizzati in un liofilizzatore (SCANVAC COOLSAFE, Labogene).

**Tabella 1.** Campioni di cereali e pseudocereali

<i>Cereale, pseudocereale</i>	<i>Marche (n)</i>	<i>Campionamenti (n)</i>
Orzo perlato ( <i>Hordeum vulgare</i> )	4	2
Riso perlato ( <i>Oryza sativa</i> )	4	2
Grano saraceno ( <i>Fagopyrum esculentum</i> )	4	2

**Tabella 2.** Campioni di pasta di semola di grano duro

<i>Pasta</i>	<i>Marche (n)</i>	<i>Campionamenti (n)</i>
Spaghetti di semola di grano duro, integrale	5	2
Spaghetti di semola di grano duro	5	2
Spaghetti di semola di grano duro fortificati con acido folico	1	2

Il contenuto in folati totali è stato determinato con il metodo ufficiale microbiologico (DeVries *et al.*, 2005), utilizzando come microrganismo il *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* (ATCC 7469), previa estrazione secondo Pfeiffer *et al.* (1997) e Ruggeri *et al.*, (2004). Il campione



certificato CRM 121 “Wholemeal flour” (Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgium- folate content =  $51.3 \pm 7.1 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ ) è stato analizzato con ogni set di campioni. La ritenzione dei folati (FR) dopo cottura è stata calcolata con la seguente equazione:  

$$\text{FR (\%)} = \frac{\text{Contenuto folati prodotto cotto (sulla sostanza secca)}}{\text{contenuto folati sulla pasta cruda (sulla sostanza secca)}}$$

### Risultati e discussione

In Tabella 3 sono riportati i contenuti medi dei folati dei campioni di riso perlato, orzo perlato e grano saraceno prima e dopo cottura riportati sulla sostanza secca.

I campioni di orzo perlato esaminati in questo studio presentano un valore medio di  $69,5 \pm 12,8 \mu\text{g}/100\text{g}$  s.s. in linea con quanto determinato da Giordano *et al.* (2016) nelle varietà Italiane Trasimeno e Ketos dopo perlatura (rispettivamente:  $73.2 \mu\text{g}/100 \text{ g}$  e  $65.3 \mu\text{g}/100 \text{ g}$  s.s.). Nei campioni di riso il valore di folati si attesta in media al  $50,5 \mu\text{g}/100 \text{ g}$  s.s. Dong *et al.* (2011) in uno studio per la valutazione del contenuto in folati in 78 varietà di riso hanno determinato range di valori da  $13,3$  a  $111,4 \mu\text{g}/100 \text{ g}$  s.s. nelle varietà integrali e range di  $10,3$  to  $77, 7 \mu\text{g}/100 \text{ g}$  nei risi perlato, con perdite di queste vitamine con la cottura (bollitura) intorno al  $48,3\%$ . I valori medi determinati nei campioni di grano saraceno crudo ( $160,7 \mu\text{g}/100 \text{ g}$  s.s) sono leggermente superiori a quelli determinati da Motta *et al.* (2017) ( $153 \pm 12,4 \mu\text{g}/100 \text{ g}$  s.s.) differenza relativa alla tipologia di varietà e condizioni agronomiche, mentre le perdite con la cottura nei nostri campioni sono risultate più elevate, il  $28,4\%$  dei folati totali a causa delle condizioni diverse utilizzate nella bollitura.

**Tabella 3.** Contenuto in folati nei campioni di riso, orzo e grano saraceno prima e dopo cottura

<i>Cereale o pseudocereale (n marche)</i>	<i>Folati totali <math>\mu\text{g}/100 \text{ g}</math> s.s valori medi tra le diverse marche</i>	<i>Ritenzione dei folati dopo cottura (%)</i>
Orzo perlato, crudo (4)	$69,5 \pm 12,8$	
Orzo perlato, cotto (4)	$59,71 \pm 10,9$	85,9
Riso perlato, crudo (4)	$50,5 \pm 20,3$	
Riso perlato, cotto (4)	$39,4 \pm 15,5$	78,0
Grano saraceno, crudo (4)	$160,7 \pm 35,2$	
Grano saraceno, cotto (4)	$132,4 \pm 21,3$	82,4

In Tabella 4 è riportato il contenuto in folati nei campioni di spaghetti di grano duro, grano duro integrali e in un campione fortificato con acido folico. Gli spaghetti integrali presentano livelli più elevati di folati rispetto ai campioni non integrali, in relazione alla presenza dello strato aleuronico, pari a  $60,4 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ , ma il  $49\%$  di questi micronutrienti viene perso dopo la cottura. I livelli di folati nei campioni di spaghetti fortificati con acido folico sono molto elevati pari a  $200,9 \pm 8,1 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ , ma il  $75\%$  viene perso con la cottura. Probabilmente, l'instabilità con la cottura dell'acido folico naturale potrebbe essere data dal fatto che questo composto non è strettamente legato a macromolecole come l'amido e le proteine e, quindi, ha più probabilità di perdersi nell'acqua di cottura. Bui *et al.* (2007) su uno studio condotto su 26 marche di *noodles* riportano perdite di folati tra il  $6,1\%$  e il  $30\%$  in relazione ai diversi ingredienti e al tempo di cottura. Il tasso medio di ritenzione di folati in tagliatelle a base di grano non fortificato è del  $78\%$  nello studio di Liang *et al.* (2020).

I risultati ottenuti dimostrano che alcuni di questi prodotti mantengono elevati contenuti in folati anche dopo la cottura. Il loro consumo all'interno di un pattern alimentare prevalentemente a base di prodotti vegetali (legumi, verdure e ortaggi) può soddisfare il fabbisogno giornaliero raccomandato per questa vitamina.

**Tabella 4.** Contenuto in folati totali nei campioni di pasta prima e dopo cottura

<i>Pasta (n marche)</i>	<i>Folati totali µg/100 g s.f. (min-max)</i>	<i>Ritenzione dei folati dopo cottura (%)</i>
Spaghetti di grano duro, crudi (5)	39,2 (36,7–44,3)	
Spaghetti di grano duro, cotti (5)	12,3 (7,6–15,7)	56,2
Spaghetti di grano duro, integrali, crudi (5)	60,4 (50,5–61,1)	
Spaghetti di grano duro, integrali, cotti (5)	16,5 (10,5 – 18,4)	49,0
Spaghetti di grano duro fortificati con acido folico, crudi (1)	200,9 ± 8,1	
Spaghetti di grano duro fortificati con acido folico, cotti (1)	30,7 ± 0,9	27,8

### **Bibliografia**

- Bui L.T.T., Small D.M. Folates in Asian noodles: II. 2007. A comparison of commercial samples and the impact of cooking. *Journal of Food Science*, 72: 283-287.
- DeVries J. W., Jonathan W., DeVries J. W., Rader J.I., Keagy P. M., Hudson C. A., Angyal G., Arcot J., Castelli M., Doreanu N., Hudson C., Lawrence P., Martin J., Peace R., Rosner L., Strandler H. S., Szpylka J., van den Berg H., Wo C., Wurz C. 2005. Microbiological assay-trienzyme procedure for total folates in cereals and cereal foods: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(1): 5-15.
- Dong W., Cheng Z., Wang X., Wang B., Zhang H., Su N., Yamamaro C., Lei C. Wang J., Wang J., Zhang X., Guo X., Wu F., Zhai H., Wan J. 2011. Determination of folate content in rice germplasm (*Oryza sativa* L.) using tri-enzyme extraction and microbiological assays. *International of Journal Food Science and Nutrition*, 62: 537-543.
- Giordano D., Reyneri A., Blandino M. 2016. Folate distribution in barley (*Hordeum vulgare* L.), common wheat (*Triticum aestivum* L.) and durum wheat (*Triticum turgidum durum* Desf.) pearled fractions. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 96: 1709-1715.
- LARN, 2014. Livelli di Assunzione Raccomandati di energia e Nutrienti per la popolazione Italiana.
- Li K., Wahlqvist M.L., Li D. 2016. Nutrition, One-Carbon Metabolism and Neural Tube defects: A review. *Nutrients*, 8: 741.

- Liang Q., Wang K., Shariful I., Ye X., Zhang C. 2020. Folate content and retention in wheat grains and wheat-based foods: Effects of storage, processing, and cooking methods. *Food Chemistry*, 333: 127459.
- Liang Q., Wang K., Shariful I., Ye X., Zhang C. 2020. Folate content and retention in wheat grains and wheat-based foods: Effects of storage, processing, and cooking methods. *Food Chemistry*, 333: 127459
- Motta C., Delgado I., Matos A.S., Gonzales G.B., Torres D., Santos M., Chandra-Hioe M.V., Arcot J. Castanheira I. 2017. Folates in quinoa (*Chenopodium quinoa*), amaranth (*Amaranthus* sp.) and buckwheat (*Fagopyrum esculentum*): Influence of cooking and malting. *Journal of Food Composition and Analysis*, 64:181-187.
- Passarelli M.N., Barry E.L., Rees J.R., Mott L.A., Zhang D., Ahnen D.J., Bresalier R.S., Haile R.W., McKeown-Eyssen G., Snover, D.C., Cole B.F., Baron J.A. 2019. Folic acid supplementation and risk of colorectal neoplasia during long-term follow-up of a randomized clinical trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 110: 903-911.
- Pfeiffer C. M., Rogers L. M., Gregory J. F. 1997. Determination of folate in cereal- grain food products using trienzyme extraction and combined affinity and reserved-phase liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 407-413.
- Ricardo J., Martel F., Borges N., Manuel J., Keating E. 2015. Folates and aging: role in mild cognitive impairment, dementia and depression. *Ageing Research Reviews*, 22: 9-19.
- Ruggeri S., Aguzzi A., Carnovale E. 2004. Adequacy of trienzyme treatment in determination of folate in food. In: *First International Conference of Folates: analysis, bioavailability and health*, 11-14 February, Warsaw, Poland, pp. 27-32.
- Zappacosta B., Persichilli S., Iacoviello L., Di Castelnuovo A., Graziano M., Gervasoni J., Leoncini E., Cimino G., Mastroiacovo P. 2013. Folate, vitamin B12 and homocysteine status in an Italian blood donor population. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 23: 473-480.

## **Confronto produttivo, reologico, nutrizionale e sanitario di cereali minori a confronto con il frumento tenero**

*M. Blandino<sup>1</sup>, L. Righetti<sup>2</sup>, R. Meloni<sup>1</sup>, M. Gozzi<sup>2</sup>, M. Donna<sup>1</sup>, C. Dall'Asta<sup>2</sup>, C. Sardella<sup>1\*</sup>*

<sup>1</sup>Università di Torino, Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Largo Paolo Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO).

<sup>2</sup>Università di Parma, Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco, Viale delle Scienze 11/a, 43121, Parma (PR).

\*E-mail: [claudia.sardella@unito.it](mailto:claudia.sardella@unito.it)

### **Abstract**

The increasing demand for functional foods and nutraceuticals by consumers has led growers and processors to focus on cereal crops and derived products with higher nutritional value. The increasing utilization of semi-whole flours and minor cereals, in combination with wheat flour, parallels consumer demands regarding health and nutrition. The cultivation of these cereals as alternatives to bread wheat requires investigations related to yield profitability, sanitary risks, quality and nutritional characteristics. The present contribution aims at comparing varieties of minor cereals (barley, rye, triticale), old varieties (spelt and old wheat cultivars) and new species (tritordeum) with different bread wheat varieties as far as yield and physical kernel traits, rheological, nutritional, and sanitary parameters are concerned. For all the investigated traits a strong intra-species variability has been observed. For this reason, the use of cereals with high nutritional profile requires varietal selection to reach the highest performances in terms of quality and agronomic sustainability and to generate high added-value supply chains.

### **Riassunto**

Le filiere dei prodotti da forno sono oggi fortemente influenzate dalla crescente attenzione da parte del consumatore verso alimenti ad alto valore funzionale. Ciò ha determinato un maggior impiego di cereali speciali, nella logica del multi-cereale. Il maggior impiego di cereali alternativi al frumento tenero, come pseudocereali, cereali minori (orzo, segale, triticale) e antichi (farri, vecchie varietà di frumento) e nuove specie (tritordeum) richiede un'attenta verifica della loro produttività, sostenibilità agronomica e qualità. A tal fine il presente contributo pone a confronto varietà di cereali minori con il frumento tenero, per quanto riguarda i parametri produttivi, reologici, nutrizionali e sanitari. Per tutti i parametri analizzati si è evidenziata forte variabilità intraspecifica. La selezione varietale è perciò fondamentale per far sì che varietà dall'alto profilo nutrizionale e competitive dal punto di vista agronomico possano essere inserite in filiere alimentari avanzate.

### **Introduzione**

Il recente scenario di evoluzione delle filiere dei prodotti da forno, con un più centrale ruolo del consumatore nell'orientamento degli obiettivi produttivi e di trasformazione, richiede una continua capacità di innovare e di fornire prodotti alimentari speciali. In particolare, c'è una crescente attenzione verso prodotti che soddisfino le nuove esigenze, soprattutto salutistiche (prodotti *healthy* o funzionali) e di maggior sostenibilità ambientale. L'ottenimento di prodotti a superiore valore funzionale si fonda sempre più sulla valorizzazione dei composti ad azione antiossidante presenti naturalmente nella granella dei cereali, con un crescente impiego di farine semi-integrali e dall'utilizzo di cereali speciali, in miscela con la farina di frumento, nella logica del multi-cereale. Oltre a pseudocereali, cereali minori (orzo, segale, triticale) e antichi (farri, vecchie varietà di frumento) sono tra le tipologie a cui il mercato si è orientato per soddisfare questa esigenza salutistica. La maggiore coltivazione di cereali alternativi al frumento tenero richiede un'attenta verifica della competitività e dei limiti di tali cereali nell'ambito dell'intera

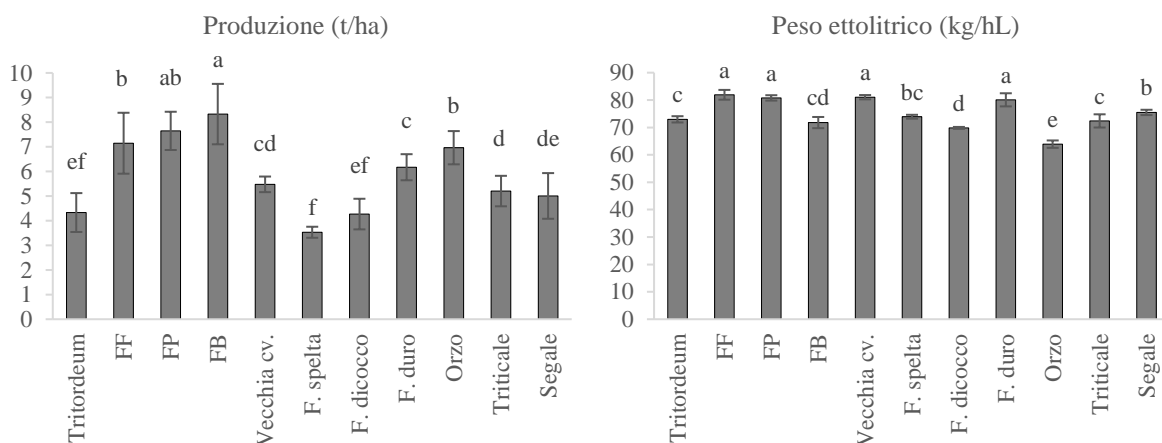
filiera produttiva. Lo scopo del presente contributo è quindi quello di confrontare un ampio numero di varietà di cereali vernini alternativi al frumento tenero, al fine di caratterizzarli dal punto di vista della produttività, della sostenibilità agronomica e degli aspetti qualitativi e nutrizionali.

### **Materiali e metodi**

La prova ha previsto un confronto inter- e intra- specie di varietà di cereali minori rispetto al frumento tenero, su campioni provenienti da un campo sperimentale a Cigliano (VC), nelle annate agrarie 2019-20 e 2020-21. Le cultivar in esame sono state sottoposte alla medesima gestione agronomica. Complessivamente, 7 varietà di frumento tenero (2 cultivar di forza, 2 panificabili, 2 biscottiere, una vecchia varietà) sono state utilizzate come controllo per il confronto di 3 varietà di tritordeum, 2 tipologie di farri (spelta e dicocco), 2 frumenti duri, 2 orzi, 2 triticales e 2 segali. A maturazione la granella è stata raccolta mediante trebbiatura parcellare e sono stati misurati i principali parametri produttivi. Umidità e peso ettolitrico sono stati ottenuti al momento della raccolta tramite GAC® (*Dickey-John Corporation*), previa pulitura della granella. Il peso di mille semi è stato determinato sulla base del peso di duecento cariossidi. Il contenuto proteico del macinato integrale è stato ottenuto tramite analisi spettroscopica nel vicino infrarosso (*NIR Systems 6500*). Il macinato integrale è stato analizzato per quanto riguarda la capacità antiossidante (saggio FRAP, *Ferric Reducing Antioxidant Power*) e il contenuto e il profilo in composti bioattivi. L'estrazione e la quantificazione di acidi fenolici solubili e legati è avvenuta tramite cromatografia liquida ad alta prestazione con rilevatore a diodi (HPLC/DAD), come descritto da Giordano *et al.* (2019). Carotenoidi e tocoli sono stati estratti e quantificati rispettivamente tramite HPLC/DAD e HPLC con rilevatore a fluorescenza (FLD), come descritto da Burešová *et al.* (2021). I risultati sono espressi sul peso secco. L'analisi dei  $\beta$ -glucani è avvenuta tramite kit *mixed-linkage* (*Megazyme*). La contaminazione da micotossine è stata valutata tramite cromatografia liquida abbinata a spettrometria di massa (LC-MS/MS). Sono state determinate le seguenti micotossine: deossinivalenolo (DON), deossinivalenolo-3-glucoside (DON-3G), enniatina B e alcaloidi dell'ergot (somma di ergometrina, ergometrinina, ergosinina, ergosina, ergotaminina, ergocornina, ergotamina, ergocorninina, ergocriptina, ergocristina, ergocristinina).

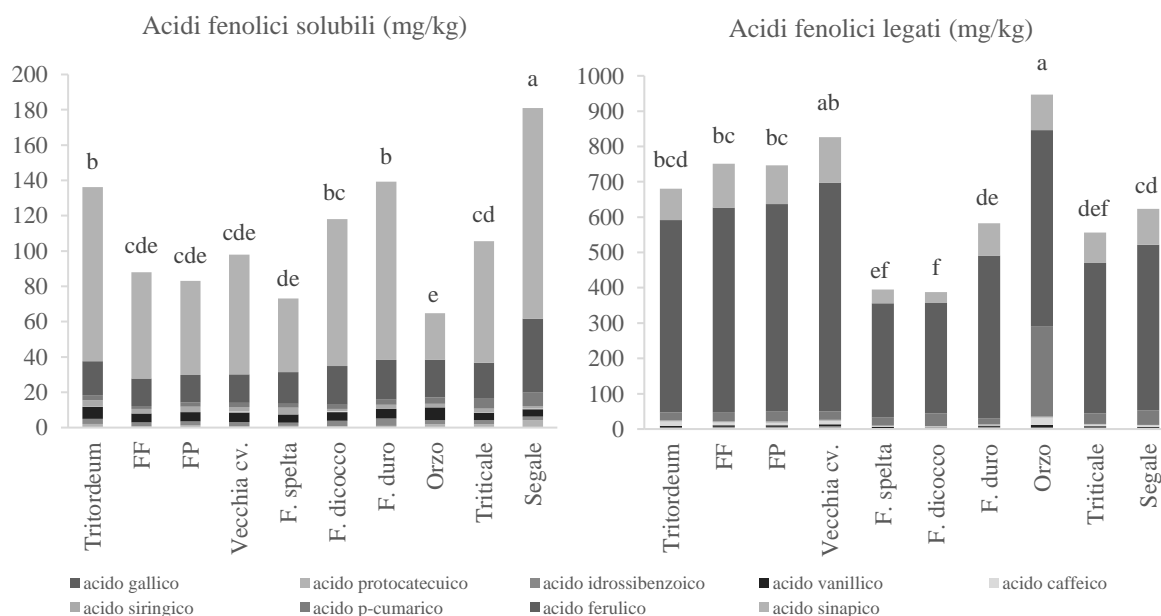
### **Risultati e discussione**

I livelli produttivi di orzo e frumento duro sono risultati paragonabili a quelli del frumento tenero (Fig. 1). Al contrario, tritordeum, segale, triticales e farro hanno presentato una produzione inferiore tra il 32% e il 47%. Tritordeum e frumento duro hanno presentato i più alti contenuti proteici. La vecchia varietà di frumento si è distinta tra i frumenti teneri per un elevato contenuto proteico, superiore anche ai frumenti di forza. Il peso ettolitrico è risultato più elevato nel frumento duro, leggermente superiore al frumento tenero seppur non in maniera statisticamente significativa (Fig. 1). Il frumento tenero ha presentato valori bassi per le varietà biscottiere ed elevati per le cultivar di forza. Per tritordeum, triticales, farro e orzo si sono evidenziati valori inferiori tra il 7% e il 19%. Il peso dei mille semi è risultato essere maggiore rispetto al frumento tenero in farro, frumento duro, orzo e triticales (tra +29% e +7%) e inferiore in segale e tritordeum (-16%).



**Figura 4.** Confronto produttivo dei cereali vernini. Media di 2 anni. FF: frumento tenero di forza; FP: frumento tenero panificabile; F. spelta: farro spelta; F. dicocco: farro dicocco; F. duro: frumento duro. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative per  $p(F) < 0.05$ .

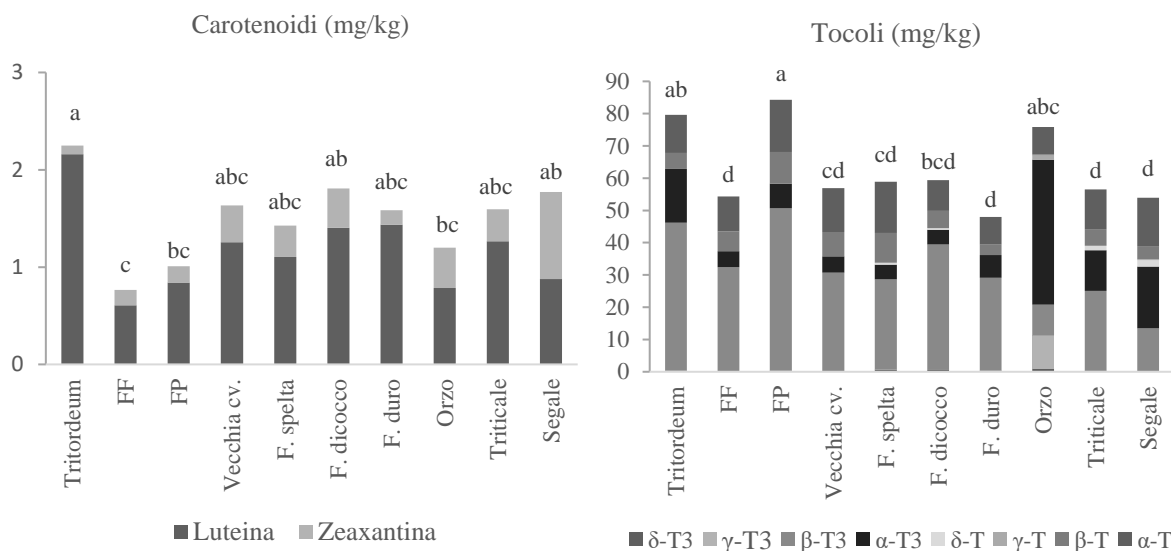
Per quanto riguarda il contenuto in composti bioattivi, gli acidi fenolici sono risultati essere maggiormente presenti in orzi e segali (Fig. 2). In particolare, l'orzo si è distinto per il contenuto più elevato in acidi fenolici legati alla parete cellulare (+24% rispetto al frumento tenero), mentre la segale per il maggiore quantitativo di acidi fenolici solubili, 2 volte superiore rispetto al controllo. Gli acidi fenolici più abbondanti sono risultati essere quelli legati alla parete cellulare e, tra questi, il ferulico ha rappresentato più del 75% degli acidi fenolici legati totali in tutte le specie di cereali vernini. Dal punto di vista compositivo, l'orzo si è distinto per valori significativamente maggiori di acido *p*-cumarico rispetto alle altre specie.



**Figura 5.** Confronto dei cereali vernini per il contenuto in acidi fenolici solubili e legati. Media di 2 anni. FF: frumento tenero di forza; FP: frumento tenero panificabile; F. spelta: farro spelta; F. dicocco: farro dicocco; F. duro: frumento duro. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative per  $p(F) < 0.05$ .

Per quanto riguarda il contenuto in carotenoidi (Fig. 3), il tritordeum, caratterizzato da una forte colorazione gialla della granella, si è distinto per un maggiore contenuto di tali composti rispetto a tutte le altre specie cerealicole in esame, 2 volte superiore rispetto al frumento tenero e maggiore

anche rispetto al frumento duro (+42%). Da un punto di vista compositivo, le varietà di tritordeum hanno presentato mediamente i più alti valori di luteina, carotenoide più abbondante in tutte le varietà, mentre la segale si è distinta per un maggiore quantitativo di zeaxantina. Anche l'analisi di tocoferoli e tocotrienoli ha evidenziato come il tritordeum si sia distinto sia rispetto al frumento tenero (+19%), sia rispetto al frumento duro (+66%), seguito dall'orzo. Inoltre, di quest'ultimo sono state registrate differenze a livello compositivo. Il composto più abbondante in tutte le varietà è risultato essere  $\beta$ -T3, a differenza dell'orzo, che ha presentato un alto contenuto di  $\alpha$ -T3 e quantitativi > LOD per  $\gamma$ -T.



**Figura 6.** Confronto dei cereali vernini per il contenuto in carotenoidi e tocoli. Media di 2 anni. FF: frumento tenero di forza; FP: frumento tenero panificabile; F. spelta: farro spelta; F. dicocco: farro dicocco; F. duro: frumento duro. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative per  $p$  (F) < 0.05.

L'orzo si è distinto per valori significativamente alti in  $\beta$ -glucani, 7 volte maggiori rispetto al frumento tenero, seguito da segale e farro spelta. Le altre varietà in esame hanno mostrato valori simili dal punto di vista statistico.

I più alti valori antiossidanti totali sono stati osservati negli orzi (3 volte maggiori rispetto alla media del frumento tenero), seguiti da segali (+41%), tritordeum (+26%) e triticale (+22%). Non sono stati evidenziati valori significativamente maggiori per quanto riguarda la vecchia varietà Verna rispetto alle altre varietà di frumento tenero.

Per quanto riguarda il contenuto in micotossine (Tab. 1), i livelli più alti di deossinivalenolo totale sono stati registrati nelle varietà di tritordeum, nelle cultivar di frumento biscottiero e di frumento duro. Inoltre, in tali varietà e in quelle di orzo è stata rilevata la maggior presenza della micotossina modificata deossinivalenolo 3-glucoside, mentre le forme acetilate del DON (AC-DON) non sono state ritrovate. È stata inoltre effettuata la conta degli sclerozi e sono stati analizzati a livello quantitativo e qualitativo gli alcaloidi dell'Ergot (somma di ergometrina, ergometrinina, ergosinina, ergosina, ergotaminina, ergocornina, ergotamina, ergocorninina, ergocriptina, ergocristina, ergocristinina). In particolare, le maggiori criticità si sono avute per tritordeum (2021) e segale (2020).

**Tabella 7.** Confronto tra le specie di cereali vernini per la contaminazione in micotossine del macinato integrale. FF: frumento tenero di forza; FP: frumento tenero panificabile; F. spelta: farro spelta; F. dicocco: farro dicocco; F. duro: frumento duro. Deossinivalenolo (DON), deossinivalenolo-3-glucoside (DON-3G), enniatina B e alcaloidi dell'ergot (somma di ergometrina, ergometrinina, ergosinina, ergosina, ergotaminina, ergocornina, ergotamina, ergocorninina, ergocriptina, ergocristina, ergocristinina). Dati medi di 2 anni, espressi in µg/kg. Medie seguite da lettere differenti indicano differenze statisticamente significative per  $p(F) < 0.05$ .

Specie	DON	DON-3G	Enniatina B	Alcaloidi dell'Ergot
Tritordeum	2485 a	268 a	1013 b	1144
FF	298 b	0 b	54 b	89
FP	969 b	9 b	236 b	16
FB	2190 a	96 b	309 b	0
Vecchia cv.	387 b	0 b	73 b	18
F. spelta	224 b	0 b	330 b	0
F. dicocco	590 b	0 b	262 b	0
F. duro	2125 a	235 a	2310 a	0
Orzo	328 b	56 b	657 b	0
Triticale	169 b	0 b	253 b	23
Segale	373 b	0 b	236 b	843

Per tutti i parametri produttivi e qualitativi si è evidenziata comunque una forte variabilità intraspecifica; pertanto, lo sviluppo di filiere avanzate ad alto valore salutistico richiede una attenta scelta varietale, per l'individuazione di cultivar agronomicamente produttive e di alto profilo qualitativo.

### Bibliografia

- Burešová B., Paznocht L., Kotíková Z., Giampaglia B., Martinek P., Lachman J. 2021. Changes in carotenoids and tocopherols of colored-grain wheat during unleavened bread preparation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 103: 104108.
- Giordano D., Reyneri A., Locatelli M., Coisson J. D., Blandino M. 2019. Distribution of bioactive compounds in pearled fractions of tritordeum. *Food Chemistry*, 301: 125228.



## **Caratterizzazione di subunità gluteniniche ad alto peso molecolare (HMW-GS) in "varietà locali" di frumenti siciliani mediante analisi proteomiche**

G. Visioli<sup>\*</sup>, G. Giannelli<sup>1</sup>, C. Agrimonti<sup>1</sup>, A. Spina<sup>2</sup>, G. Pasini<sup>3</sup>

<sup>1</sup>S.C.V.S.A., Università di Parma. V.le Parco area delle Scienze, 43124 Parma (PR).

<sup>2</sup>Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria (CREA), Centro di Ricerca Cerealcoltura e Colture Industriali (CREA-CI), Corso Savoia 190, 95024 Acireale (CT).

<sup>3</sup>D.A.F.N.A.E., Università di Padova, Agripolis, v.le dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD).

\*E-mail: [giovanna.visioli@unipr.it](mailto:giovanna.visioli@unipr.it)

### **Abstract**

Over the last new decade, there has been a strong interest in landraces and historical wheat varieties from farmers, manufacturers, and consumers. They are agronomically and nutritionally interesting, but the supply chain (from seed to end-product) is not solid and traceable. High molecular weight glutenins (HMW-GS) can act as markers to verify the genetic purity of the grain and consequently of the flours, labeled as mono-varietal. In the present work, HMW-GS of different durum wheat Sicilian landraces (Timilia, Russello, Perciasacchi) and one historical variety Margherito were analyzed. SDS-PAGE and MALDI-TOF/MS were utilised to verify protein profiles of random samples of seed batches of the same landraces grown on a farm in South-East Sicily. The results highlighted the presence of different protein bands within the individual seed batches, which are reflected in complex profiles in the corresponding commercial flours labelled as mono-varietal. The results of this study offer opportunities to improve the supply chain of the different Sicilian landraces or historical varieties cultivated, underlining the need for accurate controls from the field to the transformation process to be labelled as mono-varietal products.

### **Riassunto**

Nell'ultimo nuovo decennio, c'è stato un forte interesse per le "varietà locali" e le varietà storiche di grano da parte di agricoltori, produttori e consumatori. Sono agronomicamente e nutrizionalmente interessanti, ma la filiera (dal seme al prodotto finale) non è solida e tracciabile. Le glutenine ad alto peso molecolare (HMW-GS) possono fungere da marcatori per verificare la purezza genetica del seme e di conseguenza delle farine, etichettate come monovarietal. Nel presente lavoro sono state analizzate, mediante SDS-PAGE e MALDI-TOF/MS, HMW-GS di diverse varietà autoctone siciliane di grano duro (Timilia, Russello, Perciasacchi) e una varietà storica Margherito. In particolare, sono stati analizzati i profili proteici di campioni casuali di lotti di semi derivanti da "varietà locali" coltivate in un'azienda agricola nella Sicilia sud-orientale. I risultati hanno evidenziato la presenza di diverse bande proteiche all'interno dei singoli lotti di semi, che si riflettono in profili complessi nelle corrispondenti farine commerciali etichettate come monovarietal. I risultati di questo studio offrono l'opportunità per migliorare la filiera delle diverse "varietà locali" di grano siciliano e delle varietà storiche coltivate, sottolineando la necessità di accurati controlli dal campo al processo di trasformazione per una loro corretta etichettatura.

### **Introduzione**

Le varietà di grano autoctone e antiche posseggono una maggiore tolleranza agli stress biotici e abiotici, rispetto a quelle moderne (Lopes *et al.*, 2015) un contenuto più elevato di fenoli, noti per le loro proprietà salutistiche (Dinelli *et al.*, 2011) ed una maggiore concentrazione di minerali (Ficco *et al.*, 2009). La Sicilia è particolarmente ricca di varietà autoctone di grano duro e grazie alla conservazione dei loro semi, operata dal CREA-Centro di Ricerca Cerealcoltura e Colture

Industriali di Acireale (CT), è stato possibile reintrodurle nelle campagne ove possono essere coltivate in sistemi culturali biologici, grazie alla loro tolleranza agli stress. Dal 2009 il Ministero delle Politiche Agricole Alimentari, Forestali e del Turismo ha istituito il Registro Nazionale delle varietà di specie vegetali agricole (D.lgs. n. 149, 2009 <http://www.fao.org/faolex/results/details/en/c/LEX-FAOC090873>) per la registrazione delle varietà autoctone (sin. varietà locali) minacciate dall'erosione genetica. Sfortunatamente, solo alcune specie autoctone sembrano essere registrate e i semi vengono prodotti e mantenuti dagli agricoltori: ciò implica che i genotipi possono essere mescolati durante la raccolta con mezzi meccanici o durante lo stoccaggio del grano o, in misura molto minore, durante la fioritura a causa dell'impollinazione incrociata. Questo rende difficile la preservazione di queste specie/varietà e la tracciabilità dei loro derivati lungo la filiera, per la quale sono necessari dei markers che ne attestino l'origine genetica. Le proteine del glutine possono assolvere a questo scopo. In generale, le proteine del glutine si distinguono in glutenine, insolubili in alcol, e gliadine, solubili in alcol. Le glutenine, a loro volta, vengono suddivise in subunità ad alto peso molecolare (HMW-GS, 70–140 kDa) e subunità a basso peso molecolare (LMW-GS, 30–50 kDa). Ogni variante proteica HMW-GS determina diverse caratteristiche qualitative della farina di frumento, per cui, una volta individuata la struttura allelica è possibile assegnare ad ogni profilo un certo livello qualitativo. Le HMW-GS sono quindi marcatori di qualità, che vengono utilizzati per selezionare cultivar di frumento con caratteristiche tecnologiche vantaggiose (Gianibelli *et al.*, 2001).

Lo scopo di questo lavoro è stato l'applicazione di SDS-PAGE e MALDI/TOF-MS per determinare la composizione allelica di HMW-GS di tre varietà autoctone siciliane di grano duro (Timilia, Russello, Perciasacchi), di una varietà storica (Margherito) al fine di determinare la composizione varietale e la purezza genetica di lotti di grani e farine etichettati come monovarietali, prodotti da un'azienda agricola siciliana a conduzione biologica. La varietà autoctona di grano tenero, Maiorca, è stata utilizzata per identificare un'eventuale contaminazione di grano tenero.

## **Materiali e metodi**

### ***Materiali***

I lotti di semi e le farine etichettate come monovarietali, delle tre varietà siciliane autoctone di grano duro (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum* (Desf.) Husn.) Timilia, Russello e Perciasacchi, della varietà storica Margherito e della varietà di grano tenero Maiorca (*Triticum aestivum* L. subsp. *aestivum*) sono stati forniti da un'azienda agricola operante in provincia di Ragusa (Sicilia). I semi certificati delle stesse varietà e di quelle industriali Aureo (Bx6 + By8), Biensur (Bx7 + By8) e Cappelli (Bx20 + By20) sono stati forniti dal CREA-Centro di Ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali di Acireale (Catania).

### ***Estrazione e quantificazione delle proteine del glutine nei semi e nelle farine***

Le proteine del glutine sono state estratte da 30 mg di farina e da singoli semi, utilizzando il protocollo di estrazione sequenziale (Visioli *et al.*, 2018).

### ***Elettroforesi SDS-PAGE delle HMW-GS***

L'elettroforesi è stata eseguita in una cella Tetra Cell Mini-PROTEAN (Bio-Rad) su gel di acrilammide 8% (w/v). Aliquote di HMW-GS essiccate sono state sospese in 20 µl di tampone contenente 2% di SDS (w/v), 0,02% (w/v) di bromofenolo blu, 0,1% (v/v) β-mercaptoetanol, 0,05M 1 Tris-HCl (pH 6,8), 10% glicerolo e scaldate a 95°C per 5 minuti prima del caricamento su gel. Un marcatore per elettroforesi ColorBurst™ High Range (MW 30.000–220.000 Da) è stato utilizzato per calcolare il peso molecolare delle proteine. Dopo l'elettroforesi, i gels sono stati colorati con la soluzione G-colloidale Brilliant Blue (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA), fissati in una soluzione al 70% di acido acetico e 40% ml di metanolo ed infine decolorati in una

soluzione di metanolo al 25%. Le immagini sono state acquisite e analizzate attraverso il software Image Lab 4.5.1 (Bio-Rad).

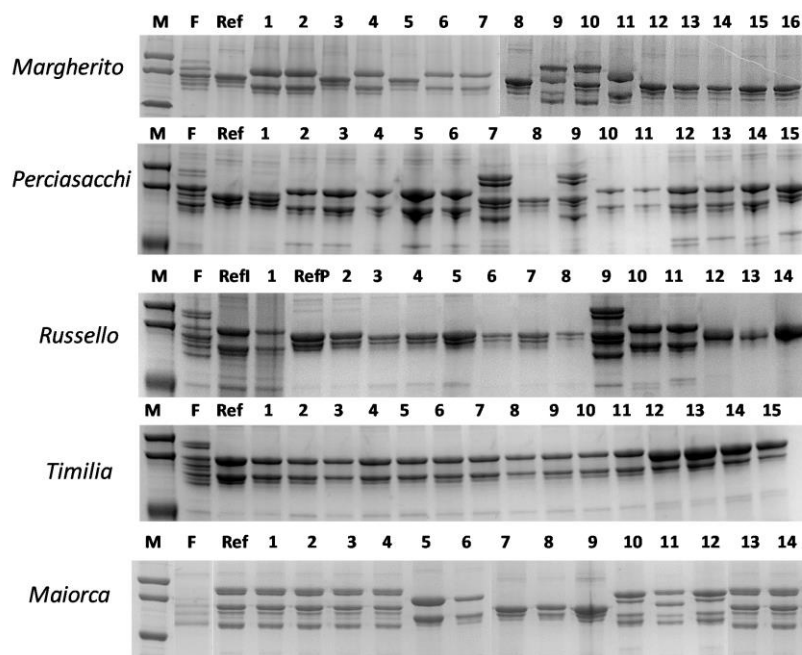
### Identificazione delle HMW-GS tramite MALDI-TOF/MS

L'analisi MALDI-TOF/MS è stata eseguita utilizzando lo strumento 4800 Plus MALDI-TOF/TOF™ (AB SCIEX, Framingham, MA, USA) in un range di 10.000-100.000 Da seguendo il protocollo riportato in Visioli et al. (2018).

### Risultati e discussione

I profili proteici delle varietà autoctone/storiche assegnati usando come riferimento le varietà commerciali Biensur, Aureo e Cappelli, hanno mostrato che Margherito e Perciasacchi hanno un assetto simile alla variante Bx20 (Cappelli), Russello alla variante Bx13 + By16, e Ruscìa (sinonimo di Russello Ibleo) alla variante Bx6 + By8. Timilia ha mostrato un assetto Bx6 + By8, come evidenziato da Muccilli *et al.* (2011) mentre altri autori hanno rinvenuto un assetto Bx20 (Mefleh *et al.*, 2020). Questi diversi risultati fanno presumere che diverse varietà di Timilia siano presenti in Sicilia.

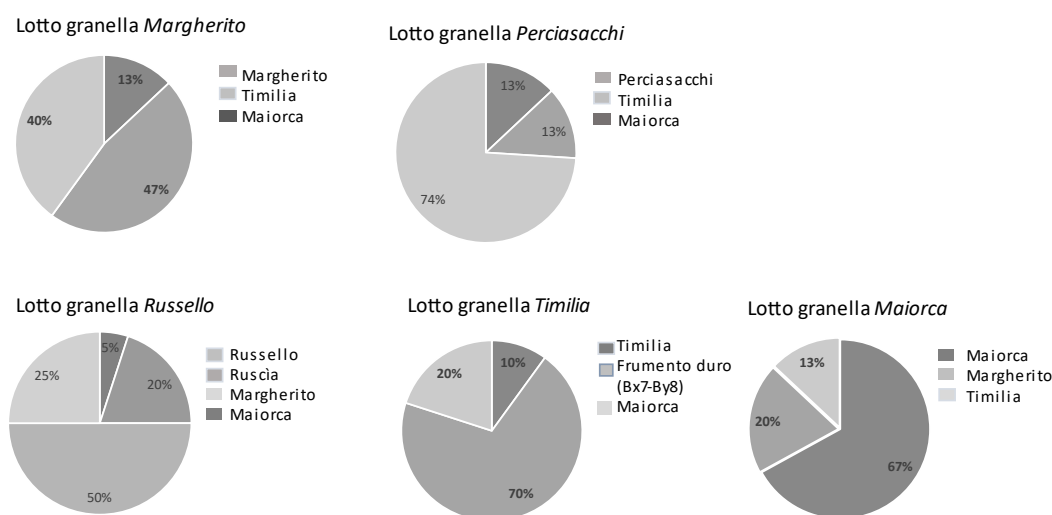
La caratterizzazione delle HMW-GS delle farine etichettate come mono-varietali derivanti dalle varietà in oggetto, ha evidenziato la presenza di bande multiple, non riconducibili ad uno specifico profilo identificato nei semi certificati. Inoltre, la presenza di una contaminazione di grano tenero è stata riscontrata, identificata tramite la presenza di una HMW-GS tipica del genoma delle varietà di frumento tenero. L'analisi di 15-20 singoli semi all'interno dei lotti delle varietà oggetto di questo studio ha evidenziato un certo grado di contaminazione da parte di altre varietà (Fig. 1).



**Figura 1.** Profili elettroforetici HMW-GS delle HMW-GS ottenuti da singoli semi di lotti di varietà siciliane. F= farine; Ref: riferimento (semi certificati); RefI=riferimento di Ruscìa (sin. Russello Ibleo); RefP=riferimento Russello (sin Priziusa).

In particolare, nel lotto di semi “Margherito”, sono stati identificati diversi profili di grano duro, soprattutto Bx6 + By9, e “Maiorca”, grano tenero, mentre solo due semi corrispondevano al profilo di riferimento. Questi dati supportano l'ipotesi che i lotti certificati come mono-varietali, sono contaminati non solo da altre varietà di grano duro, ma anche da grano tenero coltivato nella stessa azienda. Anche “Perciasacchi” e “Russello” hanno mostrato una certa eterogeneità nei profili

HMW-GS. “Timilia” si è rivelato il lotto più omogeneo, in cui la maggior parte dei semi aveva un profilo corrispondente a quello di riferimento. Anche all’interno del lotto di “Maiorca”, sono stati rinvenuti semi con profili diversi da quello di riferimento, corrispondenti, molto probabilmente, a varietà di grano duro. L’analisi MALDI-TOF/MS, condotta su 40 semi, ha permesso di misurare con una maggiore precisione, il livello di contaminazione all’interno di ciascun lotto i cui dati sono rappresentati in Figura 2.



**Figura 2.** Percentuali di contaminazione nei lotti delle varietà esaminate, determinate attraverso MALDI-TOF/MS

## Conclusioni

Le varietà autoctone ed antiche del frumento hanno un grosso valore dal punto di vista nutrizionale, tecnologico ed agronomico. Tuttavia, la tracciabilità di queste varietà lungo la filiera di produzione è ancora carente, per cui farina, pasta e pane etichettati come monovarietali, non sempre sono tali. Questo studio ha mostrato che farine etichettate come prodotti monovarietali di varietà di frumento di grano duro siciliane, sono, in realtà, contaminate da diverse varietà di grano duro e tenero coltivate nella stessa azienda. Queste contaminazioni possono derivare dall’accidentale scambio di semi non geneticamente puri, dal mescolamento dei semi durante il raccolto, o, in misura minore dall’impollinazione incrociata tra i diversi genotipi.

## Bibliografia

- Dinelli G., Segura-Carretero A., Di Silvestro R., Marotti I., Arráez-Román D., Benedettelli S., Ghiselli L., Fernandez-Gutierrez A. 2011. Profiles of phenolic compounds in modern and old common wheat varieties determined by liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 42, 7670-7681.
- Ficco D.B.M., Riefolo C., Nicastro G., De Simone V.A., Di Gesù M., Beleggia R., Platani C., Cattivelli L., De Vita P. 2009. Phytate and mineral elements concentration in a collection of Italian durum wheat cultiv. *Field Crop Research*, 2009, 111: 235-242.
- Gianibelli M.C., Larroque O.R., MacRitchie F., Wringley W. 2001. Biochemical, genetic, and molecular characterization of wheat glutenin and its component subunits. *Cereal Chemistry*, 78: 635-646.

- Lopes M.S., El-Basyoni I., Baenziger P.S., Singh S., Royo C., Ozbek K., Aktas H., Ozer E., Ozdemir F., Manickavelu A., Ban T., Vikram P. 2015. Exploiting genetic diversity from landraces in wheat breeding for adaptation to climate change. *Journal of Experimental Botany*, 66: 3477-3486.
- Mefleh M., Conte P., Fadda C., Giunta F., Motzo R. 2020. From seed to bread: Variation in quality in a set of old durum wheat cultivars. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 100: 4066-4074.
- Muccilli V., Lo Bianco M., Cunsolo V., Saletti R., Gallo G., Foti S. 2011. High molecular weight glutenin subunits in some durum wheat cultivars investigated by means of mass spectrometric techniques. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 59: 12226-12237
- Visioli G., Bonas U., Dal Cortivo C., Pasini G., Marmiroli N., Mosca G., Vamerali T. 2018. Variations in yield and gluten proteins in durum wheat varieties under late-season foliar vs. soil application of nitrogen fertilizer in a northern Mediterranean environment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98: 2360-2369.

## **Selezione Assistita da Marcatori Molecolari (SAM): resistenza a *Pyricularia grisea***

L. Borgo\*, A. Carnia, C. Simonelli

Ente Nazionale Risi, Centro Ricerche sul Riso, Laboratorio di Chimica Merceologia e Biologia Molecolare, Via San Vittore 40, 20123 Milano (MI).

\*E-mail: [l.borgo@enterisi.it](mailto:l.borgo@enterisi.it)

### **Abstract**

The ascomycete fungus *Pyricularia grisea* is responsible for one of the most serious diseases of rice (*Oryza sativa* L.) with worldwide distribution, which manifests itself in Italy with greater intensity on adults by inducing the production of empty or malformed caryopses. A pathogenicity assay with 10 strains of *P. grisea* present in the Italian area on differential varieties showed that the *Pi-ta* and *Pi-b* genes determine complete resistance to all Italian strains, while *Pi-z* and *Pi-k* show resistance to all strains except IT10 and IT14, respectively. In the Laboratory of Merceology Chemistry and Molecular Biology, protocols have been developed to detect the presence of the resistance genes *Pi-ta*, *Pi-b*, *Pi-z* and *Pi-k<sup>h</sup>* in order to carry out Molecular Marker Assisted Selection (MAS) aimed at establishing varieties that possess one or more resistance genes to *P. grisea* (*gene pyramiding*) in order to obtain varieties with broad-spectrum resistance to the pathogen, avoiding fungicide treatments. Varietal resistance to the fungus leads to a quantitative and qualitative increase in yields. Furthermore, the reduced and strategic use of pesticides has positive consequences for the farmer, who benefits from a significant economic relapse, for the rice paddy agro-ecosystem and for the consumer, who demands a higher quality and healthier product.

### **Riassunto**

Il fungo ascomicete *Pyricularia grisea* è responsabile di una delle più gravi patologie del riso (*Oryza sativa* L.) a distribuzione mondiale che si manifesta in Italia con maggiore intensità sui soggetti adulti inducendo la produzione di carioidi vuoti o malformati. Un saggio di patogenicità con 10 ceppi di *P. grisea* presenti nell'areale italiano su varietà differenziali ha dimostrato che i geni *Pi-ta* e *Pi-b* determinano resistenza completa a tutti i ceppi italiani, mentre *Pi-z* e *Pi-k* mostrano resistenza a tutti i ceppi tranne a IT10 e IT14, rispettivamente. Nel Laboratorio di Chimica Merceologia e di Biologia Molecolare dell'Ente Nazionale Risi, sono stati messi a punto protocolli per rilevare la presenza dei geni di resistenza *Pi-ta*, *Pi-b*, *Pi-z* e *Pi-k<sup>h</sup>* al fine di effettuare Selezione Assistita con i marcatori Molecolari (SAM) finalizzata alla costituzione di varietà che possiedono uno o più geni di resistenza a *P. grisea* (*gene pyramiding*) per ottenere varietà con resistenza ad ampio spettro al patogeno, evitando i trattamenti fungicidi. La resistenza varietale al fungo determina un aumento quantitativo e qualitativo dei raccolti. Inoltre, l'utilizzo ridotto e strategico di fitofarmaci ha conseguenze positive per l'agricoltore che giova di una ricaduta economica significativa, per l'agro-ecosistema risaia e per il consumatore che richiede un prodotto di maggiore qualità e salubrità.

### **Introduzione: Il patogeno *Pyricularia grisea* e la sua incidenza sulla coltivazione del riso**

Il microrganismo responsabile della patologia è la forma anamorfa o asessuata del fungo ascomicete *Pyricularia grisea*; il telomorfo o forma perfetta del fungo, *Magnaporthe grisea*, non si trova in natura in Italia (Hebert, 1971). Il brusone del riso (in inglese blast), in termini fitopatologici, si definisce come una malattia tossica o necrotossica, in quanto le cellule dei tessuti vegetali invasi dalle ife fungine sono rapidamente uccise dal patogeno che utilizza il materiale cellulare necrotizzato per le sue necessità alimentari. Il fungo attacca la pianta di riso in ogni suo stadio di sviluppo, producendo lesioni sulle foglie, a livello dei nodi e dei culmi e sulla pannocchia.

Da un punto di vista funzionale, l'invasione dei meristemi e dei parenchimi delle foglie e del culmo da parte di *Pyricularia* e l'occlusione dei vasi xilema e floema da parte del micelio fungino, porta all'arresto del trasporto di materiale alimentare, provocando un decorso acuto della malattia. Secondo la teoria *gene-per-gene*, proposta da Flor nel 1942 per spiegare il fenomeno della resistenza dell'ospite, nelle interazioni incompatibili, per ciascun gene che conferisce virulenza (patogenicità) al patogeno, si contrappone, nella pianta ospite, un gene di resistenza al patogeno. Le varietà di riso presentano un diverso grado di resistenza al brusone e possono quindi essere distinte in varietà geneticamente resistenti e varietà suscettibili all'invasione del fungo. Diversi fattori sia di tipo abiotico sia biotico influenzano la sensibilità varietale. Un ruolo importantissimo è rivestito dalla silice, presente nell'epidermide fogliare e nello sclerenchima sotto forma di gel; oltre a rinforzare le pareti cellulari delle foglie adulte, la silice svolge un ruolo importante nel controllo della traspirazione, proteggendo la pianta dall'attacco di funghi ed insetti. Nella pianta resistente, in seguito all'attacco del fungo, vengono attivate le risposte di difesa che comprendono la sintesi di sostanze chimiche, tra cui l'oryzalexina D che, interferendo con la funzione della membrana cellulare fungina, inibisce la respirazione mitocondriale e l'assunzione di nutrienti. Le varietà di riso resistenti a *P. grisea* producono acido p-cumarico, acido ferulico e derivati dell'acido cinnamico, sostanze in grado di legarsi alle tossine secrete dal fungo eliminandone la tossicità.

### **Materiali e metodi: I geni di resistenza a *Pyricularia grisea***

Una ricerca bibliografica effettuata da Ballini *et al.* nel 2008 ha permesso di identificare 85 geni di resistenza a *Pyricularia grisea* che hanno mappato sul genoma del riso.

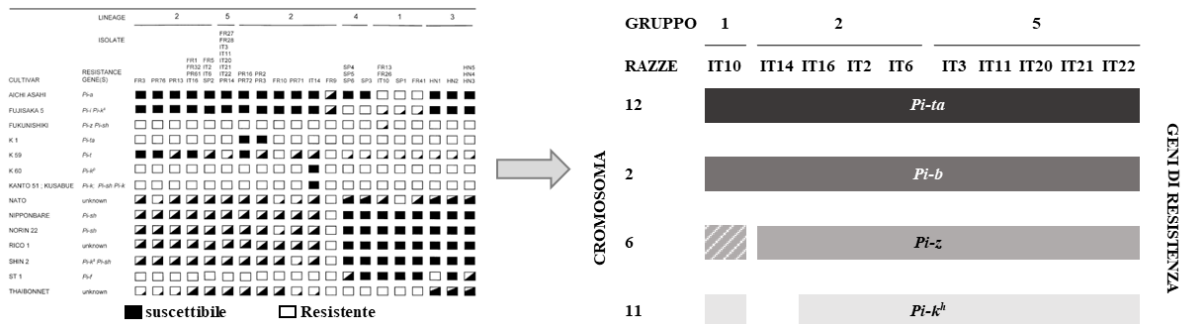
Il “*gene-pyramiding*” è il processo di combinazione simultanea di più geni in un singolo genotipo. Ciò è possibile attraverso il *breeding* convenzionale, ma risulta estremamente difficile o impossibile nelle prime fasi della selezione. Attraverso l'uso della selezione fenotipica tradizionale, ogni genotipo deve essere fenotipicamente valutato per tutti i caratteri ricercati. Pertanto, può essere molto difficile verificare la presenza del carattere di interesse in certe popolazioni soprattutto se l'analisi del carattere di interesse prevede la distruzione del materiale genetico in osservazione. I marcatori molecolari possono facilitare la selezione in quanto i saggi molecolari non risultano distruttivi, richiedono poco materiale vegetale e da un singolo campione di DNA possono essere effettuati molteplici saggi di ricerca di diversi geni di interesse senza attuare nessuna analisi di fenotipizzazione. In effetti, attraverso l'uso di marcatori molecolari, ognuno strettamente correlato alla presenza di un gene di resistenza ai ceppi del patogeno, può essere effettuato uno *screening* dell'intera popolazione in maniera rapida e sicura, eliminando i genotipi eterozigoti e selezionando esclusivamente i genotipi omozigoti dominanti. Inoltre, la combinazione dei due marcatori molecolari consente di individuare i genotipi che presentano simultaneamente la resistenza ad entrambi i ceppi del patogeno.

In uno studio di Roumen *et al.* (1997), 41 ceppi di *Pyricularia grisea* raccolti in diversi anni su cultivar di riso differenti, provenienti da cinque paesi europei (Francia, Spagna, Ungheria, Portogallo e Italia) sono stati caratterizzati dal punto di vista molecolare e raggruppati in 5 famiglie distinte.

I ceppi italiani del patogeno si collocano nelle famiglie 1, 2 e 5 insieme a ceppi francesi e portoghesi, mentre le famiglie 3 e 4 sono costituite esclusivamente da ceppi ungheresi e spagnoli rispettivamente.

In seguito ad un saggio di patogenicità con i 41 ceppi del patogeno su varietà differenziali, di cui è nota la presenza del/i gene/i *Pi* nel genoma, si è concluso che i geni *Pi-ta* e *Pi-b* determinano resistenza completa ai ceppi italiani considerati, mentre *Pi-z* e *Pi-k*<sup>h</sup> mostrano resistenza a tutti i ceppi tranne *IT10* e *IT14* rispettivamente (Fig. 1).





**Figura 1.** A sinistra, saggio di patogenicità con i 41 ceppi del patogeno su varietà differenziali di cui è nota la presenza dell/i gene/i *Pi* nel genoma. (Roumen *et al.*, 1997); a destra resistenza dei geni ai ceppi italiani.

Il Laboratorio di Biologia Molecolare del Centro Ricerche sul Riso dell'Ente Nazionale Risi, considerando i risultati ottenuti dallo studio di Roumen *et al.* (1997) ha deciso di considerare i seguenti geni di resistenza, ognuno di loro in grado di riconoscere in modo specifico un determinato gene di avirulenza di *P. grisea*: *Pi-ta* riconosce il gene di avirulenza *Avr-Pita* (Jia *et al.* 2003); *Pi-b* riconosce il gene di avirulenza *Avr-Pib* (Fjellstrom *et al.*, 2004); *Pi-ka* riconosce il gene di avirulenza *Avr-Pik* (Fjellstrom *et al.*, 2004); *Pi-z* riconosce il gene di avirulenza *Avr-Piz* (Marchetti *et al.*, 1987; McClung, 2002; Fjellstrom *et al.*, 2006)

Pertanto, dopo un'accurata ricerca bibliografica volta ad acquisire articoli scientifici relativi all'uso di marcatori molecolari per l'individuazione dei geni di resistenza di interesse, sono state perfezionate delle metodiche analitiche in grado di rilevare in modo inequivocabile la presenza di uno o più geni di resistenza all'interno dei genotipi che costituiscono la banca del germoplasma dell'Ente Nazionale Risi.

La Tabella 1 riassume, per ogni protocollo di ricerca del gene *Pi* di interesse, il marcatore molecolare ed il controllo positivo che vengono utilizzati nell'analisi PCR.

**Tabella 1.** Protocolli PCR utilizzati per rilevare il gene di interesse.

Gene	Marcatore Molecolare	Prodotto amplificato	Tipo di marcatore	Controllo positivo
<i>Pi-ta</i>	YL153/YL154	440 bp	Dominante	Tequing
	YL155/YL87	1086 bp	Dominante	Tequing
	YL183/YL87	1087 bp	Dominante	Nipponbare
<i>Pi-b</i>	Pibdom	365 bp	Dominante	Tequing
	RM208	177 bp	Codominante	Tequing
<i>Pi-ka</i>	RM224	139 bp	Codominante	Wells
<i>Pi-z</i>	AP5659-1	220 bp	Codominante	Zenith
	AP5930	159 bp	Codominante	

Nell'ambito del progetto Risoval «Metodiche molecolari per la valorizzazione delle varietà di riso coltivate in Lombardia» finanziato dalla Regione Lombardia (Quaderni della Ricerca n. 123 - novembre 2010), un'area di ricerca è stata quella di utilizzare marcatori molecolari per identificare geni di resistenza a *Pyricularia grisea*. Una collezione di 72 varietà di riso coltivate in Lombardia è stata studiata ed è stato effettuato uno *screening* per rilevare la presenza di geni di resistenza *Pi-ta*, *Pi-b*, *Pi-ka* o *Pi-z* all'interno del patrimonio genetico varietale. I risultati dello *screening* varietale hanno dimostrato che 62 genotipi non hanno alcun gene di resistenza, mentre 10 sono in possesso di 1 o 2 geni di resistenza.

Nella collezione di 72 cultivar studiati: nessuna delle varietà presenta il gene *Pi-b*, Venere possiede il gene *Pi-ta*, Artiglio i geni *Pi-ta* e *Pi-z*, Libero e Marte il gene *Pi-ka*, Augusto, Carmen e Rodeo il gene *Pi-z*, Arsenal, Atlante e Cadet i geni *Pi-ka* e *Pi-z*. Presso il Parco Tecnologico



Padano, le 72 varietà sono state sottoposte alla fenotipizzazione per la resistenza a *Pyricularia grisea* mediante infezione *in vitro* con ceppi fungini del patogeno IT2, IT3 e IT10, provenienti da differenti aree geografiche italiane ed isolati da una singola spora (selezionati dalla collezione di ceppi di *P. grisea* esistente presso il CIRAD di Montpellier) al fine di valutare rapidamente il livello di resistenza/suscettibilità dei genotipi di riso al brusone. L'inoculazione fogliare di spore di *P. grisea* su giovani piantine di riso avviene in condizioni controllate di temperatura e di umidità in un'apposita camera di crescita. Già dopo 5 giorni di incubazione è possibile osservare sulle foglie delle piante inoculate i sintomi tipici della malattia del brusone e discriminare rapidamente ed in modo affidabile i genotipi suscettibili da quelli resistenti. In base ai sintomi osservati dopo circa una settimana dall'infezione e facendo riferimento ad un'opportuna classificazione, si può attribuire alle varietà un determinato grado di resistenza/suscettibilità al fungo patogeno. La presenza dei geni di resistenza viene confermata dagli esiti della fenotipizzazione, dimostrando una correlazione tra la presenza di un determinato geni *Pi* e la resistenza al patogeno.

### Risultati e discussione: la SAM nei programmi di breeding ENR per la resistenza a *Pyricularia grisea*

Il progetto Risoval (Borgo *et al.*,2010), oltre allo studio portato avanti dal Laboratorio di Biologia Molecolare dell'ENR, ha permesso di mettere a punto e di validare 4 diversi metodi di prova per la ricerca della presenza all'interno del genoma dei genotipi quattro geni di resistenza *Pi-ta*, *Pi-h*, *Pi-k*, *Pi-b* e *Pi-z*, ritenuti i più importanti per la risicoltura italiana. Inoltre, durante questo progetto, sono state caratterizzate 72 varietà italiane, ma per aiutare maggiormente nei programmi di *breeding* per la resistenza a *Pyricularia grisea* tramite la SAM, sono state esaminate geneticamente molteplici accessioni presenti nella banca del germoplasma dell'ENR al fine di permettere di effettuare incroci mirati all'ottenimento di varietà elite possedenti uno o più geni di resistenza.

I risultati del miglioramento genetico tramite SAM sono esplicitati nella tabella 2 e la figura seguenti.

La Tabella 2 presenta quanti incroci sono stati effettuati dal 2003 al 2017 e di conseguenza quali sono le varietà iscritte al Registro Nazionale Italiano delle varietà di Specie Agrarie dal 2005 al 2022 grazie all'attuazione della SAM a tutti i programmi di *breeding* ENR. Si preme evidenziare come la SAM (iniziata nel 2006 con l'allestimento del Laboratorio di Biologia Molecolare) abbia permesso di ridurre il numero di incroci e soprattutto di effettuare una drastica riduzione delle linee in osservazione tra la generazione  $F_2$  e quella  $F_3$ , permettendo di ridurre il lavoro di osservazione delle linee dal punto di vista fenologico.

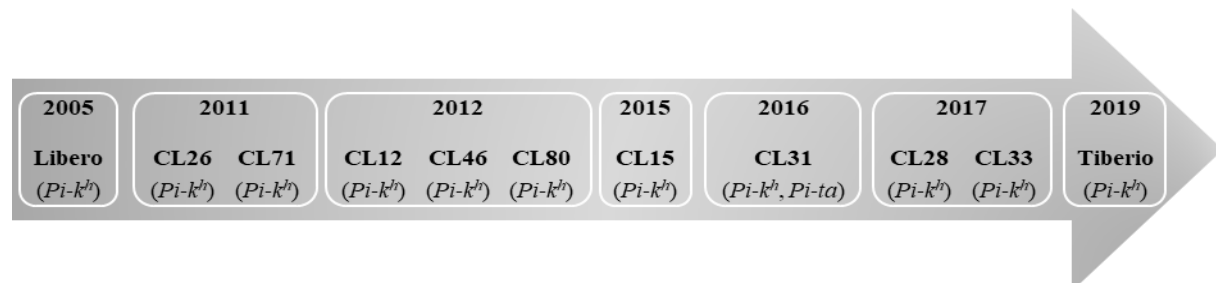
**Tabella 2.** Numero di incroci effettuati dal 2003 al 2017 e relative varietà iscritte al Registro Nazionale Italiano in base ai diversi programmi di breeding.

	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Incroci	450	850	896	731	581	968	420	220	271	380	343	394	390	370	277					
F <sub>1</sub>		439	840	896	731	576	968	395	220	271	360	343	394	348	340					
F <sub>2</sub>		159	436	821	880	726	552	780	373	220	267	161	326	326	236					
F <sub>3</sub>		180	94	238	216	324	197	120	198	187	101	163	156	182	262					
F <sub>4</sub>		150	34	72	119	103	128	110	42	115	97	62	108	129	119					
F <sub>5</sub>		26	59	22	64	62	40	60	62	27	64	97	36	102	27					
F <sub>n</sub>							36	32	32	46	39	44	36	46	70					
Varietà iscritte al registro nazionale			Libero		CRLB1 CRW3				Lince Puma CL 71 CL 26	CL 12 CL 46 CL 80 larim			CL15	CL31	CL28 CL33	CL388 Valente	Tiberio CL35 CL510	Duillo		CL18

La Figura 2 presenta quali sono le varietà ottenute dal 2006 al 2019 grazie all'attuazione della SAM ai programmi di *breeding* ENR per la resistenza a *Pyricularia grisea*.

Undici varietà sono state registrate al Registro Nazionale Italiano delle specie Agrarie, dieci delle quali possiedono il gene di resistenza  $Pi-k^h$ : Libero, CL26, CL71, CL12, CL46, CL80, CL15, CL28, CL33 e Tiberio.

La varietà CL31 possiede invece due geni di resistenza  $Pi-k^h$  e  $Pi-ta$ , conferma che vi è la possibilità di effettuare, anche se evidentemente più complicato, "gene-pyramiding" ovvero la combinazione simultanea di più geni in una singola varietà.



**Figura 2.** SAM e costituzione di varietà con geni di resistenza a *Pyricularia grisea*.

### Bibliografia

- Ballini E., Morel J.B., Droc G., Price A., Courtois B., Nottoghem J.L., Tharreau D., 2008. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21: 859-868.
- Borgo L., Carnia A., Sodano A., Cormegna M., Simonelli C., Piffanelli P., Greco R., Crispino L., Gironi R. 2010. *Quaderni della Ricerca* n. 123, novembre 2010.
- Fjellstrom R.G., Conaway-Bormans A.C., McClung A.M., Marchetti M.A., Shank A.R., Park W.D., 2004. *Crop Science*, 44: 1790-1798.
- Fjellstrom R.G., McClung A.M. and Shank A.R., 2006. *Molecular Breeding* 17: 149-157.
- Flor H.H., 1942. *Phytopathology*, 32: 653-669.
- Jia Y., Bryan G.T., Farrall L., Valent B., 2003. Natural Variation at the  $Pi-ta$  Rice Blast Resistance Locus. *Phytopathology* 93: 1452-1459.
- Marchetti M.A., Lai X., Bollich C.N., 1987. *Phytopathology*, 77: 799-804.
- McClung A.M. 2002. In C.W. Smith and R.H. Dilday (ed) *Rice: Origin, history, technology and production*. John Wiley & Sons, Hoboken NJ., pp.177-202
- Roumen E., Levy M., Nottoghem J.L., 1997. Characterisation of the European pathogen population of *Magnaporthe grisea* by DNA fingerprinting and pathotype analysis. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 363-371.

## Cadmio e Arsenico nel riso: un monitoraggio sul territorio italiano

A. Cantalupi<sup>1\*</sup>, C. Simonelli<sup>1</sup>, M. Casali<sup>1</sup>, M. Romani<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ente Nazionale Risi, Laboratorio di Chimica Merceologia e Biologia Molecolare, Centro Ricerche sul Riso, Strada per Ceretto 4, 27030 Castello d'Agogna (PV).

<sup>2</sup>Ente Nazionale Risi, Dipartimento di Agronomia e Difesa del Territorio, Centro Ricerche sul Riso, Strada per Ceretto 4, 27030 Castello d'Agogna (PV).

\*E-mail: [a.cantalupi@enterisi.it](mailto:a.cantalupi@enterisi.it)

### Abstract

Rice, like other cultivated products, may contain minimal residues of Cadmium (Cd) and inorganic Arsenic (As) translocated from soil, air and irrigation water. The danger of heavy metals to humans is due to the fact that they tend to accumulate and increase in concentration over time. To effectively control their assimilation in the rice plant, several strategies must be implemented, ranging from agronomic practices to varietal choice.

In Italy, cadmium and arsenic contamination of rice is a rare occurrence because the levels of these two metals usually detected are within the limits set by current regulations. The issue becomes more impactful when considering the consumption of rice as baby food, for which legal limits are reduced in order to protect this type of product.

However, it is particularly strategic to have a mapping of these two elements for the rice-growing territory, so as to have an idea of their distribution in the territory and to be able to perform an effective control.

### Riassunto

Il riso, come altri prodotti coltivati, può contenere residui minimi di Cadmio (Cd) e Arsenico (As) inorganico traslocati dal suolo, dall'aria e dalle acque di irrigazione. La pericolosità dei metalli pesanti per gli umani è dovuta al fatto che essi tendono ad accumularsi e ad aumentare la propria concentrazione nel tempo. Per controllarne efficacemente l'assimilazione nella pianta, occorre mettere in atto diverse strategie che vanno dalle pratiche agronomiche alla scelta varietale.

In Italia, la contaminazione del riso da cadmio e da arsenico è un evento che si presenta raramente in quanto i livelli di cadmio normalmente rilevati rientrano ampiamente nei limiti previsti dalla normativa in vigore. La questione diventa più impattante se si pensa al consumo di riso come *baby food*, per il quale i limiti di legge sono ridotti proprio per tutelare questa tipologia di prodotto.

Particolarmente strategico è comunque disporre per il territorio risicolo una mappatura di questi due elementi, così da avere un'idea della loro distribuzione sul territorio e poter eseguire un controllo efficace.

### Introduzione

Con il termine "metalli pesanti" ci si riferisce agli elementi metallici con una densità relativamente alta e tossici anche a basse concentrazioni. Essi tendono ad accumularsi nell'organismo più velocemente di quanto si riescano ad espellere, risultando così estremamente pericolosi per la salute umana.

Cd e As sono due elementi che durante la coltivazione possono trasferirsi dai suoli al granello di riso. La pericolosità del Cd deriva dal fatto che può facilmente attraversare le barriere biologiche e mimare il comportamento dello zinco. L'esposizione acuta può causare neurotossicità e cancerogenicità.

L'As è un metalloide che nella sua forma inorganica trivalente o pentavalente (i-As) può essere facilmente assimilato e accumulato nei tessuti e nei fluidi corporei. Essendo molto simile al fosforo, esso può sostituirvisi in alcune reazioni metaboliche e causare problemi all'uomo. Diverse

evidenze hanno portato l’Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) a classificarlo come cancerogeno (Gruppo I).

Per tutelare la salute dei consumatori, la comunità europea ha stabilito i loro tenori massimi consentiti nei prodotti alimentari: il Regolamento (UE) 2021/1323 e il Regolamento (UE) 2015/1006 (che modificato il Regolamento CE 1881/2006) riportano rispettivamente i valori massimi di Cd e i-As nel riso e nei prodotti derivati, come visibile in Tabella 1.

**Tabella 1.** Tenori massimi consentiti nel riso per Cd e As. Per il cadmio sono riportati a confronto i limiti in vigore all’epoca del monitoraggio [1] e quelli in vigore a partire da settembre 2021 [2].

Prodotto	Cd	i-As
<i>Baby-food</i>	0.040 mg/Kg	0.10 mg/Kg
Riso lavorato	0.20 mg/Kg <sup>[1]</sup> ⇨ 0.15 mg/Kg <sup>[2]</sup>	0.20 mg/Kg
Riso semigreggio	0.20 mg/Kg <sup>[1]</sup> ⇨ 0.15 mg/Kg <sup>[2]</sup>	0.25 mg/Kg
Riso parboiled	0.20 mg/Kg <sup>[1]</sup> ⇨ 0.15 mg/Kg <sup>[2]</sup>	0.25 mg/Kg

In Italia la contaminazione del riso da metalli pesanti è un evento che si presenta raramente, grazie anche alle tecniche di gestione dell’acqua in risaia messa a punto dai risicoltori.

Per poter esaminare la situazione sul territorio, l’Ente Nazionale Risi ha predisposto su campioni provenienti dall’annata agricola 2019 un monitoraggio dei livelli di Cd e As, i cui risultati sono esposti tramite questo lavoro.

### Materiali e metodi

Sono stati analizzati 80 campioni di riso, scelti in modo tale che comprendessero le province a maggior coltivazione risiera, ovvero: Vercelli, Novara (Piemonte), Pavia, Milano, Mantova (Lombardia), Ferrara (Emilia-Romagna), Rovigo (Veneto) e Oristano (Sardegna).

Dopo macinazione (granulometria inferiore a 500 µm), per ognuno dei campioni sono state determinate le concentrazioni di Cd e i-As contenute sul campione tal quale.

#### **Analisi Cadmio (UNI EN 13805:2014, UNI EN 14083:2003).**

Si è proceduto pesando 0.5 g di campione nei contenitori in quarzo. A questi sono stati aggiunti 4 mL di HNO<sub>3</sub> 1+1 e 2 mL di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, così da effettuare la mineralizzazione in microonde, secondo il programma di digestione impostato. I mineralizzati sono quindi stati recuperati e diluiti in matracci da 25 mL prima di procedere alla determinazione. Le misure sono state eseguite mediante Assorbimento Atomico con fornetto di grafite (GFAAS, Perkin Elemer PinAAcle 900Z equipaggiato con fornetto per atomizzazione in tubi di grafite e correttore del fondo mediante effetto Zeeman).

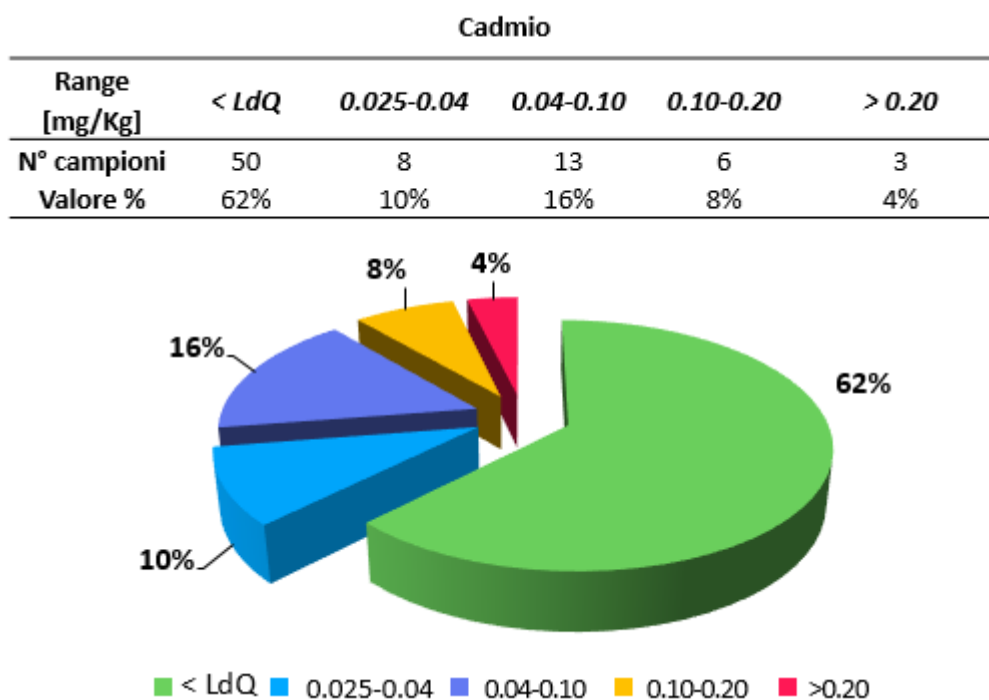
#### **Analisi Arsenico Inorganico (UNI CEN/TS 16731:2014).**

Si è proceduto all’estrazione dei campioni (1 g) aggiungendo 10 mL di HNO<sub>3</sub> 0.28 mol/L e ponendoli in blocco riscaldante per 90 minuti a 95°C. Dopo estrazione e raffreddamento, i campioni sono stati centrifugati (4500 g, 20 minuti a 10°C) e filtrati. Campioni e standard sono stati preridotti aggiungendo HCl concentrato e una soluzione riducente al 5% (w/v) di KI e 5% (w/v) di acido ascorbico, lasciandoli a temperatura ambiente per 90 minuti e portandoli poi a volume. Le misure sono state eseguite mediante Assorbimento Atomico con generazione di idruri (HGAAS, Perkin Elemer PinAAcle 500 equipaggiato con sistema FIAS per la produzione di idruri).

### Risultati e discussione

Sono di seguito riportati (Fig. 1 e Fig. 2) i risultati ottenuti sui campioni esaminati.

**Cadmio.** Il 72% dei campioni analizzati ha una concentrazione <0.04 mg/Kg (valore limite per i baby food). Solo il 4% invece risultava avere un valore superiore a quello massimo tollerato all'epoca del monitoraggio (pari a 0.20 mg/Kg).

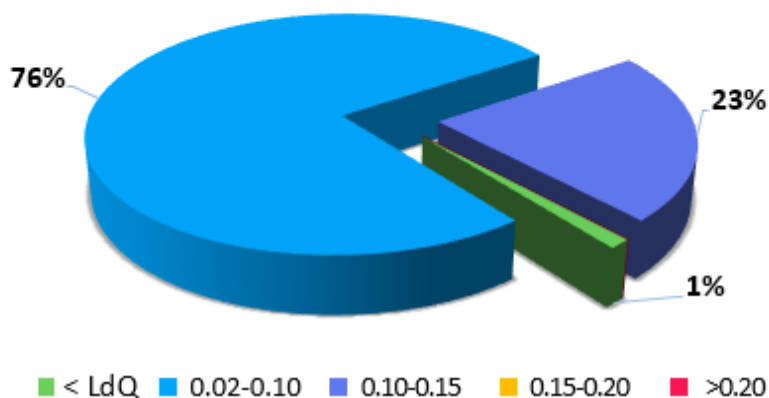


**Figura 1.** Distribuzione dei campioni secondo il livello di concentrazione di Cadmio, espresso in mg/Kg sul tal quale.

Oggi i range considerati potrebbero essere rivisti nell'ottica dei nuovi limiti di legge in vigore: in tal caso, la percentuale di campioni non conformi al limite di legge sarebbe pari al 6%.

**Arsenico inorganico.** Il 77% dei campioni ha esibito una concentrazione <0.10 mg/Kg, risultando dunque conformi come baby food. Nessuno dei campioni esaminati eccedeva invece il limite massimo consentito di 0.20 mg/Kg.

Arsenico Inorganico					
Range [mg/Kg]	< LdQ	0.02-0.10	0.10-0.15	0.15-0.20	> 0.20
N° campioni	1	61	18	0	0
Valore %	1%	76%	23%	0%	0%



**Figura 2.** Distribuzione dei campioni secondo il livello di concentrazione di Arsenico, espresso in mg/Kg sul tal quale.

## Conclusioni

Futuri monitoraggi di questi due metalli pesanti potrebbero fornire un buono strumento per fotografare annualmente il panorama risicolo italiano, oltre a tenere sotto controllo il delicato equilibrio fra le loro concentrazioni durante la pratica agronomica.

## Bibliografia

- Casali M., Simonelli C., Cormegna M. 2015. Metalli pesanti nel riso: aspetti chimici e analitici. *Il risicoltore*, novembre 2015.
- Ente Nazionale Risi 2008. Dossier scientifico: screening di identificazione dei rischi nella filiera del riso.
- Meharg A.A. 2016. Geographical variation in inorganic arsenic in paddy field samples and commercial rice from the Iberian Peninsula. *Food Chemistry*, 202: 356-363.
- Signes-Pastor A.J., Carey M., Carbonell-Barrachina A.A., Moreno-Jimènex E., Green A.J., Uraguchi S., Fujiwara T. 2015. Cadmium transport and tolerance in rice: perspectives for reducing grain cadmium accumulation. *Rice*, 5(1): 5.

**Frumento duro: risposta delle varietà al complesso della septoriosi in due ambienti del Lazio**  
A. Iori<sup>1\*</sup>, A. Belocchi<sup>1</sup>, M. Fornara<sup>1</sup>, O. Basili<sup>2</sup>, R. Mariotti<sup>3</sup>, A. Arcangeli<sup>1</sup>, F. Malagesi<sup>1</sup>,  
F. Quaranta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari (CREA-IT), Via Manziana 30, 00189 Roma (RM).

<sup>2</sup>IISS «V. Cardarelli» - Sezione di Agraria, Strada Provinciale Porto Clementino snc, 01016 Tarquinia (VT).

<sup>3</sup>Arsial - Azienda Sperimentale Dimostrativa di Tarquinia, Loc. Portaccia, 01016 Tarquinia (VT).

\*E-mail: [angela.iori@crea.gov.it](mailto:angela.iori@crea.gov.it)

### **Abstract**

The National durum wheat network in different Italian Regions was set up by Crea-IT of Rome in 2020-2021. In this study we analyse the data obtained in two experimental fields: Rome and Tarquinia (Viterbo) of Lazio region. The trials were carried out on 30 durum wheat cultivars grown in plots of 10 m<sup>2</sup>, according to a randomized block design. Bio-agronomic data were monitored during the growing season. Different abiotic and biotic stresses were observed in the fields and in particular a high infection of Septoria disease complex in the Rome field was reported. The resistant or susceptible behaviour of wheat varieties to various pathogens was evaluated. Plots were harvested at maturity then yield, 1,000 kernel weight, test weight and protein content were determined on all grain samples. The probable effect of the pathogens on some quantitative and qualitative traits was observed. The samples of Rome field showed values of grain yield, test weight and 1,000 kernel weight lower than the other locality. On the contrary, the protein content was higher in the first experimental field than in the Tarquinia field.

### **Riassunto**

Nell'annata 2020-21, nell'ambito della Rete nazionale di confronto varietale del frumento duro organizzata dal CREA - IT di Roma, sono state saggiate 30 cultivar presso due campi sperimentali del Lazio: Roma e Tarquinia (Viterbo). I genotipi in prova sono stati seminati in parcelle di 10 m<sup>2</sup>, secondo un disegno sperimentale a blocchi randomizzati. Diversi stress abiotici e biotici sono stati osservati nei due campi. I rilievi fitopatologici hanno consentito di monitorare le malattie fungine e di evidenziare un pesante attacco del complesso della septoriosi nella prima località di prova; inoltre, hanno permesso di valutare il comportamento resistente o suscettibile delle varietà di frumento ai vari agenti patogeni. Su tutti i campioni sono state determinate alcune caratteristiche quali-quantitative: resa, peso 1.000 cariossidi, peso ettolitrico e contenuto proteico. I risultati ottenuti da questo studio hanno mostrato un probabile effetto negativo esercitato dai patogeni del complesso della septoriosi sui primi tre parametri considerati, risultati decisamente più bassi nel campo di Roma rispetto a quello di Tarquinia. Al contrario, il contenuto proteico è risultato più alto a Roma.

### **Introduzione**

L'Italia è il primo Paese in Europa e il secondo nel mondo per la produzione di frumento duro. Tra le industrie agro-alimentari presenti nel nostro territorio, un ruolo primario viene certamente ricoperto da quelle molitoria e pastaia che, partendo dalla granella, con processi di prima e seconda trasformazione forniscono prodotti semilavorati (semola) e finiti (pasta). La pasta, della quale siamo i primi produttori mondiali, è il prodotto simbolo del *Made in Italy* ed è fondamentale per l'economia e l'immagine del nostro Paese, grazie agli elevati standard qualitativi, igienico-sanitari

e tecnologici che sono apprezzati in tutto il mondo. Al fine di garantire e migliorare ulteriormente le produzioni cerealicole, un'attenzione particolare deve essere rivolta al contenimento degli stress biotici. Le fitopatie del frumento (oidio, ruggine gialla, ruggine bruna, ruggine nera, septoriosi, stagonosporiosi, fusariosi della spiga, ecc.) possono infatti danneggiare anche gravemente le colture, con conseguente decremento quanti-qualitativo delle produzioni. I patogeni, agenti causali di tali malattie, infettano le piante a vari stadi fenologici riducendone l'accestimento, il numero e le dimensioni delle spighe e, quindi, il numero e il peso delle cariossidi; inoltre, alcuni funghi possono compromettere le caratteristiche igienico-sanitarie della granella, sintetizzando micotossine dannose per la salute dell'uomo e degli animali. Limitare gli effetti negativi delle malattie fungine sulle colture del frumento, mettendo in atto le migliori tecniche agronomiche, rappresenta una strategia indispensabile anche a seguito delle aumentate criticità provocate da condizioni meteorologiche estreme innescate dai cambiamenti climatici. L'attività di miglioramento genetico ci fornisce però nuove cultivar resistenti o tolleranti ai patogeni e con ottime caratteristiche quali-quantitative. Individuare tra i genotipi disponibili in commercio quelli più adatti per i nostri ambienti costituisce un impegno e una sfida continua, considerate anche le problematiche dovute all'evolvere dei patogeni in nuovi ceppi fungini particolarmente aggressivi (Quaranta *et al.*, 2021; Report FAO, 2017; Iori *et al.*, 2016).

Presso il CREA da vari decenni viene organizzata la Rete nazionale di confronto varietale del frumento duro, al fine di saggiare le cultivar migliori per la coltura nei nostri areali e fornire, quindi, risposte utili alle esigenze del mondo agricolo italiano (Quaranta *et al.*, 2021).

Il presente studio ha valutato in due ambienti del Lazio le caratteristiche agronomiche, quali-quantitative e la risposta di genotipi verso i principali patogeni fungini che colpiscono il genere *Triticum*.

## **Materiali e metodi**

Nell'annata 2020-21 nell'ambito della Rete nazionale di confronto varietale del frumento duro, organizzata dal CREA - Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari (CREA-IT) di Roma, sono state saggiate 30 cultivar seminate in parcelle di 10 m<sup>2</sup>, secondo un disegno sperimentale a blocchi randomizzati con tre ripetizioni, presso due campi sperimentali del Lazio: Roma (41° 58' N 12° 28' E; altitudine 20 m s.l.m.) e Tarquinia-VT (42° 16' N 11° 42' E altitudine 30 m. s.l.m.).

Le piante delle cultivar in prova sono state monitorate a diversi stadi di crescita per registrarne le caratteristiche fenologiche e morfologiche, rilevando inoltre la presenza e la diffusione delle principali malattie fungine dell'apparato epigeo e considerando sia l'altezza raggiunta dalla malattia sulla pianta sia la severità di attacco (Pasquini *et al.*, 2003). La scala 0 -100 utilizzata per i rilievi è stata espressa con i valori percentuali riportati in forma abbreviata (10% = 1, 20% = 2, ...90-100% = 9). Il comportamento delle singole cultivar è stato considerato: resistente (range 0-1), moderatamente resistente (range 2-3), moderatamente suscettibile (range 4-6) e suscettibile (range 7-9). Nel caso di sintomatologie dubbie, sono state preparate camere umide con i campioni infetti e sono stati identificati i patogeni fungini mediante osservazioni allo stereomicroscopio (Stemi 2000, Zeiss) e al microscopio ottico (Leica DMLB).

Alla raccolta su tutti i campioni sono stati determinati vari parametri quantitativi e qualitativi: resa, peso 1.000 cariossidi, peso ettolitrico e contenuto in proteine (INFRATEC 1241 Grain Analyzer, Foss).



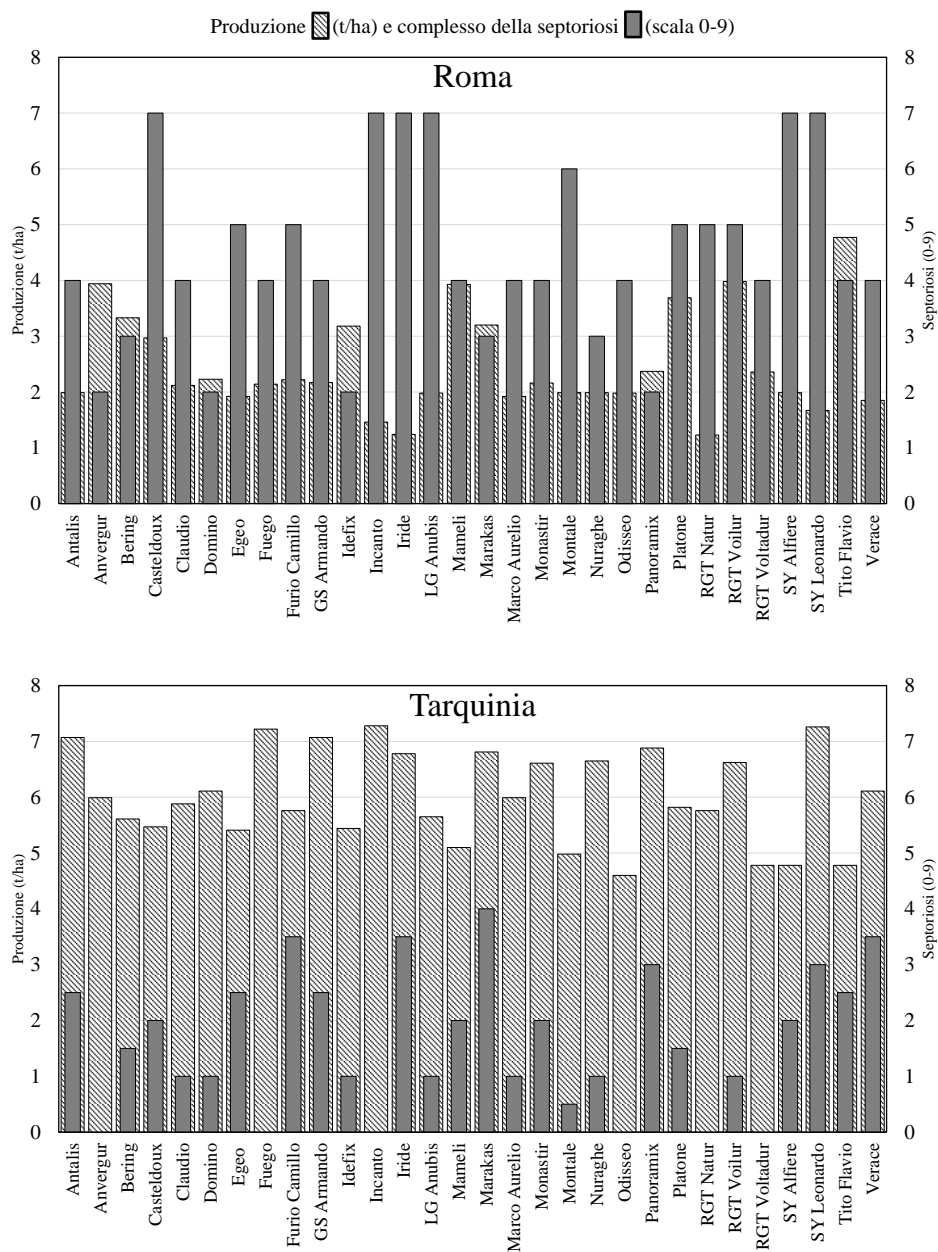
## Risultati

Nella primavera 2021 le condizioni metereologiche registrate nei due campi sperimentali di Roma e Tarquinia sono state piuttosto diverse. A Roma, il brusco abbassamento della temperatura nel mese di aprile ha compromesso il regolare svolgimento del ciclo vegetativo e, probabilmente, lo stress a cui le piante sono state sottoposte le ha rese più vulnerabili alle infezioni dei patogeni, in particolare agli agenti causali del complesso della septoriosi (*Zymoseptoria tritici* e *Parastagonospora nodorum*). La tipica sintomatologia è stata registrata su tutti i genotipi in prova e la maggior parte di essi ha mostrato un comportamento suscettibile o moderatamente suscettibile con infezioni anche del 70 %, come si evince dalla Figura 1. Le altre malattie, invece, non hanno destato preoccupazioni; infatti, è stata rilevata solo la ruggine nera che comunque è comparsa con sintomi lievi (valore medio 0,9) e al completamento del ciclo vegetativo delle piante (Tab. 1). Al contrario, a Tarquinia, località non lontana dal mare, le temperature meno rigide non hanno causato un danno evidente alle piante durante la fase di spigatura e anche le fitopatie (complesso della septoriosi, oidio, fusariosi e ruggine nera) sono state riscontrate solo su alcune varietà e in maniera piuttosto contenuta (Fig. 1 e Tab. 1).

Le migliori condizioni della coltura registrate in quest'ultima località hanno avuto un riscontro positivo sulla produzione che ha raggiunto un ottimo livello (6,01 t/ha) con un incremento di 1,13 t/ha rispetto alla media degli ultimi 5 anni, mentre nel campo sperimentale di Roma la resa è stata piuttosto scarsa (2,47 t/ha) con un decremento di 0,33 t/ha (Fig. 1, Tab. 2 e Tab. 3).

Analogamente, il peso ettolitrico medio è risultato nettamente superiore (84,1 kg/hL) nel campo di Tarquinia rispetto a quello di Roma (78,0 kg/hL), anche a confronto con quello di lungo periodo (81,2 e 80,3 kg/hL). Come si evince dalle tabelle 2 e 3, pure il peso 1000 cariossidi ha seguito la stessa tendenza con valori di 53,8 g e 41,5 g, rispettivamente per Tarquinia e Roma (dato medio degli ultimi anni: 49,9 g e 46,0 g).

Al contrario, il contenuto proteico medio della granella è stato più elevato a Roma (15,0%), in relazione a produzioni decisamente basse, rispetto a quello di Tarquinia (11,8%), caratterizzata invece da alte rese. Dal confronto del contenuto in proteine registrato nell'anno in studio con i dati medi degli ultimi anni per le due località (rispettivamente: 13,5% e 11,8%) si evidenzia un aumento del tenore proteico nel campo di Roma, mentre il valore ottenuto a Tarquinia è in linea con quello quinquennale. L'incremento delle proteine registrato nel campo di Roma trova spiegazione nella scarsa produzione ed è, inoltre, in accordo con quanto atteso dopo infezioni elevate causate di *P. nodorum* e *Z. tritici* (Dimmock e Gooding, 2002).



**Figura 1.** Gravità di attacco del complesso della septoriosi (in grigio scuro) sulle 30 cultivar a confronto con la produzione di granella (in grigio chiaro) registrate nelle due località di prova: Roma (in alto) e Tarquinia (in basso).

**Tabella 1.** Valori medi di gravità di attacco (scala 0-9) delle malattie fungine rilevate sulle 30 cultivar nelle 2 località di prova

	Complesso della septoriosi	Ruggine nera	Oidio	Fusariosi
	scala 0-9			
Roma	4,5	0,9	0	0
Tarquinia	1,6	0,2	0,7	0,5

**Tabella 2.** Valori medi dei principali caratteri agronomici e quali-quantitativi registrati nelle 2 località

	Spigatura da 1/4 gg	Danni da freddo 0-9	Altezza pianta cm	Produzione (13% umid.) t/ha	Peso ettolitrico kg/hL	Peso 1000 semi g	Proteine granella % s.s.
Roma	--	2,5	78,9	2,47	78,0	41,5	15,0
Tarquinoa	19	0	90,4	6,01	84,1	53,8	11,8

**Tabella 3.** Valori medi della stagione 2020-21 e del poliennio 2016-2020\*

Caratteri	Anno/poliennio	Tarquinoa	Roma
Produzione (t/ha)	<b>2021</b>	<b>6,01</b>	<b>2,47</b>
	2016-2020	4,88	2,80
Peso ettolitrico (kg/hL)	<b>2021</b>	<b>84,1</b>	<b>78,0</b>
	2016-2020	81,2	80,3
Peso 1000 cariossidi (g)	<b>2021</b>	<b>53,8</b>	<b>41,5</b>
	2016-2020	46,0	49,9
Proteine (% s.s.)	<b>2021</b>	<b>11,8</b>	<b>15,0</b>
	2016-2020	11,8	13,5

\* escluso il 2019

In conclusione, la sperimentazione ha permesso di registrare una differenza di produzione tra le due località di prova che è risultata più accentuata rispetto a quanto osservato nelle annate precedenti ed è probabilmente da attribuire anche al danno arrecato alla coltura dagli stress abiotici (ritorno di freddo nel mese di aprile) e biotici (attacco elevato di septoriosi e stagonosporiosi) nel campo di Roma.

### Lavoro svolto nell'ambito del Progetto RETI2020, finanziato dal MiPAAF.

#### Bibliografia

Dimmock J.P.R.E., Gooding M.J. 2002. The influence of foliar diseases, and their control by fungicides, on the protein concentration in wheat grain: A review. *The Journal of Agricultural Science*, 138(04): 349 - 366.

Iori A., Perenzin M., Pecchioni N., Virzì N., Dettori M., Martelli M., Petrini A., Randazzo B., Viola P., Bernabei F., Bersani E., Cacciatori P., Caprara F., Codianni P., Cristofori C., Fornara M., Licciardello S., Mamei L., Notario T. 2016. Malattie fungine sui frumenti, bilancio dell'annata 2015-2016. *L'Informatore Agrario*, 40: 51-56

Pasquini M., Pancaldi D., Casulli F., Iori A., Riccardi M., Gazza L., Cacciatori P., Faccini N., Corazza L., Santori A., Vallega V., Rubies-Autonell C., Delogu G. 2003. Malattie dei Cereali a paglia. Manuale per la diagnosi delle principali patologie e per il riconoscimento dei relativi agenti patogeni. Failli Editore.

Quaranta F., Arcangeli A., Basili O., Belocchi A., Bottazzi P., Mariotti A., Fabbrini L., Mariotti R., Malagesi F., Cacciatori P., Caprara F., Rossini F., Ruggeri R., Vecchiarelli V., Viola P., Iori A., Fornara M. (2021). Speciale grano duro - Centro Italia versante tirrenico. *L'Informatore Agrario*, 29: 44 - 46.

Report FAO 2017 <https://www.fao.org/news/story/en/item/469467/icode>

## Utilizzo di biostimolanti per la produzione di frumento biologico sostenibile e di qualità in Emilia-Romagna - BettER-Bio

M. Marchini<sup>1\*</sup>, S. Folloni<sup>2</sup>, C. Piazza<sup>1</sup>, E. Anchisi<sup>3</sup>, L. Lucini<sup>4</sup>

<sup>1\*</sup> Azienda Agraria Sperimentale Stuard, Strada Madonna dell' Aiuto 7/a, 43126 Parma (PR).

<sup>2</sup> Open Fields s.r.l., Strada Madonna dell' Aiuto 7/A, 43126, Parma (PR).

<sup>3</sup> Molino Grassi SpA, via Emilia ovest 347, Fraore, 43126 Parma (PR).

<sup>4</sup> Università Cattolica del Sacro Cuore, DISTAS, Via Emilia Parmense 84, 29122 Piacenza (PC).

\*E-mail: [m.marchini@stuard.it](mailto:m.marchini@stuard.it)

### Abstract

Agriculture is called to increase production in a context of environmental, social and economic sustainability associated with the risk linked to climate change and water depletion. This challenge can take advantage of the use of biostimulants, microorganisms and/or natural molecules that promote plant growth through an increase in nutrient use efficiency, stress tolerance and production quality. BettER-Bio project is based on the integrated use of innovative biostimulants of microbial and non-microbial origin, and decision support systems (DSS) to improve nutrient use efficiency and resistance to water stress. In the 2020-2021 agronomic season, this approach was tested on durum and bread wheat. On average, agronomic results showed good yields ( $4\pm 0.3$  t/ha) and test weights ( $82.8\pm 0.6$  kg/hl), and comparable proteins ( $11.5\pm 0.4$  % s.s.), plant heights ( $70.9\pm 2$  cm), 1,000 kernel weights ( $35.7\pm 5.1$  g), while no significant difference was found on grain quality parameters. Preliminary data under controlled conditions show a greater water-use efficiency for bread wheat in the presence of mycorrhization than control. Therefore, tests on wheat resistance to water stress will be carried out in greenhouse, while the use of biostimulants will be integrated by DSS *on farm* for optimizing interventions and reducing chemical inputs.

### Riassunto

Una priorità dell'agricoltura moderna è lo sviluppo di sistemi colturali sostenibili, che preservino la produzione in termini quali-quantitativi ed il reddito di impresa; tra questi, l'utilizzo di biostimolanti, microrganismi e/o molecole naturali che promuovano la crescita delle piante migliorando l'efficienza d'uso dei nutrienti e la resistenza allo stress. Il progetto BettER-Bio prevede una strategia che integri biostimolanti di origine microbica e non, fra loro complementari, per la coltivazione di frumento duro e tenero in biologico, integrato da sistemi di supporto alle decisioni (DSS). Nella stagione agronomica 2020–2021 l'uso di biostimolanti è stato testato su frumento tenero e duro. I rilievi agronomici hanno mostrato buone rese ( $4\pm 0.3$  t/ha), ottimi pesi ettolitrici ( $82.8\pm 0.6$  kg/hL), proteine ( $11.5\pm 0.4$  % s.s.), altezze ( $70.9\pm 2$  cm), peso 1.000 semi ( $35.7\pm 5.1$  g) medie delle piante confrontabili tra le tesi testate e nessuna differenza significativa tra le tesi in merito ai parametri qualitativi della granella. Tuttavia, dati preliminari in condizioni controllate evidenziano una maggiore efficienza d'uso dell'acqua per il frumento in presenza di micorrizzazione rispetto al controllo, soprattutto per grano tenero. Pertanto, nel secondo anno di sperimentazione saranno effettuate prove di resistenza a stress idrico in serra e prove *on farm* per valutare l'azione biostimolante in associazione a DSS.

### Introduzione

L'Italia è il principale produttore mondiale di grano duro insieme al Canada (International Grain Council) e l'Emilia-Romagna rappresenta una delle regioni più vocate con quasi 200,000 ha investiti (Regione Emilia-Romagna, 2020).

Una priorità dell'agricoltura moderna è lo sviluppo di sistemi colturali sostenibili, che preservino la produzione in termini quali-quantitativi ed il reddito di impresa. I biostimolanti sono di recente

emersi come una classe di prodotti (chiaramente distinti da fertilizzanti e agrofarmaci, anche a livello normativo), che agiscono sul metabolismo secondario della pianta, promuovendone la crescita e la risposta a condizioni limitanti. L'utilizzo dei biostimolanti in agricoltura è oggi promosso come strumento per una produzione agronomica sostenibile e di qualità. Con il termine "biostimolanti" si intende una classe di composti a base di microrganismi o estratti naturali che agiscono sul metabolismo secondario della pianta, promuovendone la crescita e la risposta a condizioni limitanti o la qualità delle produzioni. Tra quelli microbici, i più studiati sono i funghi micorrizici arbuscolari (micorrize), i funghi mutualisti endofiti come *Trichoderma* spp. ed i batteri rizosferici (PGPR – *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*). Tra le classi non microbiche, i biostimolanti più comuni sono gli idrolizzati proteici, gli estratti di alghe, il silicio, gli acidi umici e fulvici. Le micorrize promuovono lo sviluppo delle colture e la resilienza a stress biotici e abiotici, grazie ad un più efficiente accesso ad acqua e nutrienti (Smith e Read, 2008). L'attività delle micorrize è integrata con efficacia da quella dei batteri biostimolanti della rizosfera (Yakhin *et al.*, 2017). Gli idrolizzati proteici, infine, supportano la crescita della coltura e la resilienza a stress abiotici quali salinità e siccità (Colla *et al.*, 2015). In parallelo, i sistemi di supporto alle decisioni (DSS) sono oggi un efficace strumento di intelligenza artificiale per migliorare le performance quali-quantitative della produzione attraverso l'impiego di modelli previsionali e sensori specifici in grado di monitorare le condizioni ambientali delle colture e ottimizzare quindi il processo produttivo agricolo. Il progetto BettER-Bio, finanziato dalla regione Emilia-Romagna nell'ambito del Programma di Sviluppo Rurale 2014-2020 (Misura 16.1, Focus Area 3A), prevede una strategia che integri biostimolanti di origine microbica (micorrize, *Trichoderma* e batteri rizosferici) e non (idrolizzati proteici), fra loro complementari, per la coltivazione di frumento duro e tenero in regime biologico. L'utilizzo di biostimolanti è integrato da sistemi di supporto alle decisioni (DSS) per l'ottimizzazione degli interventi e la riduzione degli input chimici, promuovendo un'agricoltura smart e green.

## Materiali e metodi

Un trattamento integrato a base di biostimolanti [di cui un fungo micorrizico arbuscolare, un fungo endofita simbiote (*Trichoderma* spp.) e un idrolizzato proteico] è stato testato su frumento tenero [*T. aestivum* L., varietà Rebelde (GT)] e frumento duro [*T. turgidum* spp. *durum*, varietà Platone (GD)] coltivati in pieno campo in parcelle sperimentali a blocchi randomizzati presso l'Azienda Agraria Sperimentale Stuard (PR) in regime biologico, durante la stagione colturale 2020-2021. Il campo sperimentale è stato allestito su ristoppio al fine di stressare le differenze tra le tesi. In base a dati e sperimentazioni pregresse, le varietà frumento tenero Rebelde e frumento duro Platone sono state utilizzate per la sperimentazione in quanto ben adattabili alla coltivazione in regime biologico.

Per ciascuna varietà sono state testate 4 tesi: (i) gestione in biologico, con difesa e concimazione da calendario (T1, controllo); (ii) difesa secondo il calendario aziendale, riduzione del 33% degli apporti di nutrienti (T2, controllo negativo); (iii) applicazione di biostimolanti in associazione a difesa e concimazioni secondo il calendario aziendale (T3); (iv) applicazione di biostimolanti e riduzione del 33% degli apporti di azoto e fosforo (T4).

La semina è avvenuta nel mese di novembre 2020, impiegando una dose di biostimolante pari a 2 kg/ha. La concimazione è avvenuta a febbraio 2021 applicando un concime organico consentito in agricoltura biologica al 12% di azoto, mentre la trebbiatura è avvenuta nel mese di luglio 2021. Sono stati misurati i seguenti parametri: resa (t/ha), altezza della pianta (cm) e peso di 1000 semi (g). Il peso di 1000 semi è stato misurato utilizzando un contatore ottico di semi (Contador, Pfeuffer) ed il peso della granella è stato misurato con una bilancia di precisione (SBC 53, Scaltec Instruments).

È stata inoltre valutata la presenza di infezioni fungine, quali oidio, ruggini, *Septoria* spp. e fusariosi della spiga (Pasquini e Delogu, 2003).

La granella è stata caratterizzata dal punto di vista merceologico e qualitativo, considerando i seguenti parametri: peso ettolitrico (kg/hl), proteine (g/100 g di sostanza secca), umidità relativa (UR, %) [spettrofotometro NIR Infratec 1241 (FOSS Analytical)]; analisi farinografica [farinografo Brabender, valutando l'assorbimento di acqua (A, %) e stabilità dell'impasto (CD)] e analisi alveografica per grano tenero [alveografo G Model, Chopin, valutando la forza della farina (W,  $10^{-4}$  J), il rapporto P/L, dove P (mm) = tenacità dell'impasto; L (mm) = estensibilità]; Gluten Index (GI, Glutomatic, Perten) e colore della semola per grano duro (colorimetro Minolta). I dati sono stati elaborati con il software statistico SPSS Software Version 25.0 (SPSS Inc.); è stata condotta l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test di Duncan.

### **Risultati e discussione**

Il contenuto proteico dei cereali è un parametro importante che ne determina le proprietà tecnologiche (Mefleh *et al.*, 2019), mentre il peso ettolitrico è una misura del grado di riempimento delle cariossidi, che dipende dalle condizioni di crescita e maturazione, e può essere considerato un indice globale di qualità merceologica (D'Egidio e Carcea, 2013). Relativamente alla caratterizzazione merceologica e qualitativa dei frumenti, i parametri alveografici W e P/L sono fondamentali per la valutazione della resistenza e dell'estensibilità delle farine di frumento tenero (Huen *et al.*, 2018). Il settore della panificazione richiede valori di W elevati ( $>180 \cdot 10^{-4}$  J) combinati con un indice P/L bilanciato (0,40-0,50) (D'Egidio e Carcea, 2013). La qualità del frumento duro per la pastificazione dipende, invece, soprattutto da contenuto proteico, indice di giallo (correlato al contenuto in beta-carotene), e GI, che caratterizza la forza del glutine.

I rilievi agronomici hanno mostrato in media buone rese delle produzioni ( $\approx 4$  t/ha), ottimi pesi ettolitrici ( $\approx 82,8$  kg/hL), valori medi di proteine ( $\approx 11,5$  % s.s.), altezze ( $\approx 70,9$  cm), peso di 1000 semi ( $\approx 35,7$  g) confrontabili tra le tesi sperimentate per ciascuna varietà (Tab. 1 e Tab. 2). La caratterizzazione merceologica e qualitativa condotta sul frumento tenero ha mostrato buoni valori di W ( $\approx 230 \cdot 10^{-4}$ ) e P/L ( $\approx 0,6$ ). Non sono inoltre evidenti differenze significative tra le tesi e in confronto al controllo non trattato (Tab. 1).

L'analisi colorimetrica condotta su frumento duro ha mostrato un buon indice di giallo ( $b^* \approx 22,7$ ) e buoni GI ( $\approx 95$ ), confrontabili tra le tesi (Tab. 2).

Il dato circa la resistenza alle malattie, inoltre, deve essere verificato con il proseguo della sperimentazione, in quanto l'estrema siccità verificatasi durante la stagione agronomica 2020-2021, specialmente in primavera, non ha generato condizioni favorevoli allo sviluppo di patogeni.

**Tabella 8.** Parametri agronomici e qualitativi delle tesi sperimentate per frumento tenero Rebelde.

CAMPIONE	Parametri agronomici			Parametri qualitativi						
	t/ha al 13% di umidità	Altezza pianta (cm)	Peso 1000 semi (g)	Peso ettolitrico (kg/hl)	UR (%)	Proteine (% s.s.)	W (10 <sup>4</sup> J)	P/L	CD (min)	A (%)
GT-T1	4.1 ± 0.3a	70.1 ± 1.7a	31.6 ± 1.9a	83.6 ± 0.3a	11.6 ± 0.1a	12 ± 0a	211 ± 11a	0.6 ± 0a	16.3 ± 0.4b	52.3 ± 0.1a
GT-T2	3.9 ± 0.3a	70.7 ± 3.1a	30.6 ± 1.3a	83.3 ± 0.1a	11.5 ± 0.1a	11.9 ± 0ab	213.5 ± 8.5a	0.6 ± 0.1a	13.8 ± 1.3b	51.8 ± 0.1b
GT-T3	4.1 ± 0.3a	71.4 ± 0.4a	30.9 ± 1.7a	83.5 ± 0a	11.7 ± 0.1a	12.1 ± 0.1a	259 ± 46a	0.6 ± 0a	22 ± 2a	51.5 ± 0.2b
GT-T4	3.8 ± 0.2a	72.4 ± 1.1a	30.7 ± 0.6a	83.5 ± 0.2a	11.7 ± 0.2a	11.9 ± 0.1b	226.5 ± 13.5a	0.6 ± 0.2a	14.1 ± 2.7b	51.7 ± 0.1b

**Tabella 9.** Parametri agronomici e qualitativi delle tesi sperimentate per frumento duro Platone.

CAMPIONE	Parametri agronomici			Parametri qualitativi				
	t/ha al 13% di umidità	Altezza pianta (cm)	Peso 1000 semi (g)	Peso ettolitrico (kg/hl)	UR (%)	Proteine (% s.s.)	GI	Colore (b*)
GD-T1	4.2 ± 0.3a	72.1 ± 2.2a	40.7 ± 3.3a	83.9 ± 0.1b	11.8 ± 0.1a	12.1 ± 0.1a	95.8 ± 2a	22.4 ± 0.4a
GD-T2	4 ± 0.2a	70.2 ± 3.7a	40.1 ± 0.7a	84 ± 0.1b	12 ± 0.1a	11.9 ± 0.1b	94.2 ± 0.8a	22.7 ± 0.7a
GD-T3	4.3 ± 0.2a	70 ± 0.6a	40 ± 1.1a	84.4 ± 0a	11.7 ± 0.2a	12.2 ± 0.2a	96.5 ± 1.4a	23.2 ± 0a
GD-T4	4 ± 0.3a	70.4 ± 2.5a	41.4 ± 1.5a	84.4 ± 0.1a	11.7 ± 0.1a	12.1 ± 0.1a	94 ± 1.6a	22.7 ± 0.2a

GT, grano tenero cv Rebelde; GD, grano duro cv Platone; T1 - controllo; T2 - controllo negativo; T3 - tesi 3; T4, tesi 4; UR, umidità relativa. Analisi all'alveografo: W, forza della farina; P/L, rapporto tra P, resistenza alla deformazione del glutine ed L, estensibilità. Analisi al farinografo: CD: stabilità; A, assorbimento d'acqua. GI, Gluten Index. ANOVA, Duncan post-hoc test. Per ogni parametro, sia per GT che per GD, le lettere si riferiscono al confronto tra le medie delle diverse tesi.  $p < 0,05$ . SPSS Statistical Software Version 26.0, IBM SPSS Inc., USA).

Per quanto non generalizzabili e benché richiedano ulteriori conferme, i dati preliminari ottenuti evidenziano come con l'utilizzo dei biostimolanti sia possibile ridurre gli input chimici nella coltivazione del frumento duro e tenero senza compromettere le rese e la qualità agronomica dei frumenti.

Prove preliminari di confronto varietale su frumenti duri relative alla capacità di resistere allo stress idrico (misura della capacità fotosintetica e dell'efficienza d'uso dell'acqua) mostrano inoltre un grado di colonizzazione radicale da parte delle micorrize maggiore nel frumento duro con maggior tolleranza alla siccità, indicando differenze significative in termini di affinità verso la micorriza, fra le diverse varietà di una stessa specie. Pertanto, BettER-Bio nel secondo anno di sperimentazione effettuerà anche prove di resistenza a stress idrico in serra, secondo 3 tesi: (i) gestione in biologico, 100% disponibilità di acqua; (ii) gestione in biologico, 66% disponibilità acqua; (iii) gestione in biologico, 66% disponibilità acqua, applicazione biostimolanti. Prove *on farm* per valutare l'azione biostimolante in associazione a DSS verranno inoltre condotte in diversi siti sperimentali.

L'uso dei biostimolanti all'interno di una strategia integrata, che comprenda anche la scelta varietale e la gestione agronomica, potrebbe dunque essere la strategia vincente per migliorare la sostenibilità delle produzioni agrarie e, auspicabilmente, rendere l'agricoltura più allineata ai recenti trend di sviluppo e più resiliente alle sfide legate al cambiamento climatico.

## Bibliografia

- Colla G., Nardi S., Cardarelli M., Ertani A., Lucini L., Canaguier R., Rouphael Y. 2015. *Scientia Horticulturae*, 196: 28-38.
- D'Egidio M. G., Carcea, M. 2013. I Metodi Analitici Per La Misura Della Qualità Dei Cereali. *Molini d'Italia*, 6: 16-21.
- Huen J., Börsmann J., Matullat I., Böhm L., Stukenborg F., Heitmann M., Zannini E., Arendt E.K. 2018. Wheat flour quality evaluation from the baker's perspective: Comparative assessment of 18 analytical methods. *European Food Research and Technology*, 244: 535-545.
- International Grains Council. <https://www.igc.int/en/default.aspx>. Retrieved on May 2022

- Mefleh M., Conte P., Fadda C., Giunta F., Piga A., Hassoun G., Motzo R. 2019. From ancient to old and modern durum wheat varieties: Interaction among cultivar traits, management, and technological quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99: 2059-2067.
- Pasquini M., Delogu G. 2003. Malattie dei cereali a Paglia. *Manuale per la diagnosi delle principali patologie e per il riconoscimento dei relativi agenti patogeni*. Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Roma e Fiorenzuola d'Arda (PC).
- Regione Emilia-Romagna 2020. *Statistiche agrarie anno 2020*. Direzione Generale Agricoltura Caccia e Pesca Servizio Programmazione e Sviluppo Locale Integrato. <https://agricoltura.regione.emilia-romagna.it/produzioni-agroalimentari/pubblicazioni/statisticheagrarie-2020>
- Smith S.E., Read D.J. 2010. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press.
- Yakhin O.I., Lubyantsev A.A., Yakhin I.A., Brown P.H. 2017. Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. *Frontiers in Plant Science*, 7: 2049. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049>



## Indagine sul microbiota fungino presente in cariossidi di orzo prodotte nelle regioni dell'Italia Nord orientale e centrale

M. Calì<sup>1</sup>, E. Cappelletti<sup>1</sup>, M. T. Senatore<sup>1</sup>, A. Prodi<sup>1</sup>, D. Iraci Capuccinello<sup>2</sup>, I. Alberti<sup>3</sup>, M. Montanari<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Alma Mater Studiorum, Università di Bologna Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari DISTAL, Viale Fanin 40, 40127 Bologna (BO).

<sup>2</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Difesa e Certificazione (CREA-DC), Via Corticella 133, 40128 Bologna (BO).

<sup>3</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali (CREA-CI), Viale Amendola 82, 45100 Rovigo (RO).

<sup>3</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali (CREA-CI), Via di Corticella 133, 40128 Bologna (BO).

\*E-mail: [massimo.montanari@crea.gov.it](mailto:massimo.montanari@crea.gov.it)

### Abstract

*Fusarium* Head Blight (FHB) is one of the main plant diseases that affect cereals determining both qualitative and quantitative damages. Causal agents of this disease are a complex of species belonging to the genera *Fusarium* and *Microdochium*. Species of *Fusarium* genus are of particular concern due to the production of toxic compounds for both humans and animals.

In this study, we determined the fungal community in barley kernels (agricultural year 2018/2019) collected across 6 regions of central Italy (Emilia Romagna, Veneto, Toscana, Umbria, Marche, Abruzzo). The most detected genera were *Alternaria* (63%) and *Fusarium* (9%); the higher *Fusarium* incidence was observed in Veneto region (30,5%). In detail, 10 species of *Fusarium* were detected: *F. graminearum*, *F. poae*, *F. proliferatum*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. acuminatum*, FIESC (*Fusarium incarnatum – equiseti species complex*), *F. sporotrichioides*, *F. pseudograminearum*, *F. brachygibbosum*. The predominant *Fusarium* species was the FIESC complex, with an incidence of 90%, largely concentrated in Umbria.

### Riassunto

La fusariosi della spiga (FDS) è una delle fitopatie più diffuse e dannose per i cereali, in grado di causare riduzioni della produttività e della qualità delle cariossidi colpite. Agente eziologico di tale malattia è un *complex* di specie appartenenti ai generi *Fusarium* e *Microdochium*. Tuttavia il genere *Fusarium* desta più preoccupazioni in quanto è in grado di biosintetizzare composti tossici sia per l'uomo che per gli animali. Obiettivo del presente lavoro è stato quello di determinare la composizione della comunità fungina in cariossidi di orzo coltivate nell'annata agraria 2018/2019 e provenienti da 6 regioni italiane (Emilia-Romagna, Veneto, Toscana, Umbria, Marche, Abruzzo). I generi più incidenti sono risultati essere *Alternaria* (63%) e *Fusarium* (9%); la regione in cui il *Fusarium* ha avuto un'incidenza maggiore è stata il Veneto (30,5%). Il *complex* della fusariosi della spiga associato alle cariossidi di orzo analizzate, è risultato essere costituito da 10 specie: *F. graminearum*, *F. poae*, *F. proliferatum*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. acuminatum*, FIESC (*Fusarium incarnatum – equiseti species complex*), *F. sporotrichioides*, *F. pseudograminearum*, *F. brachygibbosum*. La specie di *Fusarium* predominante appartiene al complesso FIESC, con un'incidenza del 90%, isolato prevalentemente in Umbria.

### Introduzione

Il genere *Fusarium*, ordine *Hypocreales*, include un vasto numero di specie molto diffuse in natura, sia patogene che saprofiti; nel complesso rappresenta uno dei gruppi fungini micotossigeni più dannosi per la produzione agraria Logrieco *et al.* (2007). Il genere *Fusarium* è in grado di

indurre due sintomatologie diverse, ovvero la “Fusariosi del piede o mal del piede” e la “Fusariosi della spiga” (FDS).

FDS è causata da diverse specie del genere *Fusarium*, tra cui le principali sono: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae*, *F. poae* e *Microdochium nivale* Edwards (2007). Tra queste specie, *F. graminearum* è stato considerato potenzialmente il più grave sia in termini di perdita di resa che di produzione di micotossine Parry *et al.* (1995). Le prime manifestazioni della malattia consistono in piccole macchie brunastre su glume e talvolta sul rachide. L'alterazione può riguardare parte dell'infiorescenza e le spighe appaiono decolorate e disseccano precocemente; a tali sintomi si può associare anche una sterilità delle stesse Jackowiak *et al.* (2005) Tuttavia non si ha un passaggio del fungo da un nodo all'altro, dunque, l'infezione non può propagarsi tra le singole spighe Belli *et al.* (2012). La fusariosi della spiga è una delle malattie più difficili da gestire sull'orzo. Per una gestione ottimale si potrebbe pensare a un sistema di lotta integrata. Tra le misure di carattere agronomico, è importante la riduzione dell'inoculo sui residui colturali; altro aspetto da considerare è la rotazione con colture considerate non ospiti come soia, fagioli, girasole Dill-Macky e Jones (2000). Oltre alle misure di carattere agronomico è possibile ricorrere all'uso di agrofarmaci, specialmente quando l'andamento meteorologico appare favorevole all'instaurarsi della malattia Allegri *et al.* (2014). Di largo utilizzo sono fungicidi appartenenti alla classe delle strobilurine come l'Azoxystrobin, e altre molecole come il Tebuconazolo Pancaldi e Alberti (2006) (spesso associato con il Difenconazolo) e il Tetraconazolo. Altra molecola utilizzata è il Procloraz, un inibitore della biosintesi dell'ergosterolo, associato con Tebuconazolo e Tetraconazolo González-Domínguez *et al.* (2021). Particolare interesse suscita anche la lotta biologica, che prevede l'utilizzo di microrganismi quali *Trichoderma* (*T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. gamsii* Modrzewska *et al.* (2022)), *Bacillus* (*Bacillus amyloliquefaciens* Wang *et al.*, 2015, *Bacillus subtilis* Zalila-Kolsi *et al.*, 2016) *Clonostachys rosea* e *Cladosporium cladosporioides* Matarese *et al.* (2012).

### **Materiali e metodi**

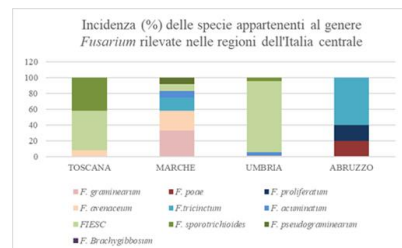
Gli obiettivi del presente lavoro sono stati: esplorare la diversità in termini di generi fungini presenti all'interno delle cariossidi di orzo; definire la composizione del complesso della fusariosi della spiga (FDS) mediante identificazione morfologica e molecolare delle specie di *Fusarium*. L'indagine è stata condotta su un totale di 35 campioni di orzo (annata agraria 2018/2019) raccolti in 6 regioni dell'Italia settentrionale e centrale (Veneto, Emilia-Romagna, Toscana, Umbria, Marche e Abruzzo). Ogni campione composto da 100 cariossidi, è stato disinfettato superficialmente con una soluzione di etanolo e ipoclorito di sodio in proporzione di 7:10:16 per limitare lo sviluppo di miceti saprofiti. Successivamente le cariossidi sono state poste su un substrato di crescita agarizzato, PDA (Potato Dextrose Agar), in 10 piastre Petri contenenti ognuna 10 cariossidi. Le piastre così preparate, sono state poste ad incubare alla temperatura di  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  al buio per 5 giorni. Trascorso il periodo di incubazione, è stata calcolata l'incidenza della presenza dei miceti sui campioni di semente espressa come % di semi infetti. Le colonie afferenti al genere *Fusarium* sono state purificate attraverso la tecnica della coltura monoconidica esotoposte ad estrazione del DNA genomico e sequenziamento del gene TEF-1 $\alpha$ , al fine di identificarne correttamente le specie.

### **Risultati e discussione**

Le osservazioni macroscopiche e microscopiche della morfologia delle colonie emerse dalle cariossidi analizzate, hanno permesso di identificare diversi generi fungini, quali: *Fusarium*,



particolare: *F. graminearum*, *F. poae*, *F. proliferatum*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. acuminatum*, FIESC (*Fusarium incarnatum – equiseti* species complex), *F. sporotrichioides*, *F. pseudograminearum*, *F. brachygibbosum*. FIESC è risultato il complesso predominante (incidenza 48%); la seconda specie più rilevata è stata *F. graminearum* (incidenza 38%).

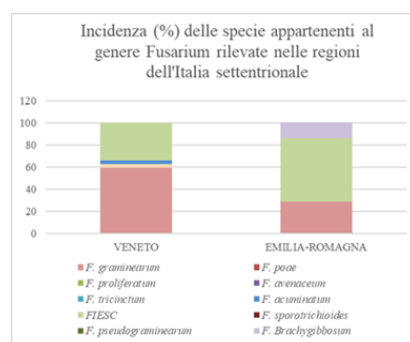


**Figura 4.** Incidenza (%) delle specie appartenenti al genere *Fusarium* rilevate nelle regioni dell'Italia centrale

Nella Figura 4 sono riportate le percentuali delle varie specie di *Fusarium* isolate nelle regioni dell'Italia centrale. In Toscana sono state rilevate 3 specie: FIESC 50%, *F. sporotrichioides* 42%, *F. avenaceum* 8%; le Marche hanno registrato la presenza di 6 specie: *F. graminearum* 33%, *F. avenaceum* 25%, *F. tricinctum* 17%, FIESC 8%, *F. acuminatum* 8%; l'Umbria ha riportato 4 specie: FIESC 90%, *F. acuminatum* 4%, *F. sporotrichioides* 4%, *F. avenaceum* 1%; infine in Abruzzo sono state isolate 3 specie: *F. tricinctum* 60%, *F. proliferatum* 20%, *F. poae* 20%. Nella Figura 5 sono riportate le percentuali delle varie specie di *Fusarium* isolate nelle regioni dell'Italia settentrionale. In Veneto sono state rilevate 5 specie: *F. graminearum* 59%, FIESC 34%, *F. avenaceum* 3%, *F. acuminatum* 3%, *F. tricinctum* 0,6; mentre in Emilia-Romagna 3 specie: FIESC 57%, *F. graminearum* 29%, *F. brachygibbosum* 14%.

Dai risultati ottenuti, è possibile affermare che la regione più colpita dal genere *Fusarium* è risultata essere il Veneto, con una predominanza di *F. graminearum*, seguito dall'Umbria, dove si è registrata una prevalenza del complesso FIESC. Questi risultati appaiono parzialmente in antitesi con quanto affermato nei vari studi effettuati su cariossidi di orzo e frumento, in cui le specie più frequenti risultavano essere *F. poae* e *F. avenaceum*, oltre a *F. graminearum* Beccari *et al.* (2018). Tale studio conferma l'emergenza di patogeni considerati fino ad oggi minori. L'elevata incidenza del complesso FIESC desta preoccupazione per l'eventuale rischio di contaminazione da parte di micotossine importanti, quali zearalenone (ZEA), zearalenolo (ZOH), monoacetoxyscirpenolo (MAS). Data la presenza anche di *F. graminearum*, non è da sottovalutare la possibile contaminazione da parte di micotossine quali T-2, HT-2, moniliformina (MON), enniatine (ENs), beauvericina (BEA), nivalenolo (NIV) e deoxynivalenolo (DON), con particolare attenzione verso quest'ultima. Infatti, considerando la sua elevata tossicità, il tenore massimo di DON è stato definito dalla Commissione Europea nel regolamento (CE) N. 1126/2007.

In conclusione, si può affermare che la corretta identificazione delle specie appartenenti a generi micotossigeni, tra cui *Fusarium*, è auspicabile al fine di ottenere corrette informazioni in merito all'evoluzione della patogenicità e produzione di micotossine, aspetto fondamentale per la salvaguardia della salute dell'uomo e degli animali.



**Figura 5.** Incidenza (%) delle specie appartenenti al genere *Fusarium* rilevate nelle regioni dell'Italia settentrionale

## Bibliografia

- Allegrì A., Astesano B., Blandino M., Capella A., Capriotti M., Meriggi P., Querzola P., Reyneri A. 2014. Valutazione dell'efficacia di tiofanate metile (enovit metil) nella difesa da *Fusarium* spp. agente della fusariosi della spiga del grano. *Giornate Fitopatologiche*, 2: 387-392.
- Beccari G., Colasante V., Tini F., Senatore M.T., Prodi A., Sulyok M., Covarelli L. 2018. Causal agents of *Fusarium* head blight of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) in Central Italy and their invitrobiosynthesis of secondary metabolites. *Food Microbiology*, 70: 17-27.
- Belli G., Casati P., Cortesi P., Faoro F., Iriti M., Saracchi M., Sardi P., Vercesi A. 2012. *Elementi di Patologia vegetale*, seconda edizione, 372-383.
- Dill-Macky R., Jones R.K. 2000. The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. *Plant disease*, 84(1): 71-76.
- Edwards S.G. 2007. Investigation of *Fusarium* mycotoxins in UK barley and oat production. Project Report No. 415. pp. 4-6.
- González-Domínguez E., Meriggi P., Ruggeri M., Rossi V. 2021. Efficacy of fungicides against *Fusarium* Head Blight depends on the timing relative to infection rather than on wheat growth stage. *Agronomy*, 11(8), 1549; <https://doi.org/10.3390/agronomy11081549>
- Jackowiak H., Packa D., Wiwart M., Perkowski J. 2005. Scanning electron microscopy of *Fusarium* damaged kernels of spring wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 98: 113-123.
- Logrieco A., Moretti A., Perrone G., Mulè G. 2007. Biodiversity of complexes of mycotoxigenic fungal species associated with *Fusarium* ear rot of maize and *Aspergillus* rot of grape. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1): 11-16.
- Matarese F., Sarrocco S., Gruber S., Seidl-Seiboth V., Vannacci G. 2012. Biocontrol of *Fusarium* head blight: Interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. *Microbiology*, 158: 98-106.
- Modrzewska M., Bryła M., Kanabus J., Pierzgałski A. 2022. *Trichoderma* as a biostimulator and biocontrol agent against *Fusarium* in the production of cereal crops: Opportunities and possibilities. *Plant Pathology*, 71(7): 1471-1485.
- Pancaldi D., Alberti I. 2006. "Effectiveness of EBI fungicides applied at anthesis stage against *Fusarium* head blight of wheat [*Triticum durum* Desf.; *Triticum aestivum* L.; Ergosterol Biosynthesis Inhibitors; Emilia-Romagna]." *Atti delle Giornate Fitopatologiche* (Italy).

## Selezione assistita da marcatori molecolari (sam) per le caratteristiche merceologiche e nutrizionali del riso

L. Borgo\*, A. Carnia, C. Simonelli

Ente Nazionale Risi, Centro Ricerche sul Riso, Laboratorio di Chimica Merceologia e Biologia Molecolare, Via San Vittore, 40, 20123, Milano (MI).

\*E-mail: [l.borgo@enterisi.it](mailto:l.borgo@enterisi.it)

### Abstract

Molecular Marker Assisted Selection (SAM) is a technique that involves the use of molecular markers that are closely associated with target loci in order to identify characters of interest; plants can therefore be characterized on the basis of their genotype rather than their phenotype allowing to accelerate the time of varietal selection and significantly increase the efficiency of breeding compared to the traditional one. The first protocol developed by the Molecular Biology Laboratory (LBM) is based on the detection of an 8 bp deletion in the gene encoding the enzyme Betaine Aldehyde Dehydrogenase (BAD2) involved in the metabolism of the molecule responsible for the aroma of rice, 2-acetyl-1-pyrrolin (2AP). When the gene encoding BAD2 is functioning, the synthesis of the enzyme is carried out and there is therefore degradation of 2AP, inversely if the gene is not working, the degradation of 2AP does not occur, resulting in the accumulation of aroma. The second protocol aims to characterize the gene associated with the content of amylose, an important factor in the quality of starch that is controlled by the waxy gene encoding the enzyme starch granule-bound synthase (GBSS). This gene has SNPs (SNP1 and SNP4) related to the amylose content, classifying the genotypes into 4 groups based on their amylose content.

### Riassunto

Per Selezione Assistita da Marcatori Molecolari (SAM) si intende una tecnica che prevede l'utilizzo di marcatori molecolari che sono strettamente associati ai loci bersaglio al fine di identificare caratteri di interesse; le piante possono quindi essere caratterizzate sulla base del loro genotipo piuttosto che del loro fenotipo consentendo di accelerare i tempi di selezione varietale e di aumentare notevolmente l'efficienza del *breeding* rispetto a quello tradizionale. Il primo protocollo messo a punto dal Laboratorio di Biologia Molecolare (LBM) è basato sulla rilevazione di una delezione di 8 bp nel gene che codifica per l'enzima Betaina Aldeide Deidrogenasi (BAD2) coinvolto nel metabolismo della molecola responsabile dell'aroma del riso, la 2-acetil-1-pirrolina (2AP). Quando il gene che codifica per la BAD2 è funzionante, la sintesi dell'enzima viene effettuata e vi è quindi degradazione della 2AP, inversamente se il gene non è funzionante non avviene la degradazione della 2AP con conseguente accumulo dell'aroma. Il secondo protocollo mira a caratterizzare il gene associato al contenuto di amilosio, fattore importante della qualità dell'amido che è controllato dal gene *waxy* che codifica per l'enzima amido sintasi legata ai granuli (GBSS). Questo gene presenta degli SNP (Polimorfismi a Singolo Nucleotide), SNP1 e SNP4, correlati con il contenuto in amilosio, classificando i genotipi in 4 gruppi in base al loro contenuto in amilosio.

### Introduzione

La SAM è una tecnica che accelera e semplifica la selezione delle migliori caratteristiche delle piante attraverso incroci ripetuti. Si fonda sul principio che la diversità biologica presente all'interno di una stessa specie offre la possibilità di individuare varietà sessualmente compatibili con quelle di interesse commerciale, in grado di esprimere caratteristiche particolari.

Inoltre, individua in una pianta la sequenza genica associata al carattere desiderato (ad esempio maggiore produttività, resistenza ai parassiti, migliori qualità nutritive, ecc.) ed effettua incroci mirati finché il gene non si è stabilizzato nelle nuove varietà.

Presso il LBM sono stati messi a punto e validati 2 metodi di prova per includere la SAM nei programmi di *breeding* dell'Ente Nazionale Risi (ENR) sia per la costituzione di varietà aromatiche sia per la costituzione di varietà con un determinato contenuto di amilosio: inferiore o superiore a 21% come caratterizzato al momento dell'iscrizione della varietà al Registro Nazionale Italiano delle varietà di specie agrarie, oppure in 4 gruppi ovvero waxy <5%, amilosio basso < 21%, amilosio intermedio da 21 a 26% e infine amilosio alto >26%.

Di seguito vengono presentati i risultati ottenuti nei diversi programmi di costituzione varietale.

### **SAM - Gene associato al carattere aroma**

Una varietà di riso aromatica è caratterizzata dal possedere un granello che emana un particolare profumo comparabile a quello del pop-corn per i consumatori occidentali e a quello della pianta del Pandano (*Pandanus amaryllifolius*) per i consumatori orientali.

La 2-acetil-1-pirrolina (2AP) è una delle molecole aromatiche responsabile dell'aroma del riso ed è prodotta da tutti i genotipi di riso.

L'enzima BAD2 è coinvolto nel metabolismo della 2AP in quanto è in grado di degradare quest'ultima. Nelle varietà aromatiche, il gene recessivo che codifica per la BAD2 presenta una delezione di 8 bp, risultando non funzionale.

Quattro primers, di cui due che si appaiano a sequenze comuni sia alle varietà aromatiche sia alle varietà non aromatiche ed esterni all'area in cui avviene la mutazione e due specifici a uno dei due possibili alleli sono stati disegnati. I due primers esterni, disegnati per agire come un controllo interno positivo, amplificano una regione di circa 580 bp in entrambi i genotipi aromatici (577bp) e non (585bp). Individualmente, questi primers esterni si associano con i primers interni per produrre ampliconi di differenti dimensioni, dipendenti del genotipo. I primers interni, INSP e IFAP, si appaiano solo con il genotipo specifico producendo ampliconi con il primer esterno, EAP e ESP rispettivamente.

L'uso di questi quattro primers in una PCR dà come risultato tre possibili esiti. In tutti i casi un amplicone di controllo positivo di circa 580 bp è sintetizzato tra ESP e EAP. Nel primo caso, un amplicone di 355 bp è prodotto (tra INSP e EAP) indicando che la varietà o il genotipo è omozigote dominante non aromatico. Nel secondo caso, un amplicone di 257 bp è sintetizzato (tra IFAP e ESP) determinando che la varietà o il genotipo è omozigote recessivo aromatico. Nel terzo caso, entrambi gli ampliconi di 355 bp e 257 bp sono sintetizzati dimostrando che il genotipo è eterozigote. (Bradbury, 2009)

Nei programmi di *breeding*, un individuo eterozigote non è aromatico ma l'eterozigosi può essere fissata in omozigosi recessiva nelle successive generazioni.

Nei prodotti alimentari, il risultato di eterozigosi indica che si tratta di una miscela tra una varietà non aromatica e una varietà aromatica.

La varietà aromatica Iarim, di cui l'ENR è costituente, è stata ottenuta tramite l'utilizzo della SAM che ha permesso di rilevare all'interno di alcune linee, ottenute tramite incrocio mirato finalizzato all'ottenimento di varietà aromatiche, i genotipi portatori del gene associato al carattere aroma.

### **SAM - Gene associato al carattere amilosio**

#### ***L'amido del riso***

L'amido di riso è composto da amilosio e amilopectina. Il contenuto di amilosio, fattore importante della qualità dell'amido, è controllato dal gene *waxy* che codifica per l'enzima GBSS. Questo gene presenta dei SNP che sono correlati con il contenuto di amilosio. In particolare, gli SNP1 e SNP4 presentano dei polimorfismi, indipendenti dall'interazione genotipo-ambiente, in grado di classificare i genotipi in 4 gruppi in base al loro contenuto di amilosio. Inoltre, uno dei



polimorfismi del SNP4 presenta un sito di restrizione dell'enzima *AccI*, che permette di classificare i genotipi in due gruppi: amilosio inferiore o superiore a 21%

La cariosside di riso è composta per l'80% di zuccheri complessi, principalmente cellulosa e amido. L'amido è organizzato in piccoli granuli nell'endosperma (90% del peso secco del granello nel riso lavorato) ed è il principale responsabile del comportamento del riso in cottura. È costituito da 2 grossi polimeri di glucosio: l'amilosio e l'amilopectina. L'amilosio è un polimero a struttura lineare, in proporzione variabile tra il 7 ed il 33% ed è quasi assente nei risi glutinosi o *waxy* mentre l'amilopectina, polimero a struttura ramificata, è il più rappresentato ed è contenuto fino a 98-99% nei risi glutinosi o *waxy*.

La qualità dell'amido dipende dal rapporto tra amilosio e amilopectina e dalla tipologia e distribuzione dei granuli di amido nella cariosside.

L'amilosio è considerato il principale componente dell'amido in grado di influenzare il comportamento alla cottura e alla masticazione del granello di riso; in effetti se il rapporto è a favore dell'amilosio, migliora la capacità dell'amido di assorbire acqua durante la cottura ed il granello mantiene una certa consistenza riducendo la collosità superficiale. Mentre se risulta favorita l'amilopectina si ottengono dei granelli con una notevole collosità successivamente alla cottura, non adatti per l'ottenimento di risotti o minestre.

Le diverse varietà di riso vengono classificate in base al contenuto di amilosio del granello come segue:

- risi glutinosi o *waxy* (0 - 4%)
- risi a contenuto di amilosio molto basso (5 - 9%)
- risi a contenuto di amilosio basso (10 - 19%)
- risi a contenuto di amilosio intermedio (20 - 25%)
- risi a contenuto di amilosio alto (>25%)

Le varietà italiane hanno un contenuto di amilosio variabile da un minimo del 12-15%, fino ad un limite massimo intorno al 25-27%

#### ***Selezione dei marcatori molecolari per la determinazione del contenuto di amilosio.***

Quattro marcatori molecolari di tipo SNP sono stati individuati nel gene WAXY il cui polimorfismo, secondo i dati riportati in letteratura, mostra una correlazione con il contenuto di amilosio. SNP1 e SNP4 mostrano variabilità tra le diverse varietà (polimorfici) mentre SNP2 e SNP3 non mostrano variabilità tra le diverse varietà.

Al fine di valutare l'efficacia dei marcatori selezionati, i dati molecolari ottenuti sono stati quindi confrontati con le misurazioni del contenuto di amilosio di 72 varietà. Tale analisi ha rivelato una correlazione significativa tra la combinazione dei polimorfismi relativi agli SNP1 e SNP4 ed il contenuto di amilosio del granello di riso.

- ✓ La combinazione A/G (allele SNP1/allele SNP4) è in grado di discriminare le varietà con un contenuto di amilosio altissimo (>26%);
- ✓ la combinazione C/G le varietà con contenuto di amilosio alto (21-26%);
- ✓ la combinazione A/T le varietà con un contenuto di amilosio inferiore a 21%;
- ✓ la combinazione C/T le varietà con contenuto di amilosio <5% (WAXY).
- ✓

La Tabella 1 evidenzia la correlazione significativa tra la combinazione dei polimorfismi relativi ai marcatori SNP1 e SNP4 ed il contenuto di amilosio del granello di riso.



**Tabella 1.** Correlazione tra la combinazione dei polimorfismi SNP1 e SNP4 e il contenuto di amilosio.

Varietà	Contenuto amilosio	SNP1	SNP4	Conclusione
<b>Castelmochi</b>	< 5	C	T	C + T: amilosio < 5% (waxy)
<b>Venere</b>	16.3	A	T	A + T: amilosio basso < 21%
<b>Arborio</b>	17.4	A	T	
<b>Perla</b>	19.3	A	T	
<b>Karnak</b>	21.5	C	G	C + G: amilosio intermedio (21 - 26%)
<b>Vialone Nano</b>	22.9	C	G	
<b>Artiglio</b>	25.3	C	G	
<b>Thaibonnet</b>	26.1	A	G	A + G: amilosio alto > 26%
<b>Fragrance</b>	26.4	A	G	

Per l'analisi del polimorfismo relativo allo SNP4, valido nel classificare i genotipi in due gruppi: amilosio inferiore o superiore a 21%, è possibile utilizzare la metodica descritta da Ayres *et al.* (1997) e utilizzata successivamente in altri studi (Bao *et al.* 2006). Tale metodica prevede l'amplificazione della regione contenente lo SNP con due primer esterni che amplificano un frammento di circa 254 bp. Questo frammento viene quindi digerito con l'enzima di restrizione *AccI*.

Il polimorfismo del marcatore molecolare SNP4 cade infatti all'interno del sito di riconoscimento di questo enzima: in presenza dell'allele G, il sito di riconoscimento rimane intatto e la digestione dell'amplificato genera pertanto due frammenti (~125-129 bp rispettivamente, risolvibili come doppia banda a seconda delle condizioni utilizzate per l'elettroforesi); i genotipi che presentano questo pattern elettroforetico sono genotipi il cui percentuale di amilosio è superiore a 21%. In presenza dell'allele T, il sito viene distrutto e l'amplificato non viene digerito; i genotipi che presentano questo pattern elettroforetico sono genotipi il cui percentuale di amilosio è inferiore a 21%.

I prodotti ottenuti vengono quindi analizzati tramite elettroforesi su gel di agarosio.

### Bibliografia

- Ayres N.M., McClung A.M., Larkin P.D., Bligh H.F.J., Jones CA, Park W.D. 1997. Microsatellites and a single-nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germ plasm. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 773-78.
- Bao J.S., Corke H., Sun M. 2006b. Microsatellites, single nucleotide polymorphisms and a sequence tagged site in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in nonwaxy rice (*Oryza sativa L.*). *Theoretical and Applied Genetics* 113: 1185-96.
- Bradbury L.M.T., Henry R.J., Jin Q., Reinke R.F., Waters D.L.E. 2005. A perfect marker for fragrance genotyping in rice. *Molecular Breeding* 16: 279-283.
- Bradbury L.M.T. 2009. Identification of the gene responsible for fragrance in rice and characterisation of the enzyme transcribed from this gene and its homologs. *PhD thesis, Southern Cross University, Lismore, NSW.*

## **Il Glifosato nella filiera cerealicola: accumulo, normativa, metodi analitici**

*M. Masci\*, T. Navigato, R. Caproni*

Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di Ricerca Alimenti e Nutrizione (CREA-AN), Via Ardeatina 546, 00178 Roma (RM).

\*E-mail: [maurizio.masci@crea.gov.it](mailto:maurizio.masci@crea.gov.it)

### **Abstract**

The decision by the European Commission on the permission to use the herbicide Glyphosate (initially scheduled for December 2022) has been postponed to summer 2023. This happens because the consultation carried out by EFSA and ECHA on the draft assessments of Glyphosate attracted an unprecedented number of comments, confirming the high level of interest in the issue. Glyphosate is a broad-spectrum herbicide, the most widely used in the world and currently the subject of a scientific controversy. In fact, IARC in 2017 classified it in Group 2A "probable carcinogen" while the European Union established that, based on the available information, there is no evidence for linking Glyphosate to cancer and therefore in December 2017 the permission to use was renewed for five years. On this herbicide there is still a need for in-depth studies, with specialized analytical laboratories able to detect its presence even in traces to monitor chronic exposures. The present article discusses the main chromatographic methods for the analysis of glyphosate in cereals. At the same time an overview of the current regulation in the various countries is provided together with the occurrence data observed in wheat, barley, soy, rye, and oats. Some considerations on climate, methods of use, and parts of the grain analyzed are made which may cause the detection of high levels in cereals.

### **Riassunto**

La decisione della Commissione Europea riguardo il permesso d'uso dell'erbicida Glifosato (inizialmente prevista per dicembre 2022) è stata rimandata all'estate 2023. Questo perché la consultazione lanciata da EFSA ed ECHA sulla valutazione del Glifosato ha generato un numero di commenti senza precedenti, confermando l'alto livello di interesse sulla questione. Il glifosato è un erbicida ad ampio spettro, il più usato al mondo ed al centro di una controversia scientifica. Infatti, lo IARC nel 2017 lo ha classificato nel Gruppo 2A "probabile cancerogeno" mentre l'Unione Europea ha stabilito che, sulla base delle informazioni disponibili, non c'è evidenza per collegare il Glifosato al cancro e perciò nel dicembre 2017 il permesso d'uso è stato rinnovato per altri cinque anni. Su questo erbicida vi è necessità di studi approfonditi, con laboratori analitici specializzati in grado di rilevare la sua presenza anche a livello di tracce per monitorare le esposizioni croniche. Il presente articolo descrive i principali metodi cromatografici per l'analisi del Glifosato nei cereali. Allo stesso tempo viene fornita una panoramica sulla regolamentazione vigente nei vari Paesi e sulle concentrazioni misurate nel grano, nell'orzo, nella soia, nella segale e nell'avena. Infine, vengono fatte alcune considerazioni sul clima, sui metodi d'uso e sulle parti del chicco analizzate, fattori in grado di elevare la concentrazione dell'erbicida nei cereali.

### **Introduzione**

Per il dicembre 2022 era prevista la decisione della Commissione Europea sul possibile rinnovo del permesso d'uso del Glifosato. Il Gruppo di Valutazione costituito ad hoc (Francia, Ungheria, Olanda e Svezia) aveva già espresso parere favorevole al rinnovo, anche sulla base degli studi proposti da un gruppo di aziende interessate. Tuttavia, nel corso della consultazione pubblica lanciata sul sito dell'EFSA un gruppo di ONG ha contestato la validità degli studi proposti e con una lettera aperta al Commissario Europeo ha espresso preoccupazione chiedendo di finanziare un'importante ricerca in corso presso l'Istituto Ramazzini di Bologna. Per di più i contributi e i commenti aggiuntivi ricevuti in questi ultimi mesi tramite le consultazioni EFSA ed ECHA sono

stati molto rilevanti. A questo punto tali informazioni aggiuntive dovranno essere esaminate a fondo dal Gruppo di valutazione sul Glifosato e per tale motivo l'EFSA e l'ECHA hanno rivisto la tempistica per le restanti fasi del processo di rivalutazione, rimandando il tutto all'estate del 2023 (EFSA 2022).

Il Glifosato è l'erbicida più usato, ma anche al centro di molti dibattiti. Infatti, lo IARC lo indica come "probabile cancerogeno" (IARC 2017) mentre per l'Unione Europea non ci sono prove evidenti. La necessità di ulteriori studi alimentari, ambientali e sanitari è palese, anche per accertare il destino del Glifosato dal campo alla tavola. Dai lavori disponibili emerge che il Glifosato tende ad accumularsi di più nelle farine integrali che in quelle raffinate, che nei climi freddi l'erbicida persiste nel suolo per molto tempo e che la sua concentrazione nel prodotto dipende strettamente dal periodo di trattamento, più è ravvicinato al momento della raccolta più la concentrazione è alta (Masci *et al.* 2020). Quest'ultimo punto è di attualità poiché l'erbicida è stato tradizionalmente sempre utilizzato in fase di presemina dei cereali per controllare le infestanti, ma recentemente il suo uso improprio in fase di preraccolta (soprattutto in Paesi dal clima non adatto) ha suscitato attenzione e polemiche.

L'analisi di laboratorio del Glifosato può essere impegnativa a causa di alcune particolari caratteristiche chimico-fisiche dell'analita come l'assenza di assorbanza all'UV, la bassa volatilità, l'alta idrofilicità. Le tecniche strumentali di elezione sono la cromatografia liquida via *FMOC-derivatization* (Simonetti *et al.* 2015) e la gas cromatografia via *TFAA-derivatization* (AOAC 2000) entrambe con Spettrometria di Massa come metodo di rivelazione. Le due tecniche vengono dettagliatamente descritte nell'articolo.

I dati di concentrazione osservati nei più comuni prodotti cerealicoli mostrano generalmente livelli di contaminazione al di sotto dei limiti attualmente stabiliti da alcune organizzazioni internazionali, ma sono proprio questi limiti ad essere messi in discussione da alcune ricerche, in quanto accusati di non essere sufficientemente protettivi della salute umana. Di seguito verranno esaminati i livelli massimi stabiliti dalle varie organizzazioni per il Glifosato nei cereali insieme con le concentrazioni misurate in grano, orzo, soia, segale e avena.

## **Materiali e Metodi**

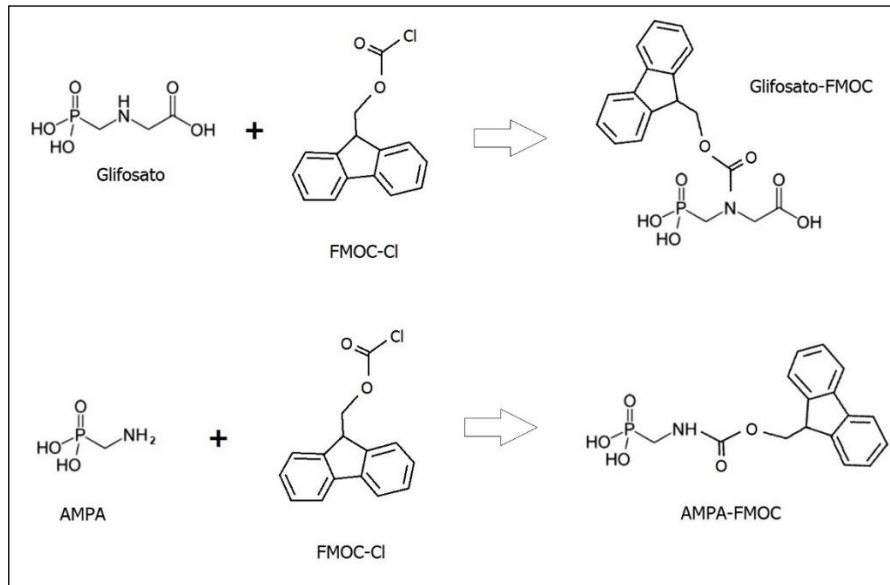
### ***Cromatografia liquida***

L'uso della Cromatografia liquida accoppiata alla Spettrometria di Massa è uno dei metodi principali per la determinazione nei cereali del Glifosato e del suo principale prodotto di degradazione, l'AMPA. La procedura prevede la derivatizzazione con 9-fluorenilmetil cloroformiato (FMOC-Cl) come schematizzato in Figura 1. La tecnica ha una sensibilità di 0,03-0,05 mg di Glifosato per kg di prodotto (Simonetti *et al.* 2015, Masci *et al.* 2020).

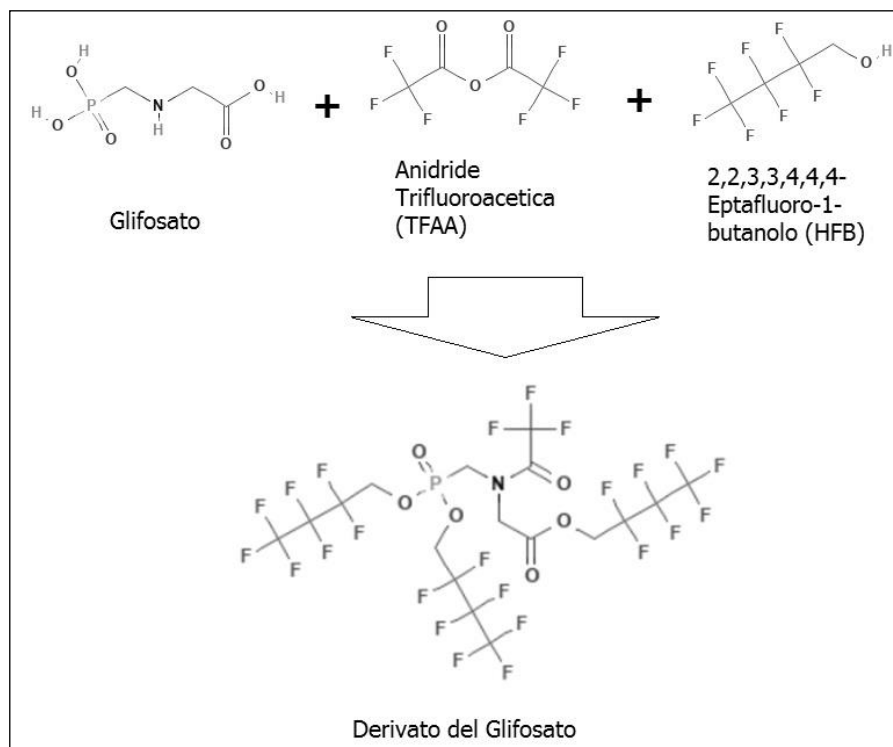
### ***Gas cromatografia***

La determinazione del Glifosato nei cereali per via gas cromatografica viene attuata tramite la *TFAA-derivatization* su cui si basa il Metodo Ufficiale AOAC (AOAC 2000). Il detector utilizzato è la Spettrometria di Massa in modalità SIM. La Figura 2 illustra la derivatizzazione in questione per il Glifosato. Per lo schema della derivatizzazione dell'AMPA si rimanda al lavoro di Masci *et al.* 2020. La sensibilità della GC-MS nell'analisi del Glifosato è di 0,05 mg/kg, quindi molto simile alla sensibilità della cromatografia liquida.

Va detto che la sensibilità delle due tecniche citate è largamente sufficiente per i limiti stabiliti da alcune organizzazioni internazionali (Tabella 1). Detti limiti sono però in disaccordo tra loro e giudicati inadeguati da più parti. È quindi probabile una loro ridefinizione. L'alta sensibilità della cromatografia-massa (30-50 ppb) è quanto mai opportuna per future ricerche su concentrazioni in tracce, a cui il consumatore potrebbe essere esposto cronicamente.



**Figura 1.** FMOCl-derivatization per l'analisi del Glifosato via LC/MS/MS



**Figura 2.** TFAA-derivatization per l'analisi del Glifosato via GC/MS/SIM

## Risultati e discussione

La Tabella 1 riporta i Limiti Massimi di Residuo di Glifosato nei cereali come stabiliti da diversi organismi internazionali ed aggiornati al 2019 (Xu *et al.* 2019). L'incertezza su questo argomento è evidente: vi sono casi in cui i Limiti Massimi di Residuo (LMR) differiscono anche di 300 volte fra i vari Enti (vedi il Miglio). Nel caso del grano la Commissione Europea stabilisce un LMR che è 3 volte inferiore a quello di EPA e FAO/OMS e nel caso del mais 5 volte inferiore. Il dibattito fra i vari Enti e le controversie sulla dose accettabile giornaliera sono ben riportati in letteratura (Simonetti *et al.* 2015). Questa mancanza di certezze si riflette sulle autorità preposte, con il citato ritardo nella decisione sul permesso di utilizzo, dando luogo ad una situazione a cui la ricerca

scientifiche dovrà dare delle risposte. Studi sulla sicurezza alimentare dovranno prendere in considerazione livelli anche molto bassi di assunzione e seguire le esposizioni croniche, per accertare l'eventuale effetto negativo o meno, sulla salute, di questo erbicida.

**Tabella 1.** Limiti massimi di residuo di Glifosato nei cereali (mg/kg) come stabiliti dalle organizzazioni internazionali (Xu *et al.* 2019)

Cereale	FAO/OMS	EPA (USA)	Commissione Europea	Health Canada
Orzo	30	30	20	10 15 <sup>a</sup>
Mais	5	5	1	3
Miglio	30	30	0,1	
Avena	30	30	20	15 35 <sup>a</sup>
Riso		0,1	0,1	
Segale	30	30	10	
Sorgo	30	30	20	
Teff	30	5		
Grano	30 20 (crusca)	30	10	5 15 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Valido per le frazioni di macinazione ad eccezione della farina

**Tabella 2.** Concentrazioni di Glifosato e AMPA misurate nei cereali e nei cibi correlati (mg/kg)

Cereali e cibi a base di cereali	Concentrazione del Glifosato	Concentrazione dell'AMPA	Riferimento
Orzo	<0,45	N/A	(Granby <i>et al.</i> , 2003)
Avena	<0,08	N/A	(Granby <i>et al.</i> , 2003)
Segale	<0,04	N/A	(Granby <i>et al.</i> , 2003)
Grano duro	0,421 (max.)	0,0247 (max.)	(Zoller <i>et al.</i> , 2018)
Grano	<0,13	N/A	(Granby <i>et al.</i> , 2003)
Grano	6,1-11,1	N/A	(Gélinas <i>et al.</i> , 2018)
Crusca di grano	<0,7	N/A	(Granby <i>et al.</i> , 2003)
Farina di grano	0,02	N/A	(Granby <i>et al.</i> , 2003)
Pane	0,0458 (max.)	tracce	(Zoller <i>et al.</i> , 2018)
Cereali per la colazione	0,291 (max.)	0,01 (max.)	(Zoller <i>et al.</i> , 2018)
Farina e miscele da forno	0,133 (max.)	tracce	(Zoller <i>et al.</i> , 2018)
Soia OGM	0,4-8,8	0,7-10	(Bøhn <i>et al.</i> , 2014)

N/A = non disponibile

In Tabella 2 sono riportati i livelli di Glifosato misurati nei cereali negli ultimi anni. Nel confronto *crusca di grano vs. farina di grano* osserviamo un livello di Glifosato nettamente più alto nella crusca (Granby *et al.* 2003). Stessa conclusione a cui sono giunti Zoller *et al.* (2018) nel loro studio. Nel caso del grano, come previsto, si sono osservati alti livelli (6,1-11,1 mg/kg) quando l'applicazione di Glifosato è stata effettuata a ridosso della raccolta (Gélinas *et al.* 2018). Si precisa che nell'UE non è autorizzata l'applicazione del Glifosato per trattare le colture prima della raccolta. Per quanto riguarda la soia OGM, Bøhn *et al.* (2014) hanno misurato concentrazioni non indifferenti di Glifosato e AMPA (fino a 10 mg/kg) quando l'erbicida è stato applicato durante il periodo di crescita. Studi sul campo dimostrano che il lavaggio dei chicchi di grano è in grado di ridurre (ma non azzerare) la concentrazione di Glifosato e che la conservazione, la fermentazione e, in particolare, la decorticazione riducono anch'esse il livello dell'erbicida (Xu *et al.*, 2019; Uygun *et al.*, 2005). È dimostrato, inoltre, che nei climi freddi il Glifosato persiste nel terreno per periodi molto lunghi, potendosi ritrovare anche l'anno successivo a quello della sua applicazione (Duke *et al.*, 2012).

### **Bibliografia**

- AOAC Official Method 2000.05, Determination of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid (AMPA) in Crops. Gas Chromatography with Mass-Selective Detection. First Action 2000.
- Bøhn T., Cuhra M., Traavik T., Sanden M., Fagan J., Primicerio R. 2014. Compositional differences in soybeans on the market: Glyphosate accumulates in Roundup Ready GM soybeans. *Food Chemistry*, 153: 207-215.
- Duke S.O., Lydon J., Koskinen W.C., Moorman T.B., Chaney R.L., Hammerschmidt R. 2012. Glyphosate effects on plant mineral nutrition, crop rhizosphere microbiota, and plant disease in glyphosate-resistant crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60:10375-10397.
- EFSA 2022, <https://www.efsa.europa.eu/en/news/glyphosate-efsa-and-echa-update-timelines> assessments (consultato il 21-09-2022)
- Gélinas P., Gagnon F., McKinnon C. 2018. Wheat preharvest herbicide application, whole-grain flour properties, yeast activity and the degradation of glyphosate in bread. *International Journal of Food Science and Technology*, 53: 1597-1602.
- Granby K., Johannesen S., Vahl M. 2003. Analysis of glyphosate residues in cereals using liquid chromatography-mass spectrometry (LC- MS/MS). *Food Additives and Contaminants*, 20: 692-698.
- IARC, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization "Some Organophosphate Insecticides and Herbicides". IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Volume 112, 2017.
- Masci M., Navigato T., Caproni R. 2020. Glifosato residuo nei cereali: generalità e aspetti chimico-analitici. *Tecnica molitoria*, 71: 41-55.
- Simonetti E., Cartaud G., Quinn R.M., Marotti I., Dinelli G. 2015. An Interlaboratory Comparative Study on the Quantitative Determination of Glyphosate at Low Levels in Wheat Flour. *Journal of AOAC International*, 98: 1760-1768.
- Uygun U., Koxsel H., Atli A. 2005. Residue levels of malathion and its metabolites and fenitrothion in post-harvest treated wheat during storage, milling and baking. *Food Chemistry*, 92: 643-647.
- Xu J., Smith S., Smith G., Wang W., Li Y. 2019. Glyphosate contamination in grains and foods: An overview. *Food Control*, vol. 106 article number 106710.
- Zoller O., Rhyn P., Rupp H., Zarn J.A., Geiser C. 2018. Glyphosate residues in Swiss market foods: monitoring and risk evaluation. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 11: 83-91.

## **AGENT: dallo studio delle risorse genetiche contenute in un network di banche del germoplasma europee nuove prospettive per la sostenibilità**

*P. Vaccino<sup>1\*</sup>, F. Sansoni<sup>1</sup>, A. Volante<sup>2</sup>, N. Pecchioni<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di Ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali (CREA-CI), Strada Statale 11 per Torino km 2,5, 13100 Vercelli (VC).

<sup>2</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di Ricerca Orticoltura e Florovivaismo (CREA-OF), Corso degli Inglesi 508, 18038 Sanremo (IM).

\*E-mail: [patrizia.vaccino@crea.gov.it](mailto:patrizia.vaccino@crea.gov.it)

### **Abstract**

The AGENT (Activated Genebank NeTwork) project, funded by the EU's research and innovation programme Horizon 2020, aims to unlock the potential contained in the genebanks by using FAIR international data standards and an open digital infrastructure for the management of plant genetic resources. The research program is well-structured and is focused on a panel made of 6700 common wheat and 5200 barley accessions, genotyped by high throughput technologies and phenotyped for agronomic and physiological characters, in order to identify important loci through Genome Wide Association Studies (GWAS) and to develop models for the prediction of the breeding value through Genomic Selection (GS).

### **Riassunto**

Il progetto AGENT, finanziato dall'Unione Europea nell'ambito del programma di ricerca e innovazione Horizon 2020, ha l'obiettivo ambizioso di sbloccare il potenziale genetico contenuto nelle banche del germoplasma, trasformandole da "semplici" depositi di semi a centri attivi e altamente interconnessi di risorse digitali, facilmente consultabili da tutti gli interessati.

Il programma di ricerca è molto articolato ed è focalizzato su un panel di 6700 accessioni di frumento tenero e 5200 di orzo, genotipizzate con strumenti ad alta processività e fenotipizzate per caratteri agronomici e fisiologici, al fine di identificare loci responsabili di tali caratteri mediante analisi di associazione (GWAS) e sviluppare modelli di predizione del valore agronomico mediante Selezione Genomica (GS).

### **Introduzione**

La sicurezza alimentare sta diventando un tema di primaria importanza negli ultimi anni, e il problema è esacerbato dal cambiamento climatico, che potrebbe mettere in difficoltà la produzione agricola (Duchenne-Moutien & Neetoo, 2021). La ricerca di soluzioni per affrontare il problema è ampia, e spazia da un uso più efficiente delle risorse, al miglioramento della qualità del suolo, al riciclo della CO<sub>2</sub>, al miglioramento genetico delle varietà coltivate (Horton *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021; Long *et al.*, 2015; Rotasperi *et al.*, 2020). Lo sfruttamento efficiente delle risorse genetiche disponibili è uno dei mezzi più promettenti ed è questo l'approccio del progetto AGENT (*Activated Genebank NeTwork*): sbloccare il potenziale custodito nelle banche del germoplasma, un vero tesoro di informazioni genetiche. Costituite sin dagli anni '20 del secolo scorso con l'intento di conservare la diversità genetica delle specie per le future generazioni, le banche del germoplasma sono oggi più di 1700, e conservano più di 7 milioni di accessioni. Spesso, tuttavia, anche a causa delle diverse modalità di gestione nei vari paesi, il potenziale genetico contenuto

nelle banche rimane poco conosciuto e non fruibile ai più, nonostante il valore di queste istituzioni sia ampiamente riconosciuto (Vernooy *et al.*, 2017).

## Il progetto AGENT

Il progetto AGENT mira a costituire una rete europea di banche del germoplasma altamente interconnesse tramite un'infrastruttura digitale di tipo aperto, realizzata *ad hoc* dagli esperti bioinformatici partecipanti. In questo modo tali banche saranno trasformate da "semplici" depositi di semi a centri attivi di risorse digitali, facilmente consultabili e quindi utilizzabili in programmi di miglioramento genetico da parte di chiunque ne sia interessato. Gli obiettivi del progetto sono schematizzati nella Figura 1 e le attività sono focalizzate su frumento tenero ed orzo, ma in futuro le nuove tecnologie e i processi di gestione dei dati potranno essere applicati ad altre collezioni vegetali.



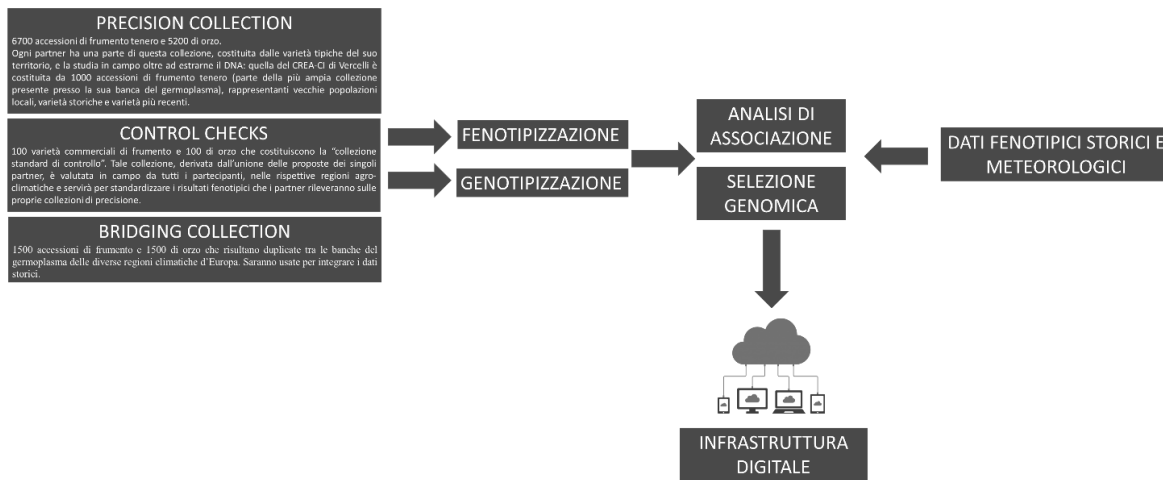
**Figura 1.** Schematizzazione dei principali obiettivi del progetto AGENT.

Il partenariato è costituito da 19 istituti di ricerca, coordinati dall'IPK di Gatersleben, in Germania - uno dei maggiori centri europei di ricerca sui vegetali e ospitante la più vasta banca del germoplasma europea; il progetto coinvolge però, in una rete di valutazione dei progressi pubblica e privata, molti *stakeholders*, nello specifico ditte sementiere e agricoltori.

L'articolazione del progetto è rappresentata graficamente nella Figura 2. Una delle parti centrali è l'analisi genotipica e fenotipica di quella che è stata definita *Precision Collection*, rappresentata da 6.700 accessioni di frumento tenero (*Triticum aestivum*) e 5.200 di orzo (*Hordeum vulgare*), e alla cui costituzione ogni partner ha contribuito con circa 1000 accessioni. Nei primi due anni del progetto ogni partner ha provveduto dapprima a sviluppare, e in seguito a moltiplicare, per ogni accessione della relativa *Precision Collection*, una linea SSD, ovvero derivante da un singolo seme (*Single Seed Descent*), per mantenere alta la purezza dei dati. Durante la stagione di crescita, le linee SSD sono state caratterizzate per data di spigatura, data di fioritura e altezza e, in seguito a raccolta, per peso dei semi. Al contempo si è provveduto all'estrazione del loro DNA, che è in corso di genotipizzazione mediante DArTseq. I risultati dell'analisi saranno utilizzati, insieme ai dati fenotipici raccolti, per identificare tratti genomici responsabili per caratteri agronomici importanti mediante GWAS



(*Genome Wide Association Analysis*) e per sviluppare modelli di predizione del valore agronomico mediante *Genomic Selection* (GS).



**Figura 2.** Rappresentazione schematica delle attività del progetto AGENT.

Considerata l'influenza dell'ambiente sull'espressione di molti caratteri agronomici è facile immaginare la variabilità di dati che scaturiranno dalla valutazione dei materiali nelle diverse zone agro-climatiche in cui i partner si trovano ad operare. Per poter confrontare i dati e standardizzare le analisi bioinformatiche successive, si sono quindi identificati degli *Standard Checks*, ovvero 100 varietà commerciali di frumento e 100 di orzo che tutti i partner, ogni anno, allevano e caratterizzano in campo insieme alla propria *Precision Collection* (Fig. 3). Vi è poi una collezione ponte, la *Bridging Collection*, costituita da 1500 accessioni di frumento e 1500 di orzo che risultano duplicate tra le banche del germoplasma delle diverse regioni climatiche d'Europa. Tale collezione sarà genotipizzata ed utilizzata per integrare i dati fenotipici storici raccolti dai partner sulle rispettive collezioni. Un ulteriore aspetto interessante nel progetto consiste infatti nell'integrazione dei dati fenotipici raccolti durante gli anni del suo svolgimento con quelli storici, il cui potenziale informativo risulta spesso sottoutilizzato, e con i relativi dati meteorologici.



**Figura 3.** Scorcio del campo del CREA-CI di Vercelli. Sulla sinistra le parcelle dei *Control Checks* (orzo e frumento); a destra le file singole della *Precision Collection*.

Il CREA-CI, oltre ad aver contribuito con 1.000 varietà di frumento tenero alla *Precision Collection*, è responsabile del *task* riferito all'attività di GWAS. Nell'ambito di tale *task* ha sviluppato, insieme con i bioinformatici di ICARDA, uno dei partner, la *pipeline* per la gestione dell'intero processo di analisi di associazione dei dati genotipici e fenotipici derivanti delle oltre 11000 accessioni in esame.

All'interno di AGENT si inseriscono anche le attività di EVA (*European Evaluation Network*; <https://www.ecpgr.cgiar.org/european-evaluation-network-eva>), una rete europea che coinvolge istituzioni pubbliche e private con l'intento di promuovere la valutazione delle risorse genetiche vegetali usando protocolli standard condivisi e di implementare la digitalizzazione l'armonizzazione, la disponibilità e lo scambio di dati di valutazione passati e presenti. Un'ulteriore connessione è stata creata tra AGENT e Rete Semi Rurali (RSR; <https://rsr.bio/>), associazione che promuove un uso collettivo delle risorse agricole. Il CREA-CI, nel secondo anno del progetto AGENT, ha provveduto, alla moltiplicazione di circa 600 accessioni (orzo, frumento duro e frumento tenero) che saranno distribuiti ai partner EVA ed RSR per le semine 2022.

Attraverso le attività quinquennali del progetto AGENT una buona parte del "tesoro" di informazioni genetiche conservato nelle banche del germoplasma europee potrà essere pienamente sfruttato per far fronte alle numerose sfide che ci attendono, in primo luogo il fabbisogno alimentare di una popolazione mondiale in costante crescita, evitando l'aumento dell'uso di suolo e riducendo gli input chimici ed energetici, come richiesto dal mercato, dalle politiche agricole, e dalla società.

### **Ringraziamenti**

Si ringraziano S. Di Siena, L. Sena e M. Marangon per il supporto nelle attività di campo e G. Petruzzino per l'assistenza nelle analisi bioinformatiche.

Il progetto AGENT (Horizon 2020, Grant Agreement No. 862613) è consultabile al sito <https://www.agent-project.eu>

### **Bibliografia**

- Duchenne-Moutien R. A., Neetoo H. 2021. Climate change and emerging food safety issues: A review. *Journal of Food Protection*. 84(11): 1884-1897.
- Horton P., Long S. P., Smith P., Banwart S. A., Beerling, D. J. 2021. Technologies to deliver food and climate security through agriculture. *Nature Plants*, 7(3): 250-255.
- Li S., Zhang C., Li J., Yan L., Wang N., Xia L. 2021. Present and future prospects for wheat improvement through genome editing and advanced technologies. *Plant Communications*, 2: 100211.
- Long S. P., Marshall-Colon A., Zhu X. G. 2015. Meeting the global food demand of the future by engineering crop photosynthesis and yield potential. *Cell*, 161(1): 56-66.
- Rotasperti L., Sansoni F., Mizzotti C., Tadini L., Pesaresi P. 2020. Barley's second spring as a model organism for chloroplast research. *Plants*, 9(7): 1-25.
- Vernooy R., Sthapit B., Otieno G., Shrestha P., Gupta A. 2017. The roles of community seed banks in climate change adaptation. *Development in Practice*, 27(3): 316-327.

## **Le lavorazioni conservative in sostituzione dell'aratura: effetto sulla qualità tecnologica e sanitaria nei cereali**

*M. Blandino<sup>\*</sup>, L. Capo, M. Scapino, V. Scarpino, F. Vanara, A. Reyneri*

DISAFA, Università di Torino, Largo Paolo Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO).

\*E-mail: [massimo.blandino@unito.it](mailto:massimo.blandino@unito.it)

### **Abstract**

In recent years, also in Europe, the role in minimum tillage as an alternative of conventional plowing has increased in cereal cropping systems. The main benefits of the adoption of these practices, are related to the reduction in fuel and labor costs and the possibility of accessing agri-environmental financing. These practices can help reduce greenhouse gas emissions and therefore improve the carbon footprint values of food products, an aspect that is increasingly requested by consumers and therefore by the supply chain. However, the absence of plowing and the presence of crop residues on the soil surface can make it more difficult to manage the disease control. Furthermore, information on the adoption of these practices on the technological quality of cereals is still limited. This contribution evaluates the application of different minimum tillage techniques in place of plowing on the yield and qualitative traits (mycotoxin contamination, technological quality according to the end use) of bread wheat and maize for dry milling, on the basis of a series of field experiments carried out from 2012 to 2021. The adoption of minimum tillage, for wheat, implies negative impacts on sanitary and rheological quality and therefore within the supply chains it will be necessary to implement agronomic practices (fertilization, disease control) in order to minimizing these critical issues. On the contrary, in maize the greatest limitations in adopting minimum tillage are related to agronomic and yield gap, while the effect on qualitative traits is less effective.

### **Riassunto**

Negli ultimi anni, anche nei sistemi produttivi cerealicoli europei è cresciuta l'attenzione per le lavorazioni conservative, in alternativa alla convenzionale aratura, con vantaggi economici per una riduzione dei costi di carburante e manodopera e la possibilità di accedere a finanziamenti agroambientali. Queste pratiche possono contribuire a ridurre le emissioni di gas serra e quindi i valori di impronta carbonica dei prodotti alimentari, aspetto sempre più richiesto dai consumatori e quindi dalla filiera produttiva. Tuttavia, l'assenza dell'aratura e la presenza dei residui colturali in superficie possono rendere più difficile la gestione della difesa. Inoltre, sono ancora limitate le informazioni dell'adozione di queste pratiche sulla qualità tecnologica dei cereali. Questo contributo valuta l'applicazione di differenti tecniche di minima lavorazione in sostituzione all'aratura sugli aspetti produttivi e qualitativi (contaminazione da micotossine, qualità tecnologica in funzione della destinazione d'uso) di frumento tenero e mais, sulla base di una serie di sperimentazioni di campo condotte dal 2012 al 2021. L'adozione di minime lavorazioni, per il frumento, implica impatti negativi sulla qualità sanitaria e reologica superiori a quelli produttivi e pertanto nell'ambito delle filiere sarà necessario attuare quelle pratiche volte a minimizzarne gli effetti. Al contrario, nel mais le maggiori limitazioni dell'adozione di queste pratiche sono di tipo agronomico e produttivo e poco collegate alle esigenze qualitative di filiera.

### **Introduzione**

L'attenzione per pratiche di minima lavorazione o non lavorazione del terreno in alternativa all'aratura nei seminativi, già ampiamente adottata in molti areali di coltivazione più estensivi, è cresciuta recentemente anche nel nostro Paese. Con minima lavorazione si intende una lavorazione che non preveda un rivoltamento profondo del terreno, ma che interessi solo lo strato superficiale con una profondità generalmente non superiore ai 15 cm.

A livello mondiale la superficie soggetta a queste modalità di lavorazione è stimata complessivamente pari all'16% dei terreni arabili (FAO, 2020), sebbene questa sia principalmente gestita con la tecnica della semina su sodo o diretta (Derpsch *et al.*, 2010).

Secondo i dati forniti dall'ISTAT, in Italia la minima lavorazione e la semina su sodo interessano circa l'8% della superficie a seminativi, in particolare nelle aziende di maggiori dimensioni e per la coltivazione dei cereali autunno vernini. È crescente però l'adozione di minime lavorazioni anche su mais, in particolare attraverso alla tecnica dello strip tillage, o lavorazione a fasce (Battisti *et al.*, 2022). Il crescente ricorso alle modalità di minima lavorazione è in primo luogo collegato alla necessità delle aziende agricole di ridurre i costi di coltivazione, per poter mantenere dei margini economici positivi nei confronti di un mercato con prezzi instabili e bassi per la forte concorrenza con le materie prime di provenienze estera. La stima di riduzione del consumo di carburante con l'adozione di lavorazioni semplificate è compresa tra il 50 e il 80% (Soane *et al.*, 2012), alle quali si deve sommare anche una contrazione del carico di lavoro aziendale.

Inoltre, l'impiego costante di queste tecniche in sostituzione all'aratura permette vantaggi ambientali, con un possibile contenimento delle emissioni dirette e indirette di CO<sub>2</sub>, un accumulo della sostanza organica nello strato superficiale del suolo, una riduzione dei fenomeni di erosione superficiale, in particolare nei terreni declivi, e dell'evaporazione del terreno (Morris *et al.*, 2010; Moretti *et al.*, 2011). Per questi motivi i Piani di Sviluppo Rurale (PSR) delle regioni Italiane prevedono degli incentivi per la diffusione di queste tecniche di lavorazione conservativa in alternativa alla tradizionale preparazione del terreno impostata sull'aratura. Al tempo stesso, l'adozione di pratiche di minima lavorazione o non lavorazione del terreno (semina su sodo), vengono inserite nei disciplinari produttivi redatti con l'industria di trasformazioni per aumentare la sostenibilità ambientale della filiera, principalmente nel contesto della riduzione delle emissioni di gas serra e quindi nel miglioramento dell'impronta carbonica dei prodotti da forno.

L'adozione di minime lavorazioni in sostituzione dell'aratura richiede però una valutazione delle differenze nello sviluppo della coltura, anche in relazione all'attacco delle malattie fungine e ai risvolti qualitativi di filiera. In questo contributo vengono riassunti i risultati di 10 anni di confronto della coltivazione di frumento tenero e mais destinati alla filiera alimentare con aratura e diverse tecniche di minima lavorazione e/o semina su sodo, al fine di valutare l'effetto di queste pratiche sulla qualità sanitaria (contenuto in micotossine) e tecnologica (reologica nel frumento e durezza e resa molitoria nel mais).

## **Materiali e metodi**

Per il frumento tenero, in 10 anni di prove (2012 – 2021), condotte in Piemonte (Poirino e Carmagnola), è stato operato sulla varietà di frumento tenero panificabile cv. Aubusson, il confronto tra la lavorazione convenzionale mediante aratura (25 cm) e successive erpicature per preparare il letto di semina e l'adozione di minime lavorazioni, tramite discatura o la tecnica della semina su sodo (*no-tillage*).

Sono stati misurati la produzione di granella, previa trebbiatura parcellare. Sullo sfarinato integrale è stato quantificato il contenuto in proteine (metodica NIR) e la contaminazione da micotossine normate (deossinivalenolo, DON), modificate (forme glucosidate del DON, DON-3-G) ed emergenti (enniatine, moniliformina, MON, alcalodi dell'ergot) attraverso una metodica multitossina in LC/MS-MS (Scarpino *et al.*, 2019). La farina raffinata è stata ottenuta previa macinazione con un impianto pilota (Bona).

Per il mais destinato alla filiera della produzione di farine e *hominy grits* ad uso alimentare è stato operato a Carmagnola un confronto quinquennale (2015-19) su un ibrido di mais di riferimento per il settore molitorio (Corteva P1547), tra la minima lavorazione (MT) con erpice a dischi o la tecnica dello *strip tillage* (ST) in alternativa all'aratura in monosuccessione. Oltre alla produzione di granella, sono stati analizzati il contenuto in fumonisine (B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub>) e DON, mediante metodica

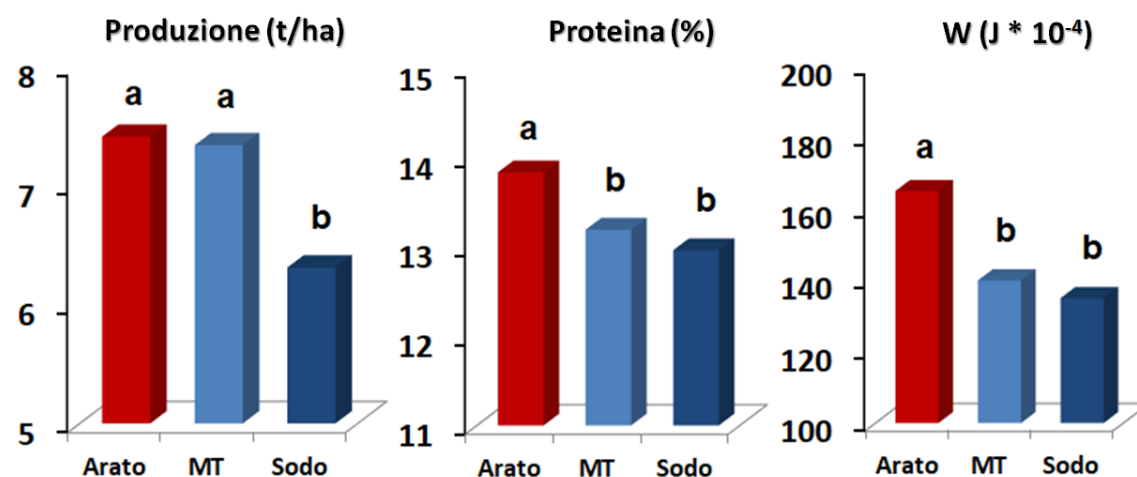
LC/MS-MS. La durezza della granella e la potenziale resa molitoria in frazioni di maggior interesse economico è stata valutata secondo un *particle size index* test, come rapporto (C/F) tra la frazione grossolana (C, *coarse*) rispetto a fine (F, *fine*) (Blandino *et al.*, 2013). I dati raccolti sono stati oggetto di analisi della varianza (test REGW-F,  $p \leq 0.05$ ) confrontando le tecniche di lavorazione del suolo, con l'anno considerato un effetto casuale.

## Risultati

### Frumento tenero

La semina su sodo, rispetto all'aratura, causa una minore resa (Fig. 1) ed una maggiore contaminazione da micotossine (Tab. 1). La minima lavorazione (MT) ha una produzione di granella simile a quella dell'aratura, sebbene la contaminazione da micotossine normate (DON) ed emergenti (enniatine, MON) è superiore e non si differenzia dalla semina su sodo. La contaminazione di alcalodi dell'ergot risulta significativamente superiore solo con la tecnica della semina su sodo.

Con la medesima gestione della concimazione azotata, con apporti in linea con gli asporti potenziali attesi in funzione dei livelli produttivi, per la qualità tecnologica, l'assenza dell'aratura, sia come MT sia come semina su sodo) determina una riduzione del contenuto di proteine (-0.8%) e della forza (W, -10%) delle farine.



**Figura 1.** Impatto lavorazioni del suolo sulla produzione e la qualità reologica (contenuto proteico della granella e forza della farina, W)

Poirino e Carmagnola, dati medi di 10 anni. MT: minimum tillage.

Le medie seguite da lettere differenti indicano differenze statisticamente significative per  $p < 0,001$

Enniatine: somma di A, B, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. Alcalodi dell'ergot: somma di ergocristine, ergocristinine, ergometrine, ergometrinine, ergocornine, ergocorninine, ergocryptine, ergocryptinine, ergosine, ergotamine, ergovaline.

**Tabella 1.** Effetto delle lavorazioni del terreno, sul contenuto in deossinivalenolo (DON), deossinivalenolo 3 glucoside (DON-3-G), enniatine, moniliformina (MON) e alcalodi dell'ergot.

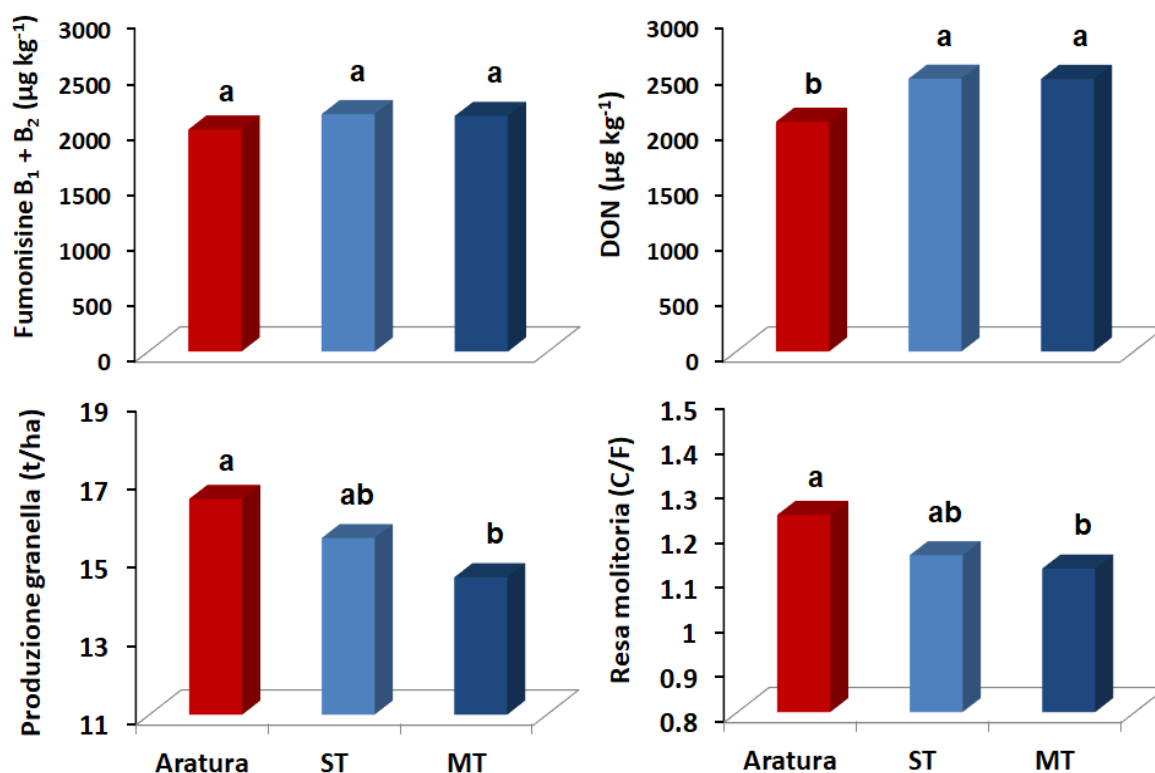
LAVORAZIONE DEL TERRENO	DON (µg/kg)	DON-3-G (µg/kg)	ENNIATINE (µg/kg)	MON (µg/kg)	ALCALODI ERGOT (µg/kg)
Aratura	979 b	205 b	258 b	77 b	10 b
Minima lavorazione	1801 a	374 a	577 a	114 a	20 b
Semina su sodo	2017 a	401 a	530 a	99 a	519 a

Le medie seguite da lettere differenti indicano differenze statisticamente significative per  $p < 0,001$

Enniatine: somma di A, B, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. Alcalodi dell'ergot: somma di ergocristine, ergocristinine, ergometrine, ergometrinine, ergocornine, ergocorninine, ergocryptine, ergocryptinine, ergosine, ergotamine, ergovaline

## Mais

L'adozione di queste soluzioni determina un rallentamento dello sviluppo colturale, con un ritardo nella fioritura e maturazione. Questo si traduce in un danno produttivo (Fig. 2), più evidente con la minima lavorazione (-11%) rispetto all'impiego dello *strip tillage* (-6%). L'impatto delle lavorazioni conservative sulle caratteristiche tecnologiche (resa molitoria, espressa come *particle size index C/F*) e sanitarie (fumonisine) è complessivamente modesto. Dal punto di vista sanitario, un rischio superiore sembra interessare la contaminazione da deossinivalenolo (DON) nella minima lavorazione e nello *strip tillage*. Questa micotossina, così come osservato anche nel frumento, è prodotta da specie fungine (*F. graminearum* e *F. culmorum*) il cui sviluppo e diffusione è più strettamente associate ai residui colturali presenti sulla superficie del campo.



**Figura 2.** Effetto delle lavorazioni del terreno sulla produttività, la resa molitoria e il contenuto in micotossine del mais da granella per la filiera alimentare

Carmagnola, dati medi di 5 anni. ST: strip tillage; MT: minimum tillage

Le medie seguite da lettere differenti indicano differenze statisticamente significative per  $p < 0.05$

## Conclusioni

L'adozione di minime lavorazioni, per il frumento, implica impatti negativi sulla qualità sanitaria e reologica superiori a quelli produttivi e pertanto nell'ambito delle filiere sarà necessario attuare quelle pratiche volte a minimizzarne gli effetti.

Per gli aspetti tecnologici, è necessario gestire con attenzione (dose, frequenza di interventi) la concimazione azotata, in particolare per le varietà panificabili superiori e dei frumenti di forza, per garantirne un'adeguata qualità molitoria in termini di forza e stabilità delle farine.

La sperimentazione ha confermato inoltre che le minime lavorazioni in successione al mais da granella sono un chiaro fattore di rischio per la qualità sanitaria del frumento, determinando un aumento della contaminazione non solo delle micotossine regolamentate (Blandino et al., 2012), ma anche da quelle emergenti, rispetto all'aratura. I rischi sanitari a seguito dell'applicazione di queste tecniche di lavorazione semplificate possono essere mitigati con un adeguato



avvicendamento, con una scelta varietale orientata alle cultivar meno suscettibili alle malattie e quindi con l'impiego di strategie di difesa diretta in fioritura con le sostanze attive più efficaci. Al contrario, nel mais destinato alla filiera alimentare, le maggiori limitazioni dell'adozione di queste pratiche sono di tipo agronomico e produttivo e meno direttamente collegate alle esigenze qualitative di filiera, se si esclude il rischio potenziale di accumulo di DON nelle annate fresche e con le maturazioni tardive.

### **Bibliografia**

- Battisti M., Zavattaro L., Capo L., Blandino M. 2022. Maize response to localized mineral or organic NP starter fertilization under different soil tillage methods. *European Journal of Agronomy*, 138: 126534
- Blandino M., Haidukowski M., Pascale M., Plizzari L., Scudellari D., Reyneri A. 2012. Integrated strategies for the control of Fusarium head blight and deoxynivalenol contamination in winter wheat. *Field Crops Research*, 133: 139-149.
- Blandino M., Sacco D., Reyneri A. 2013. Prediction of the dry-milling performance of maize hybrids through hardness-associated properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93: 1356-1364.
- Derpsch R., Theodor F., Kassam A., Honwgen L. 2010. Current status of adoption of no-till farming in the world and some of its main benefits. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 3(1): 1-25.
- FAO. 2020. FAOSTAT. Food Agric. Organ United Nations, Stat. Div. <http://faostat3.fao.org/download>
- ISTAT., 2010. <http://censimentoagricoltura.istat.it/>
- Moretti B., Remogna E., Sanino N., Grignani C., Vidotto F., Tesio F., Ferrero A., Celi L., Said-Pulicino D., Borda T., Barberis E., Ferrazzi P., Berger F., Sacco D. 2011. Semina su sodo, valorizzare l'ambiente contenendo i cali produttivi. *L'Informatore Agrario*, 44: 52-55.
- Morris N.L., Miller P.C.H., Froud-Williams R.J. 2010. The adoption of non-inversion tillage systems in the United Kingdom and the agronomic impact on soil, crops and the environment-a review. *Soil Tillage Res*, 108(1-2):1-15.
- Scarpino V., Reyneri A., Blandino M. 2019. Development and Comparison of Two Multiresidue Methods for the Determination of 17 Aspergillus and Fusarium Mycotoxins in Cereals Using HPLC-ESI-TQ-MS/MS. *Frontiers in Microbiology*, 10, 361: 1-12.
- Soane B.D., Ball B.C., Arvidsson J., Basch G., Moreno F., Roger-Estrade J. 2012. No-till in northern, western and south-western Europe: A review of problems and opportunities for crop production and the environment. *Soil Tillage Res*, 118: 66-87.

## Valutazione dell'impatto delle infestanti su una coltura di campo tramite Smartphone

E. Romano<sup>1\*</sup>, C. Bisaglia<sup>1</sup>, M. Palumbo<sup>2</sup>, N. Virzi<sup>2</sup>, F. Sciacca<sup>2</sup>, S. Saia<sup>3,4</sup>, I. Pecorella<sup>3</sup>, P. De Vita<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari (CREA-IT), Sede di Treviglio, Via Milano 43, 24047 Treviglio (BG).

<sup>2</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali (CREA-CI), Lab. di Acireale, Corso Savoia 190, 95024 Acireale (CT).

<sup>3</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali (CREA-CI), SS 16 km 675, 71122 Foggia (FG).

<sup>4</sup>Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Pisa, Via delle Piagge 2, 56129 Pisa (PI).

\*E-mail: [elio.romano@crea.gov.it](mailto:elio.romano@crea.gov.it)

### Abstract

The information of the weed community and position in the field strongly contributes to the crop agronomic management in both conventional and organic systems. The individuation of the weed in the field requires finely tuned information-technology systems and tools such as machine learning for the recognition of plant species can improve the classification of the plant as the crop or weed. So far, the automated identification pipelines often provide scarce results under actual field conditions.

The aim of the present study was to develop an assessment methodology for weed plant species from images. The methodology was based on the analysis of RGB and localization information available on most smartphones available on the market. An image reading algorithm was set up to study the R, G and B matrices for estimating the percentage of canopy cover differing from the crop. The sampling was done in two locations and two crop phenological stages and the weed biomass and the number of plants were also directly measured by hand collection.

Here we report the results of the processing of the images collected in the geolocated sampling sites and show the correspondence by hand, to indicate the reliability of the system for individuating the presence of weeds among the on the plants of the crop.

### Riassunto

La conoscenza della flora infestante e della sua esatta posizione nel campo contribuisce alla gestione agronomica sia in agricoltura convenzionale sia in quella biologica. La tecnologia IoT (Internet of Things) oggi consente indagini con vari approcci di apprendimento automatico (es. reti neurali) per il riconoscimento degli oggetti (*i.e.*, infestanti). Tuttavia, gli attuali protocolli di identificazione automatica spesso forniscono risultati modesti in condizioni di campo. L'obiettivo del presente lavoro è quindi stato di sviluppare una metodologia di identificazione e localizzazione per le malerbe da immagini. La metodologia si basa sull'analisi delle informazioni digitali RGB e di localizzazione disponibili sulla maggior parte degli smartphone disponibili sul mercato. È stato impostato un algoritmo di lettura delle immagini per studiare le matrici Red, Green e Blue per la stima della percentuale di infestanti. Il campionamento è avvenuto in due località e in due fasi fenologiche ed in coincidenza di ogni singolo rilievo di immagine, è stato determinato manualmente anche il numero di infestanti presenti sul terreno e la quantità di biomassa totale. Il presente lavoro riporta i risultati relativi all'elaborazione delle immagini raccolte nei siti di campionamento geolocalizzati e mostra la corrispondenza con la valutazione manuale, al fine di indicare l'affidabilità del sistema di indicazione della presenza di erbe infestanti nell'ambito delle piante della specie coltivata.



## Introduzione

Il controllo delle infestanti è un fattore decisivo per un raccolto di successo in termini di resa, qualità, redditività e ricadute nella rotazione (Frenda *et al.*, 2013).

Le strategie di gestione delle infestanti basate sull'uso di principi attivi hanno un effetto marcato sulla presenza di erbe infestanti, ma implicano un elevato impegno economico per gli agricoltori. Oltre agli effetti sull'ambiente, possono verificarsi effetti di resistenza ai principi attivi (Ramsden *et al.*, 2017).

Per tali ragioni, ridurre la dipendenza dall'uso di sostanze chimiche è diventato un obiettivo distinto all'interno dell'UE con la direttiva UE 2009/128/CE, in concomitanza con l'ambizione generale di mantenere o aumentare la produttività. Tra le strategie probabili, un primo passo potrebbe essere quello di valutare se il tasso di ciascuna sostanza possa essere ridotto senza diminuire i rendimenti. Dosi ridotte possono controllare sufficientemente le erbe infestanti quando la selezione del principio attivo, la sua applicazione e la dose sono accuratamente adattate alla flora in termini di tipologia della stessa e presenza nell'ambito della coltura. Anche gli studi sull'uso del supporto decisionale per il controllo delle infestanti richiedono l'integrazione di informazioni sull'impatto della biomassa infestante preesistente, per facilitare una gestione efficiente e sostenibile del settore (Fountas *et al.*, 2006; Kitchen, 2008; Franco *et al.*, 2017). Nell'ultimo decennio sono stati messi a punto vari metodi di lettura delle immagini per valutare la densità della coltura e la presenza della biomassa infestante. In particolare, sono stati messi a punto algoritmi di lettura basati sulla semplificazione delle immagini (Sorensen *et al.*, 2010). Tuttavia, i metodi utilizzati hanno mostrato dei limiti quando le specie infestanti da discriminare mostrano una struttura delle foglie simile alla coltura e possono quindi essere meno discriminate (Xuewen *et al.*, 2018), come accade ad esempio a molte infestanti graminacee nella fase giovanile di crescita di alcuni cereali. Nel presente studio è riportata la valutazione preliminare di un algoritmo implementato in un'applicazione software, che si basa su immagini scattate da dispositivi mobili (smartphone o tablet) e prevede la quantificazione della percentuale dei pixel della parte infestante, dopo aver richiesto all'operatore l'indicazione delle file della coltura sull'immagine. Pertanto, questa ricerca ha l'obiettivo principale di verificare se l'algoritmo di estrapolazione della percentuale di biomassa infestante corrisponda alla quantità effettivamente presente e, di conseguenza, se l'applicazione che lo utilizza possa essere uno strumento affidabile per le scelte di utilizzo e la valutazione della possibile riduzione dei fitosanitari da utilizzare a supporto della coltivazione in produzione in termini quantitativi e qualitativi.

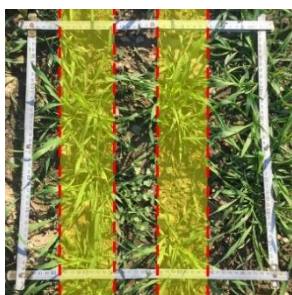
## Materiali e metodi

Le prove sono state condotte in due località, una nel nord Italia (Treviglio, BG, 45°31'10N, 9°33'50E) ed una nel sud Italia (Foggia, FG, 41°28'00N, 15°30'0E). I campi di prova sono stati scelti per le caratteristiche ottimali del suolo per la coltivazione dei cereali e per la loro uniforme orografia. Sono state quindi seminate due parcelle sperimentali, una con grano duro (*Triticum turgidum* L. subsp. *Durum* (Desf.) Husn.) a Foggia e una con grano tenero (*Triticum aestivum* L.) a Treviglio.

La densità di semina è stata di 200 kg di seme ha<sup>-1</sup> in entrambi i casi. La cultivar di grano duro seminata a Foggia era Cappelli (peso di mille cariossidi pari a 50 g), la cultivar di grano tenero seminata a Treviglio era Azzorre (peso di mille cariossidi pari a 41 g). Entrambe sono state seminate con una larghezza interfilare di 15 cm.

Su ogni campo sperimentale, all'inizio della fase di preparazione del suolo, sono state scattate immagini da 50 coordinate casuali sul campo, con uno smartphone con una risoluzione di 12 Mpixel. Ciascuna foto è stata scattata con una misura di riferimento nota dell'area, posizionando a terra un quadrato rigido di 0,16 m<sup>2</sup> (Fig. 1). Il quadrato era disposto in modo da avere i lati paralleli e perpendicolari alle file. L'operatore ha posizionato lo smartphone ad un'altezza di circa 1 metro, in una posizione il più possibile parallela al suolo. Dopo lo scatto sono state registrate le

coordinate geografiche, tramite le indicazioni della posizione dello smartphone. Le foto sono state ripetute dopo un mese dall'emergenza, in coincidenza della fase fenologica di accestimento, nelle stesse coordinate geografiche (con l'approssimazione della localizzazione dello smartphone). Le immagini, in tutto 200, sono state elaborate attraverso il programma statistico "R" software statistico (R Development Core Team, 2008), utilizzando il pacchetto EBImage (Olès *et al.*, 2018; Pau *et al.*, 2010). In ciascuna immagine sono state identificate le file e, con linee parallele, lo spessore di ciascuna riga, in modo da evidenziare l'interfila. In questo modo l'algoritmo ha proceduto al ritaglio dell'interfila, per l'estrazione dei pixel relativi alla presenza delle erbacce. A differenza di Xuewen (2018), non è stata calcolata l'intensità del grigio, ma sono state caratterizzate le soglie delle componenti RGB della biomassa infestante, attraverso dieci campioni per ogni pixel. Parimenti, con lo stesso numero di campioni, sono state prodotte anche le soglie RGB caratterizzanti il suolo nudo e la coltura. In questo modo è stato possibile estrarre dall'area di campionamento (l'interfila) solo i pixel che corrispondessero alle caratteristiche delle soglie RGB della biomassa rilevata (Fig. 2). Inoltre, prima della valutazione della densità percentuale, è stato applicato un filtro del pacchetto EBImage, eseguito dalla funzione *medianFilter*, che sostituisce ogni pixel con la mediana dei pixel successivi, in modo da avere un margine di lettura più ampio rispetto ai bordi della biomassa (Fig. 3). È stata applicata anche la funzione *watershed* dello stesso pacchetto EBImage (Fig. 4) che identifica e separa gli oggetti che risaltano sullo sfondo. Quindi sono stati contati i pixel e calcolato il rapporto tra i pixel contati e il numero totale di pixel nell'area di prova, per la quantificazione della percentuale di biomassa infestante. In corrispondenza della fase fenologica di inizio levata, è stato eseguito il rilievo in campo della presenza di erbe infestanti. La valutazione dell'efficienza dell'algoritmo si è basata sul corretto tasso di rilevamento delle erbe infestanti e sul tasso di falso rilevamento, che sono due indicatori comuni e generici nella valutazione delle prestazioni degli algoritmi di rilevamento in diversi argomenti (Xuewen *et al.*, 2011). Da ciascuna immagine è stata calcolata la densità di presenza della biomassa infestante, utilizzando l'algoritmo descritto. La valutazione della densità reale della percentuale di biomassa infestante è stata invece ottenuta in campo, dal conteggio manuale delle piante infestanti negli interfilari all'interno del quadrato utilizzato per lo scatto. I dati sono stati quindi sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) per verificare l'accordo tra dati rilevati manualmente e tramite analisi automatica dell'immagine.



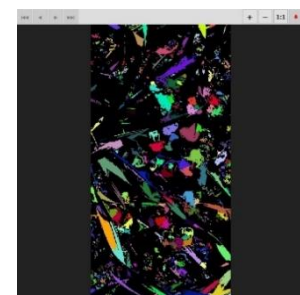
**Figura 1.** Un'immagine con le bande indicanti le file.



**Figura 2.** Immagine dopo il metodo di *thresholding*.



**Figura 3.** Immagine dopo la funzione *medianFilter*.



**Figura 4.** Immagine dopo la funzione di *watershed*.

## Risultati e discussione

Nei campi è stata riscontrata una bassa percentuale di biomassa infestante, che è risultata in media del 13,6% a Foggia e dell'11,5% a Treviglio. Tali valori risultano molto bassi considerata l'assenza di diserbo e la storia agronomica dei campi. Percentuali così basse sono probabilmente state dovute in entrambi i siti a un inverno asciutto e freddo rispetto alle medie climatiche, tale che l'emergenza, la sopravvivenza invernale e la crescita delle infestanti è stata ridotta.

La percentuale più bassa registrata è stata del 7,12% nel primo rilievo a Treviglio, misurata dall'analisi dell'immagine come 6,99%, quindi con un delta relativo inferiore ad un punto

percentuale. La percentuale più alta registrata è stata del 16,98% nel secondo periodo, a Treviglio, misurata dall'analisi dell'immagine come 17,98, con un delta di un punto percentuale assoluto. Complessivamente, le differenze relative tra i valori percentuali effettivi della biomassa infestante e quelli estratti dal processo di elaborazione delle immagini erano dello 0,83%, con valori esatti e un errore massimo dell'1,44%.

**Tabella 1.** Percentuale di biomassa infestante misurata nei due campi e stimata mediante analisi dell'immagine

Condizione	% misurata				% stimata			
	Media	Min	Max	SD	Media	Min	Max	SD
Foggia	13,59	10,01	16,98	2,30	12,76	9,02	17,98	1,89
Periodo 1	11,43	10,01	12,98	0,79	11,19	9,02	14,10	1,10
Periodo 2	15,76	13,06	16,98	0,72	14,32	13,02	17,98	1,00
Treviglio	11,55	7,12	15,00	2,40	10,72	6,99	16,00	1,89
Periodo 1	9,57	7,12	11,56	1,16	9,25	6,99	12,10	1,23
Periodo 2	13,52	11,00	15,00	1,52	12,20	1,00	16,00	1,11
	12,57	7,12	16,98	2,56	11,74	6,99	17,98	2,14

La percentuale registrata nel secondo periodo è apparsa maggiore rispetto al primo. È stata osservata anche una differenza tra i due metodi di calcolo della percentuale di biomassa, con valori inferiori per l'analisi dell'immagine rispetto al campionamento diretto.

Allo stesso modo si è verificata un'interazione tra metodo e fase di osservazione, probabilmente perché il metodo di estrazione dei valori basato sull'algoritmo proposto fornisce risposte che risentono della percentuale effettivamente presente e che sottostimano i valori effettivi a basse percentuali o sovrastimano quantità crescenti di erbe infestanti. Il coefficiente di correlazione tra i valori misurati e quelli stimati era 0,93 per i dati provenienti da Foggia, e 0,97 per i dati provenienti da Treviglio.

Il rapporto tra la differenza tra il valore reale e quello misurato rispetto al valore reale ha mostrato che la capacità di stima dell'algoritmo proposto era, in media, superiore all'80%. Il passaggio dal primo al secondo rilievo ha comportato una minore corrispondenza e una maggiore variabilità della risposta, caratterizzata principalmente da una riduzione media del rapporto e da un aumento dei valori nei quantili superiori del rapporto.

Sono stati contati i campioni correttamente interpretati dal sistema di analisi delle immagini, quelli sovrastimati e quelli sottovalutati. I valori esattamente corrispondenti al valore effettivo sono stati considerati correttamente interpretati con un intervallo di confidenza di  $2\sigma$  dei valori della stessa condizione di prova. Quindi, la sovrastima e la sottostima sono state indicate quando il valore effettivo era superiore o inferiore al valore misurato di oltre  $\pm 2\sigma$ , rispettivamente.

Secondo questa categorizzazione, i campioni indicati come corrispondenti sono stati l'80%, quelli sopravvalutati 1,2% e quelli sottostimati 18,8%. Il test di accuratezza ha rivelato che l'algoritmo proposto ha una sensibilità dell'80% e una specificità dell'82%. Questi valori indicano che l'algoritmo nello studio ha classificato correttamente l'80% dei pixel definiti come erbe indesiderate (cioè veri positivi) e l'82% dei campioni definiti come non erbacei (cioè veri negativi) rispetto alla stima effettiva. La specificità era del 2% superiore alla sensibilità, il che indica che questo algoritmo ha una leggera tendenza a classificare i campioni come non infestanti anche se gli operatori addestrati li classificavano come infestanti (cioè, falso positivo, errore di tipo I). Nel complesso, questo metodo di misurazione digitale ha classificato accuratamente il 68% dei pixel. L'interferenza delle foglie sporgenti della coltura principale ha messo in difficoltà il sistema di discriminazione e genera risultati meno affidabili, che potrebbero essere più difficili da applicare a sistemi con interfila ridotta, maggiormente efficienti nel controllo delle erbe infestanti (De Vita *et al.*, 2017). Tuttavia, è molto probabile che il processo proposto abbia una maggiore precisione e una maggiore corrispondenza ai valori effettivi nei casi in cui la specie coltivata e l'erba

infestante condividono meno possibilità di mescolanza, come nelle colture con interfilari più grandi, tra cui mais, soia, girasole o sorgo.

È quindi possibile l'implementazione dell'algoritmo nell'applicazione per smartphone o sistemi automatizzati, che consentirà di esprimere in tempo reale, subito dopo gli scatti fotografici, il valore della biomassa infestante presente, facilitando così l'operatore nelle scelte del momento migliore di intervento, ottimizzando la gestione delle risorse necessarie per il controllo delle infestanti.

### **Ringraziamenti**

Questo lavoro è stato sostenuto dal Ministero dell'Agricoltura italiano (MiPAAF) nell'ambito del progetto BIODURUM (DM 95785 del 22/12/2016). Gli autori ringraziano il lavoro del Sig. Elia Premoli per il prezioso aiuto fornito.

### **Bibliografia**

Direttiva UE 2009/128/CE, [https://www.politicheagricole.it/flex/files/1/0/3/D.8a495639ee3981d9fc4f/Direttiva\\_2009\\_128\\_CE.PDF](https://www.politicheagricole.it/flex/files/1/0/3/D.8a495639ee3981d9fc4f/Direttiva_2009_128_CE.PDF)

De Vita P., Pecorella I., Colecchia S.A., Saia S. 2017. Reduced inter-row distance improves yield and competition against weeds in a semi-dwarf durum wheat variety. *European Journal of Agronomy*, 86:69-77. doi: 10.1016/j.eja.2017.02.003

Fountas S., Wulfsohn D., Blackmore B. S., Jacobsen H. L., Pedersen S. M. 2006. A model of decision-making and information flows for information-intensive agriculture. *Agricultural Systems*, 87: 192-210.

Franco C., Pedersen M. S., Papaharalampos H., Ørum J.E. 2017. The value of precision for image-based decision support in weed management. *Precision Agriculture*, 18:366-382. doi: 10.1007/s11119-017-9520-y.

Frenda A.S., Ruisi P., Saia S., Frangipane B., Di Miceli G., Amato, G., Giambalvo D. 2013. The critical period of weed control in faba bean and chickpea in Mediterranean areas. *Weed Science*, 61(3): 452-459. doi: <http://dx.doi.org/10.1614/WS-D-12-00137.1>

Kitchen N. R. 2008. Emerging technologies for real-time and integrated agriculture decisions. *Computers and Electronics in Agriculture*, 61: 1-3.

Oleś A., Pau G., Sklyar O., Huber W. 2018. Image processing and analysis toolbox for R. URL <https://github.com/aoles/EBImage>

Pau G., Fuchs F., Sklyar O., Boutros M., Huber W. 2010. EBImage - an R package for image processing with applications to cellular phenotypes. *Bioinformatics*, 26(7): 979-981, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq046>

Ramsden M.W., Kendall S.L., Ellis S.A., Berry P.M. 2017. A review of economic thresholds for invertebrate pests in UK arable crops. *Crop Protection*, 96: 30-43.

Sorensen C. G., Pesonen L., Fountas S., Suomi P., Bochtis D., Bildsøe P., Pedersen S.M. 2010. A user-centric approach for information modelling in arable farming. *Computers and Electronics in Agriculture*, 73: 44-55.

Wu X., Xu W., Song Y., Cai M. 2011. A detection method of weed in wheat field on machine vision. *Procedia Engineering*, 15: 1998-2003

## Valutazione della sostenibilità della produzione risicola: il ruolo del Life Cycle Assessment

G. Vinci, R. Ruggieri, M. Ruggieri\*

Sapienza Università di Roma, Dipartimento di Management, Via del Castro Laurenziano 9, 00161 Roma (RM).

\*E-mail: [m.ruggieri@uniroma1.it](mailto:m.ruggieri@uniroma1.it)

**Abstract:** The aim of this research was to investigate the most recent literature regarding the application of Life Cycle Assessment (LCA) in the rice sector, so as to make an overview of the various techniques and production methods in different countries, and thus identify the main hotspots and check their sustainability. The results show that, first of all, the literature about the applications of LCA in the rice sector is rather limited, and there is some discord in terms of the choice of functional units and system boundaries, sometimes making the results of the studies difficult to compare. Each Country defines the scope of research based on its typical farming techniques, with Asian countries focusing on fertilizer management and Italy on water management. The most considered impact categories are those related to the environmental macro-area. Finally, the absence of studies addressing social impacts is noteworthy.

**Riassunto:** L'obiettivo di questa ricerca è stato quello di indagare la letteratura più recente riguardo l'applicazione del LCA nel settore risicolo, in modo da effettuare una panoramica sulle varie modalità di produzione dei vari Paesi, e quindi individuarne i principali hotspot e verificarne la sostenibilità. I risultati mostrano come la letteratura circa le applicazioni del LCA nel settore risicolo sia piuttosto limitata, e ci sia una certa discordanza sia per la scelta delle unità funzionali che dei confini del sistema, rendendo talvolta i risultati degli studi difficili da comparare. Ogni Paese definisce lo scopo delle ricerche in base alle proprie tecniche di coltivazione, con i Paesi asiatici che si concentrano sulla gestione dei fertilizzanti e l'Italia nella gestione dell'acqua. Le categorie di impatto più considerate sono quelle relative alla macroarea ambientale. Infine, si segnala l'assenza di studi che riguardano gli impatti sociali.

**Keywords:** Produzione risicola, Life Cycle Assessment, LCA, hotspot

### Introduzione

La produzione di riso (*Oryza sativa* L. spp), il cereale più utilizzato per il consumo umano, si basa in gran parte su tecniche di coltivazione intensive convenzionali (le Campion *et al.*, 2020) ed essendo la principale fonte antropogenica di metano (CH<sub>4</sub>) (Kirschke *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2015) è tra le attività con il più alto livello di impatti ambientali nel settore agroalimentare. Data la sua importanza nell'alimentazione umana potrebbe essere quindi utile approfondirne gli effetti ambientali, così da poter creare modelli di filiera sostenibili. In questo contesto, per la valutazione degli impatti ambientali provocati da prodotti o processi, il LCA (ISO 14040:2006 e ISO 14044:2006), potrebbe essere una metodologia utile. Questa ricerca, quindi, ha l'obiettivo di indagare la letteratura più recente riguardo l'applicazione del LCA nel settore risicolo, in modo da effettuare una panoramica sulle varie tecniche e modalità di produzione dei vari Paesi, e quindi individuarne i principali hotspot e verificarne la sostenibilità.

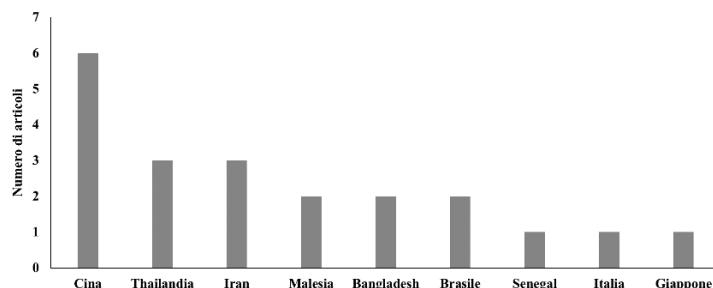
### Materiali e metodi

Per la *Literature overview* è stato utilizzato il database *Scopus*, inserendo le parole: "LCA AND Rice" (Article title, abstract, keywords), considerando solo gli articoli in inglese e ad accesso completo relativi agli ultimi 5 anni (2022-2017) e aventi per oggetto il solo processo produttivo del riso (escludendo articoli relativi all'utilizzo di sottoprodotti, produzione di biocarburanti da rifiuti, etc.). La ricerca ha portato alla selezione finale di 21 articoli.

## Risultati e discussioni

### Goal and scope definition

Il Paese con la maggiore produzione scientifica è la Cina (Fig. 1) (6 articoli), coerentemente con la sua leadership di prima produttrice al mondo. Seguono Thailandia e Iran (3 articoli a testa), Malesia, Bangladesh e Brasile (2), Senegal, Italia e Giappone (1).



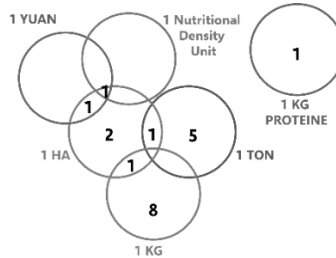
**Figura 1.** Distribuzione della produzione scientifica LCA - Riso (numeri di articoli per Paese)

Comprendere la distribuzione geografica degli studi può essere importante poiché ogni Paese ha differenti modalità di produzione, in base soprattutto alle stagioni di coltivazione e quindi ai vari input utilizzati. Pertanto, ogni autore definirà il proprio obiettivo in base alle tecniche di coltivazione tipiche del proprio Paese. Ad esempio, nei Paesi asiatici, gran parte delle produzioni avvengono durante il periodo delle piogge (luglio-settembre) o in prossimità di corsi d'acqua, ed è quindi possibile concentrarsi più sulla gestione di fertilizzanti e pesticidi anziché sullo studio degli impatti associati al pompaggio delle acque, al contrario di ciò che avviene in Paesi come l'Italia, dove gran parte delle coltivazioni sono irrigue. Inoltre, emerge come, sebbene spesso la varietà di riso non sia specificata, gran parte degli studi si concentra sulla valutazione degli hotspot nel solo processo produttivo di una specifica produzione di riso, che sia convenzionale, biologica o integrata (riso/animali acquatici). Ad esempio, Shen *et al.* (2021) valutano gli impatti ambientali del *Ratoon Rice* in Cina, così come Rezei *et al.*, 2021; Morandini *et al.*, 2021; Houshyar *et al.*, 2019; Habibi *et al.* 2019. Masuda (2019) invece quantifica gli impatti ambientali di una produzione di riso in Giappone, mentre Shew *et al.* (2019) e Jimmy *et al.* (2017) studiano gli impatti della coltivazione del riso in stagioni di semina differenti in Bangladesh. Yodkhum *et al.* (2018) invece, si concentrano sulla valutazione del riso in Thailandia, mentre Abdul Rahman *et al.* (2019) studiano gli hotspot della produzione di riso in Malesia. Le produzioni risicole degli autori citati tuttavia, prendono come riferimento tecniche agronomiche convenzionali. Solo Mungkung *et al.* (2019) effettuano un LCA del riso biologico in Thailandia. Pochi studi, invece, si soffermano sul confronto tra produzioni convenzionali e biologiche, tra cui ad esempio Harun *et al.* (2021) (Malesia), Yu *et al.* (2022) e He *et al.* (2018) (Cina). Sempre un confronto viene effettuato da Escobar *et al.* (2022) i quali studiano differenti pratiche agricole convenzionali ed intensive raffrontandole con le raccomandazioni del servizio ufficiale di consulenza agricola in Senegal. C'è da puntualizzare però come gli studi relativi alla fascia asiatica (Cina, Bangladesh, Malesia, Thailandia, Giappone), i cui Paesi possono sfruttare condizioni climatiche favorevoli, non prendono in considerazione l'acqua come input, la quale quindi non incide direttamente sui risultati in termini di emissioni. Spesso quindi, il principale oggetto di studio risulta essere la gestione dei fertilizzanti e dei pesticidi. Di contro, le pratiche di gestione dell'acqua vengono confrontate in soli due studi, rispettivamente in Italia (Zoli *et al.*, 2021) e in Brasile (Coltro *et al.*, 2017). Infine, tre studi cinesi (Chen *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2022), prendono in considerazione differenti modalità di coltura in Cina, integrando riso e animali d'acquacoltura, mentre un solo studio (Nunes *et al.*, 2017) esamina la differenza tra riso parboiled bianco e integrale.

Pertanto, la differenza geografica incide sia sull’oggetto di studio che sull’impianto metodologico, dato che i dati di inventario saranno tarati in base alle condizioni pedoclimatiche del Paese di riferimento.

### Unità funzionale (UF)

Le due UF più utilizzate sono state 1 kg di riso (9 studi) e 1 tonnellata di riso (6) (Fig. 2).



**Figura 2.** Unità funzionali scelte negli studi analizzati (Nei cerchi il numero di studi che considerano quella UF)

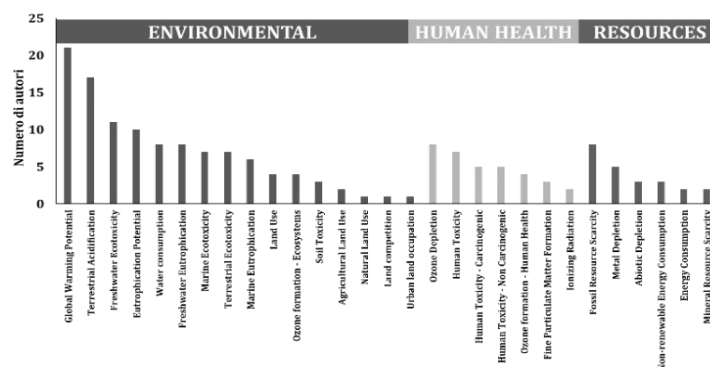
Segue poi 1 ha (6 studi). Alcuni autori per avere dei risultati più completi utilizzano più di un UF (Coltro *et al.*, 2017; Nunes *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2021; Shen *et al.*, 2021, Xu *et al.*, 2022). Si può osservare quindi come ci sia disomogeneità nella scelta dell’UF e quindi poca coerenza tra autori, sebbene si prediligano UF di massa (1 kg o 1 ha).

### Confini del sistema

Riguardo la definizione dei confini del sistema, c’è particolare preferenza per le produzioni *from cradle to farmgate*, sia a causa della scarsa disponibilità di dati sia per soffermarsi sulle fasi del processo produttivo. Tuttavia, ciò che cambia è che a volte vengono presi in considerazione anche i processi di produzione dei macchinari (Harun *et al.*, 2021; Zoli *et al.*, 2021), il trasporto all’azienda agricola (Xu *et al.*, 2022), la lavorazione del riso (Nunes *et al.*, 2017), oppure anche il confezionamento (Munkung *et al.*, 2019) e la distribuzione (Coltro *et al.*, 2017), rendendo difficile comparare i risultati, rischiando di sovra o sottostimare i risultati.

### Life Cycle Impact Assessment (LCIA)

Le due categorie di impatto più considerate dagli autori sono il “Global Warming Potential (GWP)” (21 autori) e “Terrestrial Acidification (TA)” (17 autori) (Fig. 3).



**Figura 3.** Categorie di impatto più utilizzate negli studi LCA - Riso

Ciò riflette l’impegno da parte dei produttori nel cercare soluzioni per limitare la metanogenesi e per la ricerca di fertilizzanti sostenibili (digestato, compost, letame) in sostituzione di quelli



chimici azotati. La più grande preoccupazione da parte degli autori è legata agli impatti diretti delle attività agricole sugli ecosistemi, le cui categorie sono quelle numericamente più studiate. Secondariamente ci sono gli effetti diretti e indiretti sulla salute, e infine gli effetti sull'esaurimento di risorse. Emerge come la preoccupazione ambientale sia la più determinante, mentre c'è minore preoccupazione sugli effetti sulla salute e sull'impovertimento delle risorse. Successivamente sono stati estrapolati i principali GWP dei vari studi (Tab. 1).

**Tabella 1.** GWP dei principali studi di letteratura (risicoltura convenzionale)

Ref.	Paese	GWP (kg CO <sub>2</sub> eq)	UF
<b>Escobar <i>et al.</i> (2022)</b>	Senegal	1,98	1 kg
<b>Munkung <i>et al.</i> (2019)</b>	Thailandia	2,88	
<b>Yodkhum <i>et al.</i> (2018)</b>		0,64	
<b>Shew <i>et al.</i> (2019)</b>	Bangladesh	1,3 - 2,8	
<b>Jimmy <i>et al.</i> (2017)</b>		3,15	
<b>Xu <i>et al.</i> (2022)</b>	Cina	12.574	1 ha
<b>Shen <i>et al.</i> (2021)</b>		16.716	
<b>Masuda (2019)</b>	Giappone	12.682 – 14.902	
<b>Coltro <i>et al.</i> (2017)</b>	Brasile	3163	1 ton
<b>Morandini <i>et al.</i> (2021)</b>	Iran	457	
<b>Habibi <i>et al.</i> (2019)</b>		427	
<b>Zoli <i>et al.</i> (2021)</b>	Italia	298	
<b>Abdul Rahman <i>et al.</i> (2019)</b>	Malesia	1301	
		1390	

Tali risultati riguardano solo la risicoltura convenzionale, e si può notare come il GWP vari da Paese a Paese, in base soprattutto alla stagione di coltivazione e agli input. Ad esempio, due Paesi con tecniche di coltivazione differenti, come Malesia e Italia hanno pressoché risultati uguali. Infatti, il sistema di produzione italiano (Zoli *et al.*, 2021) è irriguo e include gli impatti legati all'elettricità per il funzionamento delle pompe, mentre in quello malesiano si fa affidamento quasi esclusivamente alle precipitazioni della stagione monsonica, oltre che alla fitta rete di canali di cui dispone (Toriman e Mokhtar, 2012). Risultati simili sono pertanto molto probabilmente riconducibili ad un maggior uso di fertilizzanti e pesticidi in Thailandia, a seguito della necessità di aumentare la resa per nutrire una popolazione che si alimenta quasi soltanto con riso. Oppure nel caso di Cina e Giappone i risultati sono simili: 12.574 - 16.716 kg CO<sub>2</sub> eq per la Cina (Xu *et al.*, 2022) e 12.682 – 14.902 kg CO<sub>2</sub> eq per il Giappone (Masuda, 2019). Anche in questo caso, i due Paesi sono ricchi di risorse idriche per via di una piovosità annua elevata e le loro fonti d'acqua sono sufficienti a soddisfare il fabbisogno idrico necessario alla risicoltura. Pertanto, gli effetti legati al pompaggio delle acque non sono considerati e gli impatti potrebbero essere legati soprattutto al grande uso di fertilizzanti, con i risultati che divergono per la differenza dei confini e degli input considerati. In generale quindi emerge come il contributo agli impatti ambientali vari da Paese a Paese e quindi l'incompatibilità ambientale delle varie risicoltura è anche radicata nelle loro condizioni pedoclimatiche.

## Conclusioni

Dalla panoramica della letteratura è emerso come le applicazioni del LCA nel settore risicolo siano limitate. I vari studi divergono sia per UF che per confini del sistema, con i risultati che potrebbero essere talvolta sopra o sottostimati. Ogni Paese definisce lo scopo delle ricerche in base alle proprie tecniche di coltivazione tipiche, con i Paesi asiatici che si concentrano sulla gestione dei fertilizzanti e l'Italia nella gestione dell'acqua. Le categorie di impatto più considerate sono quelle relative alla macroarea ambientale, mostrando un impegno da parte degli autori nel ridurre le emissioni da metanogenesi e dalla fertilizzazione, nella ricerca di ammendanti sostenibili e nel



miglioramento della gestione dell'acqua, le tre problematiche del settore risicolo. Infine, si segnala l'assenza di studi che riguardano gli impatti sociali.

## Bibliografia

- Abdul Rahman M. H., Chen S. S., Abdul Razak P. R., Abu Bakar N. A., Abdul Talib S. A. 2019. Life cycle assessment in conventional rice farming system: Estimation of greenhouse gas emissions using cradle-to-gate approach. *Journal of Cleaner Production*, 212: 1526-1535.
- Chen Y., Liu C., Chen J., Hu N., Zhu L. 2021. Evaluation on environmental consequences and sustainability of three rice-based rotation systems in Quanjiao, China by an integrated analysis of life cycle, energy and economic assessment. *Journal of Cleaner Production*, 310.
- Coltro L., Marton L. F. M., Pilecco F. P., Pilecco A. C., Mattei L. F. 2017. Environmental profile of rice production in southern Brazil: A comparison between irrigated and subsurface drip irrigated cropping systems. *Journal of Cleaner Production*, 153: 491-505.
- Escobar N., Bautista I., Peña N., Fenollosa M. L., Osca J. M., Sanjuán N. 2022. Life cycle thinking for the environmental and financial assessment of rice management systems in the Senegal river valley. *Journal of Environmental Management*, 310.
- Habibi E., Niknejad Y., Fallah H., Dastan S., Tari, D. B. 2019. LCA of rice production systems in different paddy field size levels in north of Iran. *Environmental Monitoring and Assessment*, 191(4).
- Harun S. N., Hanafiah M. M., Aziz N. I. H. A. 2021. An LCA-Based Environmental Performance of Rice Production for Developing a Sustainable Agri-Food System in Malaysia. *Environmental Management*, 67(1).
- He X., Qiao Y., Liang L., Knudsen M. T., Martin F. 2018. Environmental LCA of long-term organic rice production in subtropical China. *Journal of Cleaner Production*, 176: 880-888.
- Houshyar E., Chen B., Chen G. Q. 2019. Environmental impacts of rice production analyzed via social capital development: An Iranian case study. *Ecological Indicators*, 105: 675-687.
- Hu N., Liu C., Chen Q., Zhu L. 2021. Life cycle environmental impact assessment of rice-crayfish integrated system: A case study. *Journal of Cleaner Production*, 280: 124440.
- International Organization for Standardization (ISO 2006). *Life Cycle Impact Assessment: Draft international standard (ISO 14044)*. Geneva, Switzerland.
- International Organization for Standardization (ISO 2006). *Principles and framework of Life Cycle Assessment (ISO 14040)*. Geneva, Switzerland
- Jimmy A. N., Khan N. A., Hossain M. N., Sujauddin M. 2017. Evaluation of the environmental impacts of rice paddy production using life cycle assessment: Case study in Bangladesh. *Modeling Earth Systems and Environment*, 3(4): 1691-1705.
- Kirschke S., Bousquet P., Ciais P., Saunoy M., Zeng G. 2013. Three decades of global methane sources and sinks. In *Nature Geoscience*.
- le Campion A., Oury F. X., Heumez E., Rolland B. 2020. Conventional versus organic farming systems: dissecting comparisons to improve cereal organic breeding strategies. In *Organic Agriculture*, 10(1).
- Masuda K. 2019. Eco-efficiency assessment of intensive rice production in Japan: Joint application of life cycle assessment and data envelopment analysis. *Sustainability*, 11(19)
- Morandini N. P., Petroudi E. R., Mobasser H. R., Dastan S. 2021. LCA of Crop Rotation Systems on Rice Cultivars in Northern Iran. *International Journal of Plant Production*, 14(3).
- Mungkung R., Pengthamkeerati P., Chaichana R., Watcharothai S., Kitpakornsanti K., Tapananont S. 2019. Life Cycle Assessment of Thai organic Hom Mali rice to evaluate the climate change, water use and biodiversity impacts. *Journal of Cleaner Production*, 211.
- Nunes F. A., Seferin M., Maciel V. G., Ayub M. A. Z. 2017. Life cycle assessment comparison between brown parboiled rice produced under organic and minimal tillage cultivation systems. *Journal of Cleaner Production*, 161: 95-104.
- Rezaei M., Soheilifard F., Keshvari A. 2021. Impact of agrochemical emission models on the environmental assessment of paddy rice production using life cycle assessment approach. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects*.
- Shen X., Zhang L., Zhang J. 2021. Ratoon rice production in central China: Environmental sustainability and food production. *Science of the Total Environment*, 764.
- Shew A. M., Durand-Morat A., Putman B., Nalley L. L., Ghosh, A. 2019. Rice intensification in Bangladesh improves economic and environmental welfare. *Environmental Science and Policy*, 95.
- Su J., Hu C., Yan X., Jin Y., Chen Z., Guan Q., Sun C. 2015. Expression of barley SUSIBA2 transcription factor yields high-starch low-Methane Rice. *Nature*, 523(7562).
- Xu Q., Dai L., Gao P., Dou, Z. 2022. The environmental, nutritional, and economic benefits of rice-aquaculture animal coculture in China. *Energy*, 249.
- Yodkhum S., Sampattagul S., Gheewala S. H. 2018. Energy and environmental impact analysis of rice cultivation and straw management in northern Thailand. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(18), 17654-17664.
- Yu L., Qiao X., Duan H., Zhang Z., Gong L., Li X., Lu J., Li X. 2022. Life cycle assessment of liquid digestate application strategies for rice agri-food chain in "Zero-waste City." *Biomass Conversion and Biorefinery*.
- Zoli M., Paleari L., Confalonieri R., Bacenetti J. 2021. Setting-up of different water managements as mitigation strategy of the environmental impact of paddy rice. *Science of The Total Environment*, 799: 149365.

## **DSS (Decision Support System) per una coltivazione sostenibile e di precisione del frumento** *M. Ruggeri<sup>1\*</sup>, P. Meriggi<sup>1</sup>, V. Rossi<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Horta srl, Via Egidio Gorra 55, 29122 Piacenza (PC).

<sup>2</sup>Università Cattolica Sacro Cuore, DIPROVES, Via Emilia Parmense 84, 29122 Piacenza (PC).

\*E-mail: [m.ruggeri@horta-srl.com](mailto:m.ruggeri@horta-srl.com)

### **Abstract**

Decision Support Systems (DSSs) are digital and precision farming tools based on forecasting models designed to generate useful information to integrate the decision-maker's experience and ensure that the actions taken in the field are the most correct to improve yield and quality and to minimize environmental impacts. DSSs are IT platforms that collect, in real time, crop data through sensors (e.g. weather and soil sensors), organize this data in cloud systems, interpret them by means of advanced modeling and big data techniques, integrate them automatically with expert knowledge, and eventually produce information, alarms and decision supports. Users use this information for precision agronomic crop management. Data relating to crop operations also enter into the DSS databases, in order to generate a continuous flow of updated information between the crop, the DSS and the user. Starting from data from weather stations, proximal and remote sensors and experimental field studies, various forecasting for crop development and growth, nutrient cycles, water balance, and risk of fungal pathogens provide practical advice for dosing and timing the application of agricultural inputs (seed, fertilizers, water, pesticides). Horta has implemented since 2011 the DSSs grano.net<sup>®</sup> and granoduro.net<sup>®</sup> for the cultivation of high quality, sustainable bread and durum wheat, respectively.

### **Riassunto**

I Sistemi di Supporto alle Decisioni (DSS) sono strumenti di agricoltura digitale e di precisione basati su modelli previsionali atti a generare informazioni utili per integrare l'esperienza del decisore e garantire che le azioni intraprese in campo siano ottimali per migliorare resa, qualità e minimizzare gli impatti ambientali. I DSS sono piattaforme informatiche che raccolgono, in tempo reale, dati colturali tramite varie tipologie di sensori, organizzano questi dati in sistemi cloud, li interpretano per mezzo di tecniche avanzate di modellistica e big data e li integrano in modo automatico con le conoscenze esperte, così da produrre informazioni, allarmi e supporti alle decisioni. Gli utenti usano queste informazioni per la gestione agronomica di precisione delle colture. Anche i dati relativi alle operazioni colturali entrano nei database, in modo da generare un flusso continuo d'informazioni sempre aggiornate fra la coltura, il DSS e l'utente. Partendo da dati provenienti da stazioni meteorologiche, sensori prossimali e remoti e studi sperimentali di campo, diversi modelli previsionali relativi ai cicli dei nutrienti, all'acqua nell'ecosistema agricolo, ai patogeni fungini e alla fenologia della pianta, forniscono consigli pratici sulle migliori tipologie e tempistiche di applicazione dei mezzi tecnici. Nel caso specifico del frumento tenero e duro, dal 2011 Horta ha implementato grano.net<sup>®</sup> e granoduro.net<sup>®</sup>, strumenti web interattivi per la coltivazione di grano sostenibile di alta qualità.

### **Introduzione**

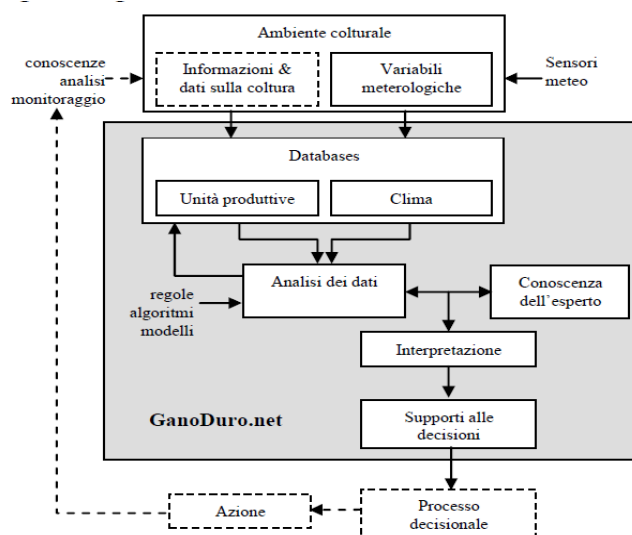
I DSS (Decision Support System) sono stati ideati negli anni '80 e raccolgono, organizzano, interpretano e integrano in modo automatico le informazioni necessarie a soddisfare le più diverse esigenze colturali, siano esse strategiche a lungo termine oppure tattiche da prendere in tempi molto brevi. Essi non hanno la pretesa di sostituirsi al tecnico o all'imprenditore agricolo, ma forniscono loro informazioni aggiuntive per migliorare i processi decisionali relativi alla conduzione agronomica della coltura.

In particolare, i DSS costituiscono uno strumento necessario a fronteggiare il crescente interesse verso sistemi colturali più rispettosi dell'ambiente. L'agricoltura moderna, infatti, conferisce sempre più importanza all'ambito della sostenibilità, puntando a un minore utilizzo di mezzi tecnici, in particolare fertilizzanti e prodotti fitosanitari, e a un minor consumo delle risorse naturali quali acqua, suolo, energia: questo deve conciliarsi però con il raggiungimento di elevati standard produttivi, sia in termini qualitativi sia quantitativi, ed il mantenimento, o preferibilmente l'incremento, dei bilanci economici delle aziende agricole.

### Materiali e metodi

Il servizio è stato disegnato in modo tale che le informazioni relative alla coltura e all'ambiente giungano al DSS attraverso un flusso continuo di informazioni, raccolti tramite sensori agrometeorologici e attività di analisi e monitoraggio. Tali informazioni costituiscono il punto di partenza di un processo che, attraverso l'uso di modelli matematici, porta alla formulazione di supporti decisionali.

In particolare, grano.net® e granoduro.net®, operando con una visione olistica e multidisciplinare, prendono in considerazione tutti gli aspetti chiave del ciclo colturale del frumento tenero e duro per l'ottenimento di un prodotto di qualità, permettendo di tradurre questi complessi processi decisionali in semplici supporti di facile e immediata interpretazione. Granoduro.net® (Fig. 1) è un servizio esclusivo per la filiera del grano duro Barilla.



**Figura 1.** Diagramma concettuale di granoduro.net®. da Meriggi *et al.* (2011).

Il DSS fornisce informazioni inerenti a:

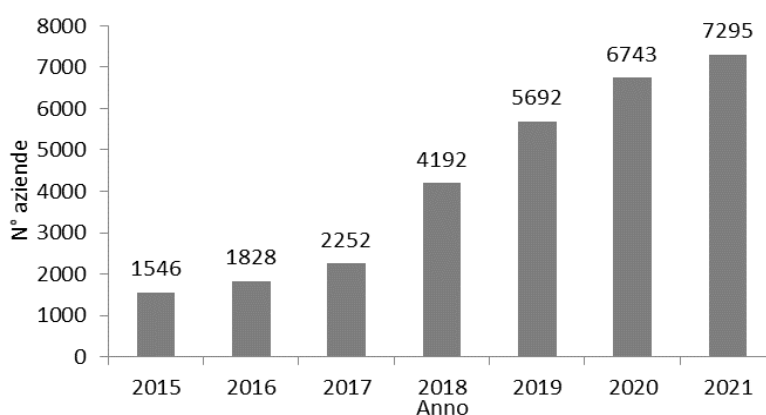
- meteo: Horta gestisce una rete composta da centinaia di stazioni agrometeorologiche distribuite sul territorio. I dati meteo, raccolti tramite un sistema di qualità certificata, forniscono informazioni chiave e in tempo reale utili per il funzionamento dei DSS, quali precipitazione (mm), temperatura (°C), umidità relativa (%) e bagnatura fogliare (si/no)
- consiglio di semina: viene suggerita l'esatta dose di semina in rapporto alla varietà scelta, al tipo di terreno, all'andamento meteorologico, alla localizzazione geografica del campo e alla data di semina
- piano di concimazione: il calcolo dell'azoto da apportare fa riferimento al metodo del bilancio ed è influenzato principalmente dal contenuto in azoto e dalla sostanza organica del terreno, dalla varietà scelta, dal contenuto in azoto solubile nel terreno e dall'andamento climatico dei mesi autunnali e invernali, durante la coltura in atto; vengono forniti anche consigli di

concimazione presemina elaborati attraverso un bilancio tra apporti e asportazioni di elementi nutritivi

- evoluzione rischio di malattie fungine e durata persistenza fungicida: indici di rischio sintetici e di dettaglio consentono di valutare se e quando sia realmente necessario intervenire contro le malattie del grano (septoriosi, ruggine gialla, ruggine bruna, oidio, fusariosi della spiga e micotossine). In questo modo, gli organismi dannosi possono essere controllati in modo efficace, riducendo il numero di interventi
- monitoraggio idrico del suolo e irrigazione: interventi irrigui, seppur raramente effettuati, vengono programmati conoscendo la dotazione idrica del terreno, calcolata in base alle caratteristiche del suolo, all'approfondimento radicale (puntualmente stimato), allo sviluppo della coltura e alle condizioni meteorologiche
- crescita della coltura: il DSS segue il progredire delle fasi fenologiche dall'emergenza alla maturazione della granella e stima la dinamica della produzione di biomassa. Si possono così programmare gli interventi in base allo sviluppo della pianta
- gestione flora infestante: il DSS fornisce indicazioni per il controllo diretto e indiretto delle malerbe. Un cruscotto assiste nell'individuazione del momento migliore per applicare l'erpice strigliatore, mentre un'altra funzionalità permette di scegliere i diserbanti adatti a contenere lo sviluppo delle infestanti presenti nel campo
- Yousustain.net<sup>®</sup>: si tratta di un calcolatore in grado di misurare la sostenibilità del processo produttivo aziendale, basato su indicatori che riguardano la salute umana, l'aria, il suolo, la conservazione della biodiversità, il consumo energetico e l'uso dell'acqua. In questo modo i fruitori del servizio sono in grado di calcolare l'impatto ambientale della loro coltura, operando scelte agronomiche adeguate. Le filiere più sostenibili possono così distinguersi dalle altre raggiungendo gli obiettivi richiesti da un mercato sempre più attento al tema della salvaguardia ambientale.

## Risultati e discussioni

Per il frumento tenero e duro, Horta ha implementato, a partire dal 2011, grano.net<sup>®</sup> e granoduro.net<sup>®</sup>, strumenti web interattivi per la coltivazione di grano sostenibile di alta qualità (Meriggi *et al.*, 2011; Ruggeri *et al.*, 2012). Sono strumenti flessibili, che possono portare vantaggi tangibili a una pluralità di utenti: tecnici, produttori di mezzi tecnici, Organizzazioni di Produttori e conferitori, agricoltori, imprese agro-industriali. Tali utenti hanno contribuito a incrementare notevolmente il numero delle aziende fruitrici del servizio in questi anni, in Italia e all'estero (Fig. 2).



**Figura 2.** Numero di aziende fruitrici di grano.net<sup>®</sup> e granoduro.net<sup>®</sup> dal 2015 al 2021.

Per testare i vantaggi derivanti dall'uso dei DSS, alcuni agricoltori si sono resi disponibili a coltivare una parte della loro terra seguendo i consigli di granoduro.net<sup>®</sup> e la restante seguendo le

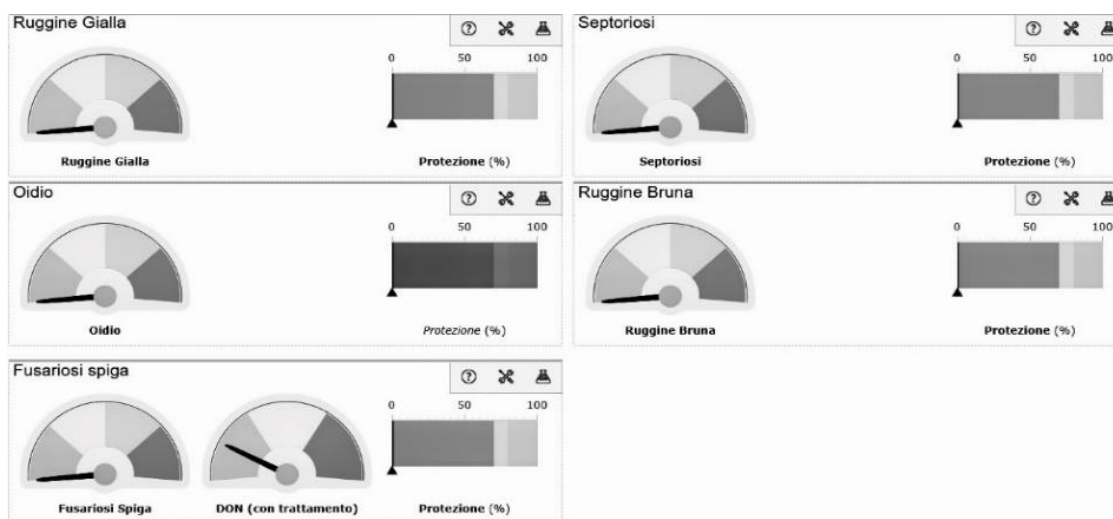
loro pratiche agronomiche di routine, confrontando così una strategia innovativa con una più tradizionale.

È emerso come l'utilizzo di granoduro.net® abbia permesso sia di ridurre i costi di produzione del 9% (in media da 1015 a 926 €/ha), la Carbon Footprint del 16% (da 0,73 a 0,61 t CO<sub>2</sub> eq/t di produzione) e l'utilizzo di fertilizzanti azotati del 20% (da 195 a 155 kg/ha), sia di aumentare la Nitrogen Use Efficiency del 25% (da 31,2 a 39,1 kg di grano/kg di fertilizzante N). Nonostante un minor utilizzo di mezzi tecnici, non sono state registrate differenze significative rispetto alla strategia tradizionale in termini di resa. Questi confronti, proseguiti fino al 2021, hanno evidenziato un incremento medio del tenore proteico dello 0,5%: da 13,7% nella gestione tradizionale a 14,2% con granoduro.net®. La qualità intesa come contaminazione da micotossine, invece, non è mai risultata problematica, in quanto con il DSS abbiamo sempre ottenuto dati notevolmente al di sotto dei limiti di legge.

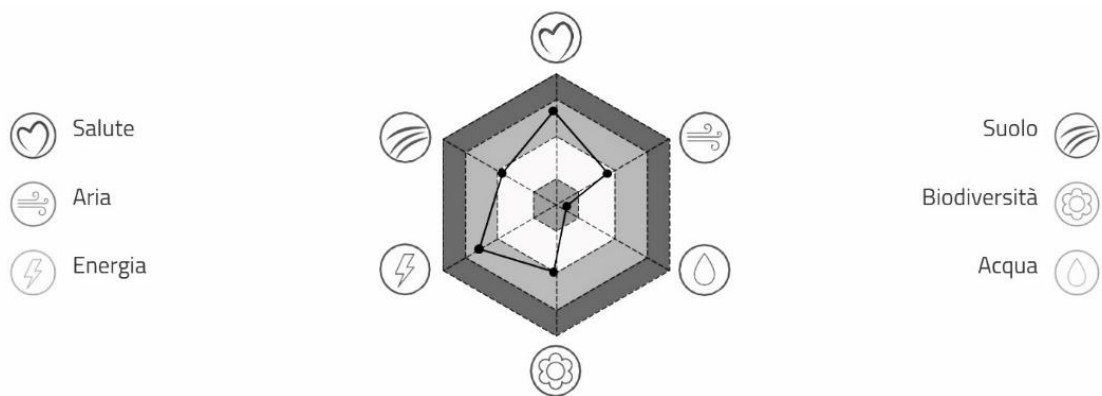
Viene così dimostrata l'importanza dell'utilizzo di strumenti tecnici quali i DSS, a supporto dell'agricoltore nella gestione della coltura, non solo in un'ottica di contenimento dei costi di produzione ma anche di promozione di pratiche sostenibili (Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5).

Apporto (kg N/ha)	Totale	Pre semina	Semina	Emergenza - 3 foglie vere	Metà - fine accestimento	Fine acc. - inizio lev.	Inizio lev. - metà lev.	Fine lev. - bott.	Dalla spigatura in poi
<b>Programmato</b>	<b>130,7</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>28,8</b>	<b>75,8</b>	<b>0,0</b>	<b>26,1</b>	<b>0,0</b>
Distribuito	129,3	0,0	0,0	0,0	30,2	69,0	0,0	30,2	0,0
Da distribuire	1,6	-	-	-	0,0	0,0	-	1,6	-

**Figura 3.** Esempio di piano di concimazione azotata proposto da grano.net® per un'unità produttiva.



**Figura 4.** Esempio di monitoraggio della pressione infettiva delle patologie fungine in grano.net®. All'interno di ogni riquadro, i contatori a sinistra esprimono la situazione attuale del rischio di malattia, mentre quelli a destra indicano il livello di efficacia dell'ultimo trattamento effettuato.



**Figura 5.** Cruscotto di Yousustain.net<sup>®</sup> che descrive la sostenibilità del processo produttivo aziendale.

### **Bibliografia**

- Meriggi P., Salinari F., Giosuè S., Ruggeri M. 2011. GranoDuro.net<sup>®</sup>: un servizio web per le aziende agricole. Conference proceedings XIV Convegno Nazionale di Agrometeorologia “Agrometeorologia per l’azienda agraria”, Patron Editore Bologna (Italy), 2011.
- Ruggeri M., Meriggi P., Ruini L., Zerbini M., Sessa F., Marino M., Rossi V. 2012. Granoduro.net<sup>™</sup>: a web-based decision support system to improve durum wheat sustainability. International MPU Workshop “Plant Protection for the Quality and Safety of the Mediterranean Diet”. 24th-26th October 2012, Bari, Italy.

## **Cereali e prodotti derivati nelle abitudini alimentari di un gruppo di adolescenti italiani durante la pandemia da Covid-19**

M. Mattera\*, M. Zaccaria

Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di Ricerca Alimenti e Nutrizione (CREA-AN), Via Ardeatina 546, 00178 Roma (RM).

\*E-mail: [maria.mattera@crea.gov.it](mailto:maria.mattera@crea.gov.it)

### **Abstract**

During the COVID-19 pandemic, a rapid change in the lifestyles and eating habits of the population occurred in Italy, with different effects depending on the age group considered. An observational study (March to April 2020) was performed on a group of young students (n=170; 15-19-year-old), recruited within the framework of the Italian Program for job training in High School (*Alternanza Scuola Lavoro*). In detail, the activities fell within the nutrition education project organized by CREA Research Centre for Food and Nutrition in collaboration with three High Schools in Rome. The present study shows some results regarding the eating habits of the sample, with a focus on the consumption of foods belonging to the "cereals and cereal products" group. Qualitative analysis of consumption frequencies (*Food Frequency Questionnaire-FFQ*), adherence to the Mediterranean Diet (*KIDMED test*), and quantitative analysis of energy and main nutrients consumed (dietary intake), recorded through a food diary (3-days of detection), were performed. A scarce adherence to the Mediterranean Diet among adolescent emerged: the *KIDMED scores* were found optimal only for 37.6% of the sample, with higher percentages in girls than boys (43.8% vs 32.2%); in addition, food consumption (food items and frequency) was inadequate to their recommended needs. The preferences emerged in the context of food consumption in a pandemic period, and related to cereals and cereal products, may suggest new ideas for the development of more targeted food education strategies in this age group.

### **Riassunto**

Durante la pandemia di COVID-19 si è verificato un rapido cambiamento in Italia negli stili di vita e nelle abitudini alimentari della popolazione, con effetti diversi a seconda della fascia di età considerata. È stato condotto uno studio osservazionale (marzo - aprile 2020) su un gruppo di giovani studenti (n=170; 15-19 anni) reclutati nell'ambito del programma italiano per la formazione al lavoro nelle Scuole Superiori (*Alternanza Scuola Lavoro*). In particolare, le attività sono rientrate nel progetto di educazione alimentare organizzato dal CREA Centro di Ricerca Alimenti e Nutrizione in collaborazione con tre Scuole Superiori di Roma. Il presente studio mostra alcuni risultati riguardanti le abitudini alimentari del campione, con un focus sul consumo di alimenti appartenenti al gruppo "cereali e prodotti a base di cereali". Sono state eseguite l'analisi qualitativa delle frequenze di consumo (*Questionario Alimentare di Frequenza-FFQ*), l'aderenza alla Dieta Mediterranea (*test KIDMED*) e l'analisi quantitativa dell'energia e dei principali nutrienti consumati (assunzione dietetica) registrati attraverso un diario alimentare (3 giorni di rilevazione). È emersa una scarsa aderenza alla Dieta Mediterranea tra gli adolescenti: i punteggi *KIDMED* sono stati trovati ottimali solo per il 37,6% del campione, con percentuali più alte nelle ragazze rispetto ai ragazzi (43,8% vs 32,2%); inoltre, il consumo di cibo (tipologie alimentari e frequenza) era inadeguato ai bisogni raccomandati. Le preferenze emerse nel contesto del consumo alimentare in un periodo di pandemia, e relative a cereali e prodotti a base di cereali, possono suggerire nuove idee per lo sviluppo di strategie di educazione alimentare più mirate in questa fascia di età.

## Introduzione

L'alimentazione può influenzare lo stato di salute di un individuo e della popolazione nel suo complesso. In Italia durante il *lockdown* indotto dalla pandemia da COVID-19 si è assistito a rapide e importanti modificazioni negli stili di vita e nelle abitudini alimentari della popolazione con effetti diversi a seconda della fascia d'età considerata: in particolare si è osservato un generale miglioramento della qualità della dieta e una maggiore aderenza alla Dieta Mediterranea (Lotti *et al.*, 2022) che tuttavia, rimane ancora scarsa nei bambini (Censi *et al.*, 2021). In questo contesto si presentano i principali risultati, con un focus specifico sul consumo di alimenti appartenenti al gruppo "cereali e prodotti derivati", di uno studio osservazionale sulle abitudini alimentari e l'aderenza alla Dieta Mediterranea di un gruppo di studenti adolescenti italiani.

## Materiali e metodi

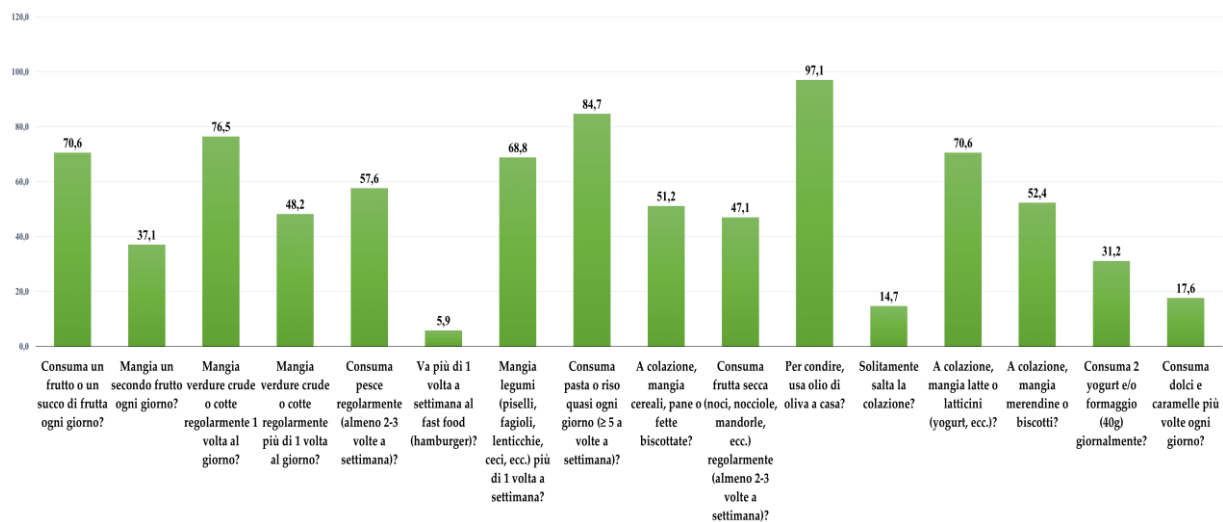
Gli studenti (n=170; 90 maschi e 80 femmine) di età 15-19 anni, sono stati reclutati nell'anno scolastico 2020-21 nell'ambito delle attività previste in un progetto di educazione alimentare, realizzato dal Centro di ricerca CREA-Alimenti e Nutrizione in convenzione con 3 istituti di istruzione secondaria di secondo grado di Roma (1 Istituto Tecnico Agrario e 2 Licei), inserito in un Percorso per le Competenze Trasversali e per l'Orientamento (P.C.T.O.), anche noto in Italia come "Alternanza Scuola Lavoro, dal titolo "*Manuale di istruzioni*" per costruire nell'adolescenza un modello alimentare salutare e sostenibile". Tutti i partecipanti inclusi nello studio, provenienti da 9 classi (dalla III alla V), hanno firmato un consenso informato (genitori/rappresentanti legali per gli studenti minorenni) e dopo essere stati adeguatamente istruiti (lezioni teorico-pratiche) nel periodo marzo – aprile 2021 hanno compilato un:

1. Questionario Alimentare di Frequenza per l'analisi qualitativa dei consumi alimentari riferiti all'intero anno precedente (2020) composto da 115 voci, di cui si riportano i risultati relativi a 17 voci per il gruppo cereali e derivati,
2. KIDMED test (*Mediterranean Diet Quality Index for children and adolescents*): un questionario specifico per la popolazione con età 2-24 anni, contenente 16 domande (Fig. 1) con cui è stato calcolato l'indice di Aderenza alla Dieta Mediterranea (Serra-Majem *et al.*, 2004),
3. Diario alimentare (3 giorni di rilevamento: 2 giorni feriali e 1 festivo) con cui è stato stimato l'apporto medio in energia e principali nutrienti di ciascun partecipante. Per l'analisi quantitativa dei dati di consumo alimentare - apporto medio in energia (kcal/die) e principali nutrienti (carboidrati, grassi e proteine: g/die) è stato utilizzato il software *WinFood versione 3.9 (Medimatica)*, mentre per la stima teorica dei fabbisogni di energia e nutrienti specifici per sesso, fascia d'età e livello di attività fisica, i Livelli di Assunzione di Riferimento di Nutrienti ed energia per la popolazione italiana (LARN IV Revisione, SINU 2014), utilizzando per il calcolo del fabbisogno individuale di proteine (g/die) il peso reale (se normopeso) o teorico (sottopeso, sovrappeso, obeso) differenziato per sesso e fascia d'età (15-17 anni; 18 -29 anni).

## Risultati e discussione

In Figura 1 sono mostrate le risposte (%) ottenute dalla popolazione di studenti oggetto di studio per le singole componenti su cui si basa l'indice KIDMED.

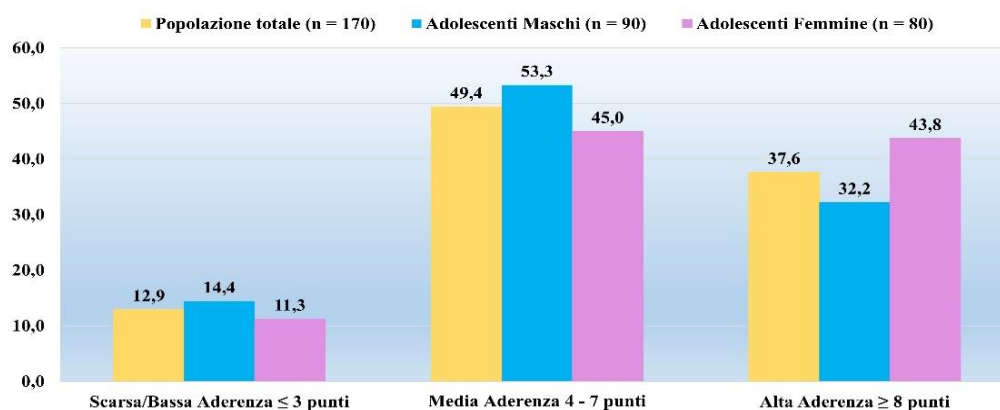




**Figura 1.** Singole componenti dell'indice *KIDMED*: risposte affermative (%) ottenute da una popolazione (n =170) di adolescenti italiani (15-19 anni).

L'aderenza alla Dieta Mediterranea è associata ad una migliore qualità dell'alimentazione e a numerosi benefici per la salute (Sofi *et al.*, 2010) a tutte le età, tuttavia, nel nostro studio si evidenzia che, anche in un periodo di parziale *lockdown* indotto dalla pandemia da Covid-19, gli adolescenti (Fig. 1) non rinunciano al consumo di alimenti da *fast food* (5,9%), saltano regolarmente la colazione (14,7%) e, quando la consumano, preferiscono maggiormente merendine e/o biscotti prodotti industrialmente (52,4%).

Tra i cereali, pasta o riso sono consumati più di 5 volte a settimana dall'84,7% della popolazione in studio, ma a fronte di un aumentato consumo di frutta secca (47,1%) rispetto al passato, il consumo giornaliero di frutta e verdura non rispetta le porzioni raccomandate (5 porzioni/die) nelle Linee guida per una sana alimentazione (2019), consumate più di una volta al giorno rispettivamente dal 37,1 % e 48,2 % degli adolescenti.



**Figura 2.** Aderenza alla Dieta Mediterranea (*KIDMED score*) nella popolazione (n =170) di adolescenti italiani (15-19 anni), differenziata anche in base al sesso.

Nel complesso ne consegue, per questa fascia di età, un indice di aderenza alla Dieta Mediterranea (Fig. 2) non ottimale, ma migliore rispetto al passato: nella popolazione in studio-prevale infatti, un'aderenza media al modello alimentare mediterraneo (49,4%), mentre solo il 37,6% degli adolescenti ha un'aderenza ottimale, maggiore tra le ragazze (43,8% vs 32,2%).

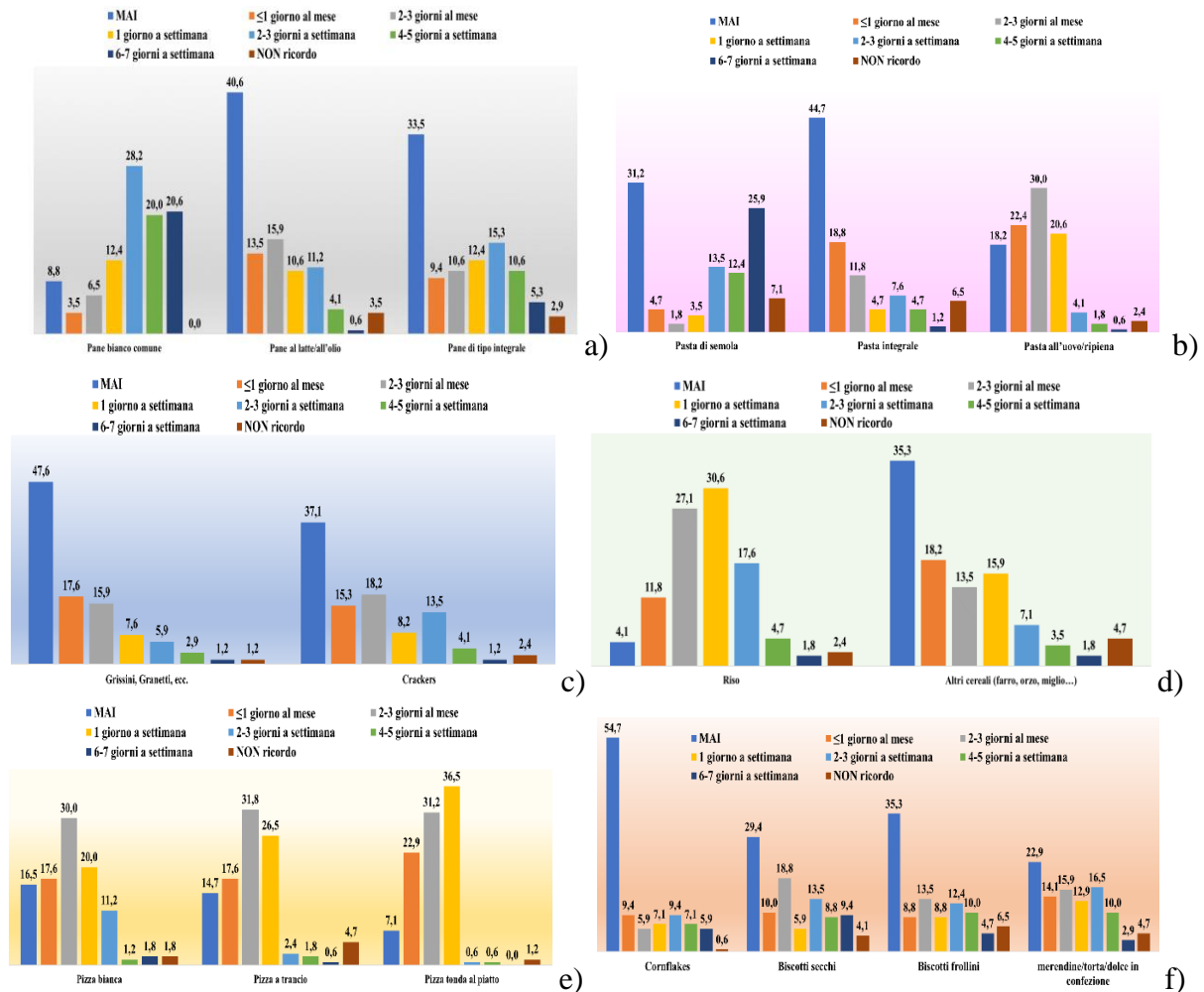
Una dieta di bassa qualità si caratterizza per un apporto minore di alimenti salutari provenienti dai diversi gruppi alimentari come ad es. frutta e verdura, cereali integrali e/o di nutrienti chiave quali gli acidi grassi della serie omega-3 e fibra alimentare, con una maggiore assunzione di cibi ricchi di energia e poveri di nutrienti come carni lavorate, bevande zuccherate, grassi saturi e di tipo *trans* e alimenti ricchi in sodio.

L'analisi dei consumi alimentari stimata quantitativamente dai diari ha evidenziato un'assunzione di energia (kcal/die) mediamente inferiore, rispetto ai fabbisogni giornalieri raccomandati per sesso, età e attività fisica svolta (1225-3490 kcal/die vs fabbisogno teorico calcolato 2616-3874 kcal/die per i maschi; 839-3493 kcal/die vs 2083-3144 kcal/die per le femmine), superiore solo in rari casi. Ciò potrebbe essere spiegato in parte dalla sottostima dei consumi individuali per una incompleta/errata compilazione del diario alimentare (auto-compilato) sia ad una più preoccupante tendenza in questa fascia d'età, molto simile tra i due sessi, a ridurre l'apporto calorico giornaliero per evitare eccessi ponderali (soprattutto di alimenti fonte di carboidrati di tipo complesso) e/o ad aumentare il consumo di alimenti fonte di proteine e/o di integratori per sviluppare maggiore massa muscolare. La dieta consumata dagli adolescenti in studio risulta infatti, particolarmente ricca in proteine (intervallo 47-190 vs 30-151 g/die, maschi vs femmine) con quantità spesso in eccesso rispetto agli apporti raccomandati stimati (g/die) in base al peso (peso reale o teorico) al sesso e alla fascia d'età (47,0 -79,0 g/die e 39,0 -63,0 g/die, maschi vs femmine) e in lipidi (in media 82,0 vs 68,0 g/die, maschi vs femmine), mentre è scarsa nell'apporto giornaliero di carboidrati soprattutto di tipo complesso (in media 257,0 g/die maschi vs 193,0 g/die femmine) come si evidenzia dalla ridotta frequenza di consumo di alimenti appartenenti al gruppo dei cereali e derivati che, al pari di frutta e verdura ne rappresentano una buona fonte.

In Figura 3 (lettere a-f) si riportano le frequenze qualitative di consumo (%) rilevate per il gruppo cereali e prodotti derivati.

Si evidenzia una maggiore preferenza (6-7 giorni a settimana) per il pane bianco comune rispetto al pane integrale (20,6% vs 5,3%), per la pasta di semola rispetto alla pasta integrale o al riso (25,9% vs 1,2% vs 1,8%), quest'ultimo consumato almeno una volta a settimana dal 30,6% dei partecipanti e preferito ad altri cereali (15,9%).

Infine, in alcune categorie, come i prodotti da forno e i cereali da colazione (biscotti e *cornflakes*) la frequenza di assunzione è risultata più bassa rispetto a tipologie di prodotti industriali/confezionati quali merendine/torte/dolci, che soltanto il 22,9% degli adolescenti non consuma "mai", come si evidenzia anche dai risultati del *KIDMED* test dove il 52,4% di chi regolarmente consuma la prima colazione, preferisce prodotti confezionati di origine industriale (merendine e/o biscotti). Le preferenze espresse nell'ambito dei consumi alimentari in un periodo di pandemia, qui presentate relativamente al gruppo "cereali e prodotti derivati" possono suggerire nuovi spunti per lo sviluppo di strategie di educazione alimentare più mirate per questa fascia d'età.



**Figura 3.** Frequenze qualitative di consumo (%) di alimenti appartenenti al gruppo cereali e prodotti derivati (lettere a-f) rilevate nella popolazione di adolescenti (n =170; 15-19 anni) in studio.

## Bibliografia

- Cabrera S. G., Fernández N. H., Hernández C. R., Nissensohn M., Román-Viñas B., Serra-Majem L. 2015. KIDMED test; prevalence of low adherence to the Mediterranean Diet in children and young; a systematic review. *Nutricion hospitalaria*, 32(6), 2390-2399. DOI: [10.3305/nh.2015.32.6.9828](https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.6.9828)
- Censi L., Ruggeri S., Galfo M., Buonocore P., Roccaldo R. 2022. Eating behaviour, physical activity and lifestyle of Italian children during lockdown for COVID-19. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 73(1): 93-105. <https://doi.org/10.1080/09637486.2021.1921127>
- Linee Guida per una sana alimentazione (Ed. 2018, pubb.nov.2019 Centro di ricerca CREA Alimenti e Nutrizione) <https://www.crea.gov.it/web/alimenti-e-nutrizione/-/linee-guida-per-una-sana-alimentazione-2018>
- Livelli di Assunzione di Riferimento di Nutrienti ed energia per la popolazione italiana (LARN) IV Revisione, Ed. Società Italiana di Nutrizione Umana (SINU), 2014.
- Lotti S., Dinu M., Pagliai G., Giangrandi I., Colombini B., Sofi F. 2022. Adherence to the Mediterranean diet increased during the COVID-19 lockdown in Italy: results from the web-based Medi-Lite questionnaire. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 1-7. <https://doi.org/10.1080/09637486.2021.2025213>
- Serra-Majem L., Lourdes R., Joy N., Rosa M. O., García A., Pérez-Rodrigo C., Aranceta J. 2004. Food, youth and the Mediterranean diet in Spain. Development of KIDMED, Mediterranean Diet Quality Index in children and adolescents. *Public health nutrition*, 7(7), 931-935. DOI: <https://doi.org/10.1079/PHN2004556>
- Sofi F., Abbate R., Gensini G. F., Casini A. 2010. Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition*, 92(5): 1189-1196. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.29673>

## **Valutazione del contenuto di acrilammide nella pizza napoletana STG**

*M. Quiquero<sup>1\*</sup>, S. Iacovino<sup>1</sup>, M. Angelicola<sup>1</sup>, A. Reale<sup>2</sup>, M. C. Messia<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Dipartimento Agricoltura, Ambiente ed Alimenti (DiAAA), Università degli Studi del Molise, Via Francesco De Sanctis, 86100 Campobasso (CB).

<sup>2</sup>Istituto di Scienze dell'Alimentazione, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Roma 64, 83100 Avellino (AV).

\*E-mail: [m.quiquero@studenti.unimol.it](mailto:m.quiquero@studenti.unimol.it)

### **Abstract**

Acrylamide is a chemical compound classified as potential carcinogenic to humans (IARC, group 2a) and as genotoxic and neurotoxic to animals. Acrylamide originates from asparagine and reducing sugars during the cooking process, at temperatures above 120°C and low humidity, in foods rich in these precursors. In 2015, the European Food Safety Authority (EFSA) defined the presence of acrylamide in food a public health concern and recommended the need to identify measures to reduce consumer exposure to this substance.

In this context, the acrylamide content of Neapolitan pizza, an iconic product of Italian gastronomy and culture, was investigated in the present work. Specifically, acrylamide formation was evaluated in different Neapolitan pizza sections (outer part, inner part, slice) with a topping of tomato sauce and without any of topping. Moreover, different doughs rising times (16, 24 and 48 hours) and the use of selected strains of lactic acid bacteria in combination with the conventional yeast, as possible mitigation strategy for acrylamide formation, were evaluated.

### **Riassunto**

L'acrilammide è un composto classificato come potenzialmente cancerogeno per l'uomo e genotossico e neurotossico per gli animali. L'acrilammide si origina a partire da asparagina e zuccheri riducenti durante il processo di cottura a temperature superiori a 120°C e bassa umidità, in alimenti ricchi di tali precursori.

Nel 2015 l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ha definito la presenza di acrilammide negli alimenti un problema di salute pubblica, raccomandando la necessità di individuare misure per ridurre l'esposizione dei consumatori a tale sostanza.

In tale contesto, nel presente lavoro, è stato indagato il contenuto di acrilammide in un prodotto cardine del patrimonio gastronomico e culturale italiano, la pizza napoletana.

In particolare, la formazione del composto è stata valutata in diverse sezioni di pizza (cornicione, parte interna, spicchio) con e senza la presenza di topping. Sono stati altresì valutati tempi di lievitazione differenti (16, 24 e 48 ore) e l'utilizzo di ceppi di batteri lattici selezionati in aggiunta al lievito tradizionale, come possibile strategia di mitigazione della formazione di acrilammide.

### **Introduzione**

L'acrilammide, composto potenzialmente cancerogeno per l'uomo (IARC, gruppo 2A) e genotossico e neurotossico per gli animali, costituisce un problema di salute pubblica (EFSA, 2015) relativo all'eventuale associazione tra la sua presenza negli alimenti e rischio di sviluppo di cancro. L'acrilammide si forma naturalmente negli alimenti amidacei durante le usuali cotture ad alta temperatura (frittura, cottura al forno e alla griglia, e anche trasformazione industriale a più di 120°C e bassa umidità). Tra gli alimenti ricchi di precursori dell'acrilammide (asparagina e zuccheri riducenti) rientrano i prodotti a base di cereali, il cui processo di produzione a temperature elevate favorisce la reazione di Maillard, principale via di formazione del composto.

Tra i prodotti da forno potenzialmente esposti alla formazione di acrilammide rientra la pizza napoletana, per via della naturale composizione degli ingredienti e per le elevate temperature raggiunte nei forni.

Pertanto, questo studio ha inteso indagare sulla formazione di acrilammide nella pizza napoletana, un prodotto riconosciuto dall'Unesco come Patrimonio Culturale Immateriale dell'Umanità. Nell'indagine sono stati presi in considerazione anche i dati che riguardano l'assunzione giornaliera di pizza in Italia pari a 27 g/giorno in una popolazione di riferimento di giovani di età compresa tra 19 e 30 anni (Altissimi et al., 2017). Da qui, inoltre, la necessità di individuare misure per ridurre l'esposizione dei consumatori a tale sostanza al livello più basso ragionevolmente raggiungibile secondo le disposizioni del regolamento della commissione europea 2017/2158. In particolare, come possibile strategia di mitigazione della formazione di acrilammide, è stato valutato l'impiego di differenti tempi di lievitazione dell'impasto e l'utilizzo di starter microbici selezionati.

## **Materiali e metodi**

### **Ceppi microbici**

I ceppi di batteri lattici (LAB) *Levilactibacillus brevis* A6, *Leuconostoc pseudomesenteroides* D4, *Lactobacillus sanfranciscensis* SB52 appartenenti alla Collezione microbica dell'Istituto di Scienze dell'Alimentazione del Consiglio Nazionale delle Ricerche (Avellino) sono stati impiegati come starter per la produzione delle pizze (Reale et al., 2020).

Per la preparazione dell'inoculo, i ceppi sono stati coltivati singolarmente in MRS broth (Oxoid, Milano, Italia), a pH 6,8, per circa 16 ore a 28°C fino alla fase di crescita esponenziale (~16 h). Le cellule coltivate sono state recuperate mediante centrifugazione (12.000 × g, 5 min, 4°C), lavate con tampone fosfato di potassio da 20 mmol/L (pH 7,0) ed inoculate nell'impasto ad una concentrazione di circa 5 log ufc/g.

### **Impasti**

Gli impasti per pizza sono stati preparati mescolando 1200 mL di acqua, 2300 g di farina di grano tenero tipo 00 (Mulino Caputo, Napoli), 2% cloruro di sodio e starter microbico.

In particolare, sono stati realizzati due impasti differenti: (L) impasto tradizionale con lievito di birra commerciale all'1% (controllo); (L+S) impasto con batteri lattici (5log ufc/g) + lievito di birra commerciale all'1% (pari a circa 6 log ufc/g). Gli impasti sono stati incubati a 25°C ± 2°C fino a 48h di lievitazione. A tempo zero e dopo 16, 24, e 48 ore di fermentazione gli impasti sono stati analizzati per pH, acidità totale titolabile (TTA), conteggi di lieviti e batteri lattici, produzione di acido lattico, acido acetico ed etanolo.

Il pH e l'acidità totale titolabile (TTA) sono stati misurati su 10 g di impasto omogeneizzato con 90 mL di acqua bidistillata mediante Stomacher (Bag Mixer 400, Interscience, Francia). Il pH è stato misurato con un pH-metro BASIC 20 (Crison Instruments, Spagna). L'acidità è stata espressa come la quantità (in mL) di 0,1 mol/L NaOH necessari per arrivare a pH 8,3.

L'acido lattico, l'acido acetico e l'etanolo sono stati misurati mediante RIDA@CUBE Instrument rispettivamente con i kit enzimatici D-/L-Lactic acid-RCS4240; Acetic acid-RCS4226 ed Ethanol-RCS4340 (R-Biopharm, Italia), seguendo le istruzioni del produttore e utilizzando le diluizioni appropriate. I risultati sono stati espressi come g/Kg.

Inoltre, al fine di valutare l'effetto del tempo di lievitazione dell'impasto sulla formazione di acrilammide nel prodotto finito, gli impasti sono stati cotti in forno a legna a circa 450°C per circa 90s dopo 16, 24 e 48 ore di fermentazione ed analizzati per il contenuto di acrilammide.

### **Pizza napoletana**

Al fine di valutare la sola influenza del topping sulla formazione di acrilammide, gli impasti realizzati secondo la ricetta tradizionale sono stati destinati alla produzione di campioni di pizza senza alcun condimento (PB, pizza bianca) e con topping di salsa al pomodoro (PP, pizza con topping di salsa al pomodoro). Dopo cottura in forno a legna (450°C per 90s), i campioni di pizza sono stati analizzati per la valutazione del contenuto di acrilammide.

## Acrilammide

### Estrazione del campione

I campioni di pizza napoletana sono stati liofilizzati con liofilizzatore Virtis Genesis 25ES e sottoposti ad una fase di estrazione (4g di campione sono stati addizionati di 40 mL di acqua e tenuti in agitazione su bagnetto basculante Ika Hs 260 basic per 15 minuti; dopo centrifugazione a 4000 rpm per 15 minuti, il surnatante è stato filtrato con filtro Whatman n.4). Dopo la purificazione con cartucce Oasis HLB SPE (6ml, 200 mg, Waters, Milford, MA, USA), il campione è stato recuperato con 2 mL di acqua e iniettato in HPLC-UV per la rilevazione e la quantificazione dell'acrilammide. Per ogni campione, l'acrilammide è stata quantificata nella parte interna, nella parte esterna e nello spicchio.

### Condizioni cromatografiche

La determinazione quali-quantitativa dell'acrilammide è stata condotta con HPLC-UV (Ultimate 3000, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) con rivelatore UV-Vis. La separazione è stata ottenuta con una colonna ad esclusione ionica IonPac ICE AS1 9 x 250mm (Dionex Corporation) ad una lunghezza d'onda di 202nm, usando come fase mobile acqua/acetonitrile (v/v) H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CH (94:6) con flusso di 1,0 mL/min. In tali condizioni, il tempo totale della corsa era di 30 min e il picco relativo all'acrilammide compariva a 18 min. I cromatogrammi sono stati elaborati tramite l'utilizzo di Chromeleon versione 6.6 (Dionex).

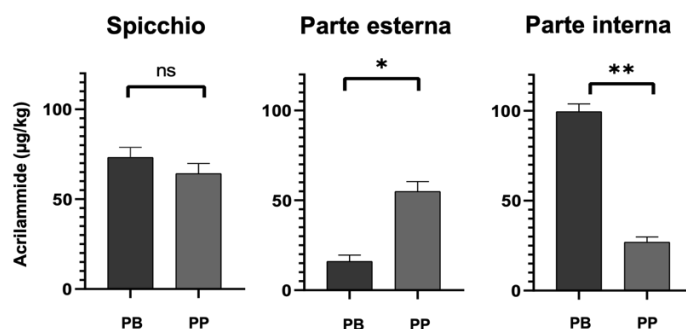
### Conteggi microbici

I batteri lattici sono stati contati utilizzando il substrato MRS Agar (Oxoid) integrato con 40 mg/L di actidione. Le piastre sono state incubate in anaerobiosi (AnaeroGen e AnaeroJar; Oxoid; Basingstoke, Hampshire, Regno Unito) a 28°C per 48h. I lieviti sono stati contati su YPD (20 g/L di glucosio, 20g/L di peptone batteriologico, 10g/L di estratto di lievito, 20g/L di agar) integrato con cloramfenicolo (0,1g/L) dopo incubazione a 28°C per 72h.

## Risultati e discussione

### Valutazione del contenuto di acrilammide ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) nelle diverse tipologie di pizza (con e senza topping di salsa al pomodoro)

I dati sul contenuto di acrilammide in pizza senza condimento (PB) e pizza con topping di salsa al pomodoro (PP) sono riportati nella Figura 1.



**Figura 1.** Contenuto di acrilammide ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) in PB e PP (unpaired t test (Welch's correction) \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$ ).

I risultati evidenziano che, nella parte interna della pizza, l'assenza di condimento ha determinato una formazione di acrilammide significativamente più elevata ( $p < 0.01$ ) rispetto alla pizza con topping di salsa al pomodoro. Nella parte esterna, al contrario, il contenuto di acrilammide è risultato più elevato nei campioni di pizza con topping ( $p < 0.05$ ) rispetto alle parti esterne di campioni senza alcun condimento. Nello spicchio intero, che è la parte rappresentativa della pizza così come viene abitualmente consumata, non è stata rilevata una differenza significativa nel contenuto di acrilammide delle due tipologie di campioni.

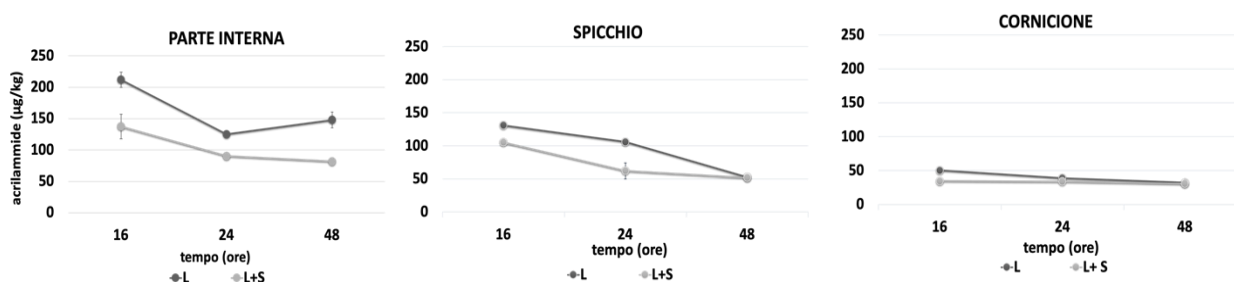
Un primo fattore da considerare per giustificare tali risultati è lo spessore del prodotto, che determina il grado di essiccazione durante la cottura e di conseguenza la velocità di formazione dell'acrilammide: da questo punto di vista si spiega il contenuto più elevato di acrilammide della parte interna, più sottile, della pizza senza condimento (circa sei volte superiore a quello della parte esterna, 99  $\mu\text{g}/\text{kg}$  versus 16  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). D'altra parte, la pizza con condimento di salsa di pomodoro ha mostrato nella parte interna più sottile un valore di acrilammide pari a circa la metà del valore della parte esterna, più spessa (26  $\mu\text{g}/\text{kg}$  versus 55  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Questo diverso comportamento potrebbe essere spiegato dall'effetto della salsa di pomodoro sull'umidità della pizza; infatti, la maggiore umidità, potrebbe influenzare il tempo di latenza necessario al prodotto per raggiungere la temperatura del forno, ritardando l'innesco della reazione che porta alla formazione di acrilammide.

Inoltre, un altro fattore da considerare è il possibile effetto determinato dalla componente antiossidante eventualmente presente nel pomodoro (Dini *et al.*, 2021), che potrebbe influenzare la formazione di acrilammide.

### Formazione di acrilammide in pizze ottenute da lievitazioni prolungate e tramite utilizzo di LAB

I grafici mostrano l'andamento della formazione di acrilammide nei campioni di pizza lievitati per 16, 24 e 48 ore, ottenuti utilizzando la ricetta tradizionale (L) e tramite l'aggiunta di starter di LAB (L+S) (Fig. 2).



**Figura 2.** Acrilammide ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) in diverse sezioni di pizza napoletana cotta in forno a legna

In primo luogo, è interessante notare che, all'aumentare del tempo di lievitazione, si assiste ad un decremento della formazione di acrilammide in tutte le sezioni della pizza analizzate.

I dati evidenziano che la parte interna della pizza, a causa dello spessore più ridotto rispetto al cornicione, può essere considerata, nel caso di mancata aggiunta di salsa di pomodoro, come la più soggetta alla formazione di acrilammide. La lievitazione condotta con lievito e lattobacilli concorre ulteriormente alla diminuzione del contenuto di acrilammide (con una diminuzione media del -35%), che risulta più marcata dopo 48 ore.

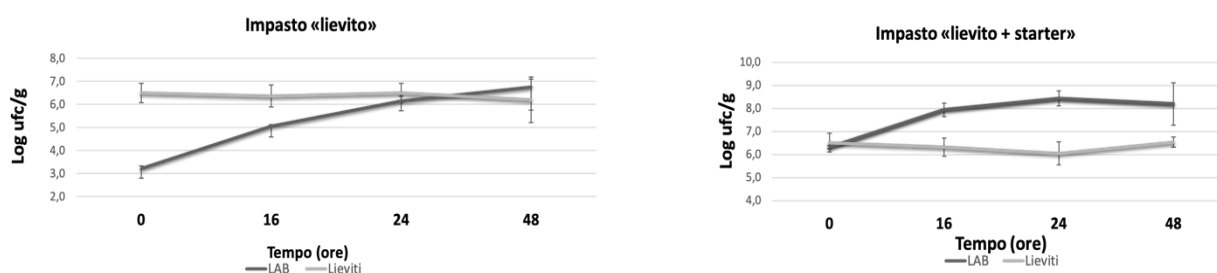
La riduzione della formazione di acrilammide potrebbe essere spiegata con l'abbassamento del pH in seguito alla produzione di acidi organici durante la fermentazione e al consumo di precursori dell'acrilammide durante la crescita dei microrganismi. I valori di pH e la produzione di acidi organici (acido lattico, etanolo e acetico) sono riportati in Tabella 1. I valori di pH degli impasti L+S raggiungevano valori di pH più bassi rispetto ai campioni controllo (L), rispettivamente 3,9 e 5,1 dopo 48 ore di fermentazione. Congiuntamente alla diminuzione di pH negli impasti si è osservato un forte aumento nei campioni L+S di acido lattico e acido acetico.



**Tabella 1.** Valori di pH, acidità totale titolabile e contenuto in acido lattico, acetico ed etanolo (g/kg) in impasti inoculati con lievito di birra (L) e lievito di birra + starter (L+S) a tempo zero e dopo 16, 24 e 48h di fermentazione.

Parametro	t0		t16		t24		t48	
	L	L+S	L	L+S	L	L+S	L	L+S
pH	6.10	6.10	5.70	4.80	5.80	4.40	5.10	3.90
	± 0.00	± 0.10	± 0.00	± 0.80	± 0.30	± 0.40	± 0.50	± 0.10
Acidità totale titolabile (mL NaOH 0.1 N)	1.60	1.70	2.00	4.60	2.10	6.40	3.20	8.20
	± 0.10	± 0.10	± 0.10	± 3.70	± 0.10	± 2.30	± 1.40	± 0.30
Acido lattico (g/Kg)	0.00	0.00	0.00	4.02	0.04	5.67	2.02	6.10
	± 0.00	± 0.00	± 0.00	± 0.20	± 0.01	± 0.20	± 0.20	± 0.30
Acido acetico (g/Kg)	0.15	0.16	0.14	0.40	0.32	0.56	0.69	0.67
	± 0.10	± 0.10	± 0.10	± 0.10	± 0.10	± 0.10	± 0.20	± 0.10
Etanolo (g/Kg)	0.39	0.35	16.70	15.80	22.03	18.05	20.12	10.98
	± 0.20	± 0.20	± 2.40	± 2.70	± 1.00	± 2.30	± 0.90	± 1.70

Durante la lievitazione, il campione controllo (L) presentava una concentrazione costante di lieviti (circa 6 log ufc/g), mentre i batteri lattici autoctoni da valori pari a circa 3 log ufc/g aumentavano fino a raggiungere 7 log ufc/g dopo 48h di fermentazione. I campioni prodotti con starter selezionato presentavano, invece, una concentrazione costante di lievito ed un drastico aumento di batteri lattici durante la lievitazione, da 6 log ufc/g a 8 log ufc/g. In particolare, i batteri lattici inoculati mostravano una spiccata capacità di resistere a pH bassi (L+S) (Fig. 3).



**Figura 3.** Valori di lieviti e batteri lattici (LAB) in impasti prodotti con lievito di birra (Lieviti) e lievito di birra + starter (LAB) a tempo zero e dopo 16, 24, 48h di fermentazione.

Si può concludere che lievitazioni prolungate, congiuntamente all'utilizzo di starter di batteri lattici selezionati, possano essere utili a mitigare la formazione di acrilammide nella pizza napoletana, sebbene ulteriori studi siano necessari per confermarne l'efficacia.

## Bibliografia

- Altissimi M. S., Roila R., Branciarri R., Miraglia D., Ranucci D., Framboas M., Haouet N. 2017. Contribution of street food on dietary acrylamide exposure by youth aged nineteen to thirty in Perugia, Italy. *Italian Journal of Food Safety*, 6 (3): 103-105.
- Dini I., Izzo L., Graziani G., Ritieni A. 2021. The Nutraceutical Properties of "Pizza Napoletana Marinara TSG" a Traditional Food Rich in Bioaccessible Antioxidants. *Antioxidants*, 10(3): 495-509.
- EFSA 2015. Scientific Opinion on Acrylamide in food. *EFSA Journal*, 13: 4104.
- Reale A., Zotta T., Ianniello R.G., Mamone G., Di Renzo T. 2020. Selection criteria of lactic acid bacteria to be used as starter for sweet and salty leavened baked products. *LWT-Food Science and Technology*, 133: 110092.

Questo studio è stato svolto nell'ambito del progetto PRIN 2017SFTX3Y "The Neapolitan pizza: processing, distribution, innovation and environmental aspects"



## **Promuovere la metrologia negli alimenti e nella nutrizione: l'infrastruttura METROFOOD per i cereali**

*L. Gazza\*, M. Carcea, M. Masci, V. Terzi, P. Vaccino*

Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Via della Navicella 2/4, 00184 Roma (RM).

\*E-mail: [laura.gazza@crea.gov.it](mailto:laura.gazza@crea.gov.it)

### **Abstract**

The METROFOOD project aims at creating a European research infrastructure intended to improve the food measurements reliability and make data, information, and metrological tools available to consumers, companies, and institutions, in order to improve excellence in food quality and safety, strengthening scientific knowledge and promoting cooperation of the whole Community. METROFOOD should be understood as an infrastructure characterized by a multidisciplinary approach that integrates the multiple players skills in the entire supply chain, from primary production to final consumption (from-farm-to-fork). The general objective of the project is to integrate and harmonize scientific research in the food quality and safety sector and to promote metrology for food and nutrition, striving to align research and innovation with the needs and expectations of the society, providing distributed services at a territorial level and acting on the concrete level of the reliability of the measures and the harmonization of procedures and adopting the FAIR (Findable, Accessible, Interoperable, Re-usable) approach in data management.

### **Riassunto**

Il progetto METROFOOD-PP (Preparatory-Phase) si prefigge la creazione di un'infrastruttura di ricerca europea volta a migliorare l'affidabilità delle misure sugli alimenti e a rendere disponibili ai consumatori, alle ditte e alle istituzioni, dati, informazioni e strumenti metrologici, al fine di migliorare l'eccellenza nel campo della qualità e sicurezza alimentare, rafforzando la conoscenza scientifica e promuovendo la cooperazione dell'intera Comunità. METROFOOD va inteso come un'infrastruttura caratterizzata da un approccio multidisciplinare che integra le competenze di molteplici attori dell'intera filiera, dalla produzione primaria fino al consumo finale (from-farm-to-fork). L'obiettivo generale del progetto è di integrare e armonizzare la ricerca scientifica nel campo della qualità e sicurezza alimentare e promuovere la metrologia per gli alimenti e la nutrizione, adoperandosi per allineare la ricerca e l'innovazione ai bisogni ed alle aspettative della società, fornendo servizi distribuiti a livello territoriale ed agendo sul piano concreto dell'affidabilità delle misure e dell'armonizzazione delle procedure ed adottando l'approccio FAIR (Findable, Accessible, Interoperable, Re-usable) nella gestione dei dati.

### **Introduzione**

METROFOOD-RI è un'infrastruttura di ricerca ammessa alla ESFRI ROADMAP 2018. L'ultimo progetto finanziato è METROFOOD-PP (2019-2022) programma *H2020-EU.1.4 -EXCELLENT SCIENCE - Research Infrastructures, H2020-EU.1.4.1.1. - Developing new world-class research infrastructures*. Si tratta di un'infrastruttura fisica ed elettronica che prevede la partecipazione di un consorzio di 50 istituti di ricerca di 18 differenti paesi europei coordinato dall'Italia (ENEA). L'Infrastruttura fisica è costituita da facilities per la produzione di materiali di riferimento e da laboratori analitici per la caratterizzazione chimica, chimico-fisica, genetica e microbiologica di alimenti e matrici d'interesse per il settore agroalimentare (METRO); a ciò si aggiungono campi sperimentali e impianti tecnologici per la produzione e la trasformazione dei prodotti alimentari (FOOD). L'infrastruttura elettronica è costituita da una piattaforma web per la condivisione e l'integrazione di dati e informazioni attraverso interfacce dedicate. Nell'infrastruttura elettronica

sono compresi software e database messi a disposizione dai Centri partecipanti. Per quanto riguarda più specificatamente i cereali, in particolare frumento e riso, attraverso le facilities e i servizi messi a disposizione dai quattro Centri CREA (AN-CI-GB-IT), si avrà la possibilità di eseguire analisi chimiche per l'identificazione di sostanze nutrizionali e nutraceutiche di più recente interesse e per la quantificazione di contaminanti e fattori anti-nutrizionali. Attraverso i campi sperimentali e gli impianti di trasformazione si potrà seguire il destino delle molecole di interesse dal campo alla tavola, identificando quali parametri e tecniche di coltivazione-trasformazione possono condurre ad un prodotto sicuro e di qualità. Importante sarà anche la determinazione della tipicità del prodotto e il monitoraggio di filiera da condurre attraverso l'individuazione di markers per l'autenticità delle materie prime con l'uso di indagini genetiche e molecolari. Particolare attenzione verrà rivolta non solo al miglioramento ma anche alla sostenibilità della produzione cerealicola lungo l'intera filiera, fino alla preparazione e al consumo degli alimenti attraverso lo sviluppo di *best practices* per preservare la qualità e la sicurezza alimentare, considerando anche la fase post-vendita, mediante il miglioramento della conservabilità, la riduzione degli scarti e del loro riutilizzo in prodotti innovativi a base di cereali. Infine, l'analisi e la gestione dei dati mediante l'accesso a databases e lo sviluppo di sistemi per l'interoperabilità dei dati, avrà come obiettivo ultimo la standardizzazione e l'armonizzazione dei numerosissimi dati relativi alla composizione, qualità, sicurezza e autenticità degli alimenti cerealicoli, *staple foods* dell'alimentazione mondiale.

### **Facilities CREA in METROFOOD**

Le facilities, sia fisiche che elettroniche, rappresentano la parte principale dell'infrastruttura. Il progetto METROFOOD-PP ha realizzato un inventario dettagliato di laboratori, installazioni, impianti, database e software al fine di organizzare i futuri servizi definendo le strutture coinvolte, integrandole efficacemente e pianificando la loro operatività.

Allo stesso tempo i Centri partecipanti potranno progettare lavori di ricerca sulle tematiche attuali più stringenti utilizzando risorse condivise (sinergia) e potendo eventualmente anche accedere a progettualità importanti. A tal fine nell'ambito del progetto è stata redatta un'agenda scientifica che vede come tematiche principali la qualità e la sicurezza degli alimenti, ma anche l'autenticità, la tracciabilità e la sostenibilità.

Le facilities sono organizzate e descritte in un sito dedicato, in continua implementazione ed aggiornamento, a cui ogni partecipante a METROFOOD può accedere in consultazione e modifica, secondo una gerarchia prestabilita di permessi.

Le facilities del CREA afferenti a METROFOOD sono presenti nei quattro centri partecipanti all'infrastruttura e sono distribuite come descritto in Tabella 1.

**Tabella 1.** Facilities messe a disposizione del CREA nell'infrastruttura METROFOOD

	Facility		Centro di riferimento
FISICA	Lab. of gas chromatography and mass spectrometry	Analitical Lab.	CREA-AN
	GC-FTIR	Analitical Lab.	CREA-AN
	Biochemical, technological and nutritional quality of cereal products	Analitical Lab.	CREA-IT
	Genomic Platform	Analitical Lab.	CREA-GB
	Laboratory of cereal analyses	Analitical Lab.	CREA-CI
	Milling laboratory	Primary Production	CREA-AN
	Phytotron	Primary Production	CREA-CI
ELETTRONICA	FOODCONS	Software	CREA-AN
	Italian Food Composition Tables	Database	CREA-AN

### Carta dei servizi: servizi CREA in METROFOOD

In una riunione del comitato di gestione tenutasi nell'aprile 2020, è stato raggiunto un accordo per selezionare un numero "limitato" di servizi che devono essere pronti per la fase di attuazione di METROFOOD. L'accordo generale prevedeva di:

- Includere un certo numero di servizi principali che rifletteranno il core business di METROFOOD. Altri servizi (aggiuntivi) saranno disponibili su richiesta, ma verranno individuati e inseriti nel catalogo completo dei servizi;
- Disporre di servizi singoli e combinati o integrati, laddove questi ultimi comprenderanno diversi servizi complementari e offriranno uno sportello unico per i potenziali utenti di METROFOOD.

È stata avanzata una proposta per identificare una serie di indicatori attraverso i quali è possibile valutare il portafoglio diversificato dei servizi, aiutando così nella selezione di quelli principali. Inoltre, un tale approccio aiuterebbe a determinare i possibili contributori all'interno del consorzio per attuare i servizi base.

Un'indagine e la successiva analisi delle risposte ha permesso di raggiungere due obiettivi: in primo luogo, ha fornito un elenco di tutti i potenziali servizi disponibili all'interno del consorzio METROFOOD che come tali saranno candidati per l'inclusione nel catalogo dei servizi; in secondo luogo, sulla base della valutazione della posizione di mercato e del potenziale di innovazione, ha consentito una selezione dei servizi meglio sviluppati e pertinenti che possono essere proposti per rappresentare i servizi della carta METROFOOD che dovrebbero meritare priorità per l'attuazione.

I laboratori analitici hanno registrato il maggior numero di servizi con un totale di 82 singoli servizi. Ciò era atteso poiché la maggior parte dei fornitori di servizi di METROFOOD ha esperienza in questo settore. Quest'area abbracciava un'ampia varietà di servizi, dalla caratterizzazione fisico-chimica degli analiti allo sviluppo di metodi fino all'offerta di formazione comprendente metodi e tecniche differenti. Gli analiti erano di diversi tipi: contaminanti organici ed inorganici, allergeni, adulteranti alimentari (sia naturali che non), tossine (batteriche, micotossine o altre tossine naturali), molecole bioattive, eccetera.

Data la diversità dei tipi di servizi, era imperativo raggruppare i servizi in base alla loro tipologia. Allo stesso tempo, l'indagine ha prodotto punteggi per i singoli servizi in base alla valutazione

della loro posizione di mercato e del potenziale di innovazione. Pertanto, è stata progettata una strategia per tenere conto di questi aspetti e selezionare i servizi che potrebbero potenzialmente formare la carta dei servizi, in grado di rappresentare il *core* business di METROFOOD. A causa dell'abbondanza di servizi in questa particolare categoria, la strategia ha previsto più passaggi nel caso dei Laboratori Analitici, rispetto alle altre categorie. Per le altre categorie, è stato applicato solo un passaggio di selezione essendo più piccole e più gestibili rispetto ai laboratori analitici. Il CREA ha messo a sistema un totale di sei servizi, attingendo alle proprie consolidate competenze. Tali servizi spaziano dal controllo di qualità, alla sicurezza alimentare, dalla tracciabilità all'uso di software per lo studio dei consumi. L'elenco e la descrizione dettagliata sono riportati in Tabella 2.

**Tabella 2.** Servizi offerti dal CREA nell'infrastruttura METROFOOD

	<b>Servizio offerto</b>	<b>Facility collegata</b>	<b>Centro di riferimento</b>
1	Quality control of Omega-3 dietary supplements according to the AOAC Official Method 991.39 for “Fatty Acids in Encapsulated Fish Oils”	Lab. of gas chromatography and mass spectrometry	CREA-AN
2	Analysis of non-dioxin-like PCBs in the food chain according to the maximum levels allowed in foodstuffs by Commission Regulation (EU) No 1259/2011, plus the three dioxin-like PCBs 114, 118, 157	Lab. of gas chromatography and mass spectrometry	CREA-AN
3	NIT/NIR Italian Network for kernel wheat quality control at seed storage companies	Biochemical, technological and nutritional quality of cereal products	CREA-IT
4	Plant and microorganism species identification and quantification in several agri-food chains, starting from the plant in the field to the final processed products. Moreover, it is possible to develop assays for the identification and quantification of specific crop varieties both in raw materials and processed products. The service is based on several genetic approaches, e.g. qPCR, digitalPCR, SNP based genotyping	Genomic platform	CREA-GB
5	Use of a software for recording food consumption data and estimating environmental impact	FOODCONS	CREA-AN
6	Nutritional labelling database of composite dishes	Italian Food Composition Tables	CREA-AN

### **Bibliografia**

Rychlik M., Zappa G., Añorga L., Belc N., Castanheira I., Donard O. F. X., Kouřimská L., Ogrinc N., Ocké M. C., Presser K., Zoani. 2018. Ensuring Food Integrity by Metrology and FAIR Data Principles. *Frontiers in Chemistry*, 6.

Tsimidou M.Z., Ordoudi S.A., Mantzouridou F.T., Nenadis N., Stelzl T., Rychlik M., Belc N., Zoani C. 2022. Strategic Priorities of the Scientific Plan of the European Research Infrastructure METROFOOD-RI for Promoting Metrology in Food and Nutrition. *Foods*, 11: 599.

Vandermeiren K., Sharma S., Belc N., Mast J., Matuszczak A., Presser K., Verleysen E., Zoani C., Van Loco J. 2021. METROFOOD-RI: Pilot services with physical, remote and virtual access. *Measurement: Sensors*, 18: 100309.

Zappa G., Anorga L., Belc N., Castanheira I., Donard O. F. X., Kourimska L., Kukovecz A., Iatco I., Najdenkoska A., Nieminen J., Ogrinc N., Ozer H., Rychlik M., Tsimidou M.Z., Van Loco J., Zoani C. 2018. METROFOOD-RI: a new reality to develop Reference Materials for the agrifood sector. *Journal of Physics: Conference Series*, 1065: 232006.

Zoani C., Anorga L., Belc N., Castanheira I., Donard O. F. X., Kourimska L., Kukovecz A., Iatco I., Najdenkoska A., Ogrinc N., Ozer H., Rychlik M., Tsimidou M.Z., Van Loco J., Zappa G. 2018. Feasibility studies for new food matrix-Reference Materials. *Journal of Physics: Conference Series*, 1065: 232005

## **Riso: valutazione della resa alla lavorazione di alcune varietà italiane applicando la norma ISO 6646:2011**

P. Vaccino<sup>1\*</sup>, C. Simonelli<sup>2</sup>, M. Cormegna<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di Ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali (CREA-CI), Strada Statale 11 per Torino km 2,5, 13100 Vercelli (VC).

<sup>2</sup>Ente Nazionale Risi, Laboratorio Chimico Merceologico, Centro Ricerche sul Riso, Strada per Ceretto 4, Castello d'Agogna (PV).

\*E-mail: [patrizia.vaccino@crea.gov.it](mailto:patrizia.vaccino@crea.gov.it)

### **Abstract**

Milling of rice plays a key role in determining rice quality and value. Rough rice milling is an important process in which rough rice is milled to produce milled or polished grain to meet the consumer's preference. Actually, the standard method for the determination of the yield of husked rice is the ISO 6646:2011. In this study the laboratories of various Italian organizations of the rice sector were involved; they applied the ISO 6646:2011 standard on Italian paddy rice varieties: Caravaggio, CL26, Volano and Sole CL. The following were evaluated: the applicability of the ISO 6646:2011 standard, the consistency of the performance data with the needs of the Italian market and the correlation of the degree of milling with the lipid content and the color index.

### **Riassunto**

La resa alla lavorazione valuta la quantità in peso di riso, costituito da grani interi di riso lavorato, ottenuto partendo da 100 g di riso greggio o risone. Tale determinazione è importante dal punto di vista commerciale e determina il prezzo di vendita del risone. In ambito internazionale, la norma ISO 6646:2011 definisce le modalità operative da adottare, tuttavia risulta particolarmente laboriosa e non è ritenuta adatta per fornire una rapida resa informativa alla filiera del riso. Il Gruppo di Lavoro "Riso e Altri Cereali" UNI ha intrapreso un intenso lavoro di valutazione critica della norma, con un *proficiency test* a livello nazionale per valutare la sua applicabilità e la bontà dei dati di precisione in essa riportati. Le prestazioni sono state valutate mediante lo *z-score*, oltre che in termini di ripetibilità e riproducibilità. Si sono determinate, per ogni varietà, le correlazioni della resa alla lavorazione con il contenuto dei lipidi grezzi e del grado di bianco Kett.

Si è intrapreso un approfondimento critico legato alle necessità della filiera di avere a disposizione una metodica armonizzata e condivisa che riduca, in particolare, i valori di riproducibilità.

### **Introduzione**

Il riso è il cereale più consumato e coltivato al mondo. Raccolto come risone, prima di entrare nelle nostre case come riso integrale o lavorato è sottoposto a lavorazione meccanica, che rimuove la lolla, il pericarpo ed il germe. Il grado con cui le parti del pericarpo sono rimosse è definito "grado di lavorazione". Generalmente tale grado di lavorazione è correlato alla destinazione d'uso del prodotto, inferiore, ad esempio, nei cereali da colazione, superiore per il riso da risotto. La resa alla lavorazione valuta la quantità in peso di riso, costituito da grani interi di riso lavorato, ottenuto partendo da 100 g di riso greggio o risone. Tale determinazione è importante dal punto di vista commerciale e determina il prezzo di vendita del risone: maggiori sono le rotture, quindi minore la resa, inferiore sarà il prezzo di vendita. La causa principale delle rotture in lavorazione è rappresentata da difetti del granello, soprattutto fessurazioni dovute a stress idrico in campo o durante il processo di essiccazione. Anche il processo di lavorazione ha una forte influenza: lavorazioni più "spinte" possono infatti incrementare la percentuale di rotture (Bhattacharya, 2011). Nel laboratorio tecnologico, la resa alla lavorazione richiede una strumentazione specifica,

che possa dare risultati riproducibili e rigorosi, con tutte le tipologie di granello, e simuli il processo industriale, consentendo l'accettazione delle varietà da parte dell'industria in tempi brevi (Bao, 2019). Attualmente, in ambito internazionale, la norma ISO 6646:2011 definisce le modalità operative da adottare per il risone ed il risone parboiled. tuttavia, risulta particolarmente laboriosa e non è ritenuta adatta per fornire una rapida resa informativa alla filiera del riso. Lo scopo del presente lavoro, svolto dal Gruppo "Riso e Altri Cereali" UNI è stato quello di valutare l'applicabilità e la ripetibilità della norma ISO 6646 in vari laboratori italiani che effettuano di routine, ma con metodi interni, l'analisi della resa.

### **Materiali e metodi**

Sette laboratori hanno preso parte allo studio: Ente Nazionale Risi – ENR (L2 ed L4), Camera di Commercio di Biella e Vercelli (L3), Agenzie delle Dogane di Savona (L5), Curtiriso (L1), Riso Gallo (L7), CREA-CI (L6). Il test ha visto l'impiego di quattro campioni di riso italiano, appartenenti a differenti classi merceologiche (D.Lgs 131/2017): Volano e Caravaggio (Lungo A), CL26 (Lungo B), Sole CL (Tondo). Il riso è stato lavorato con la strumentazione Universale (L1, L2, L3, L4, L6, L7) e Satake (L5); a tutti i laboratori partecipanti è stato imposto di mantenere una frazione di massa  $f = 10.0 \pm 0.5$  (rif. 8.1.2, ISO 6646:2011). Il protocollo operativo, come indicato dalla ISO 6646, ha visto: la sbramatura di un campione di 200 g di risone, il campionamento del riso semigreggio ottenuto in due aliquote di 100 g, la lavorazione delle aliquote per un tempo necessario a rimuovere il 10% della massa totale. Il prodotto della lavorazione è stato pesato, dopodiché le rotture sono state rimosse; infine, i grani interi sono stati pesati. La resa è stata quindi calcolata come percentuale in peso dei grani interi sui grani di riso semigreggio. Sono stati calcolati i parametri di precisione specifici per il *proficiency test* (valore assegnato, incertezza, scarto tipo del PT e z-score), in accordo alla norma ISO 13528:2005 e i dati di precisione (ripetibilità e riproducibilità) per condurre alcune valutazioni statistiche, in accordo alla norma UNI ISO 5725-2:2004.

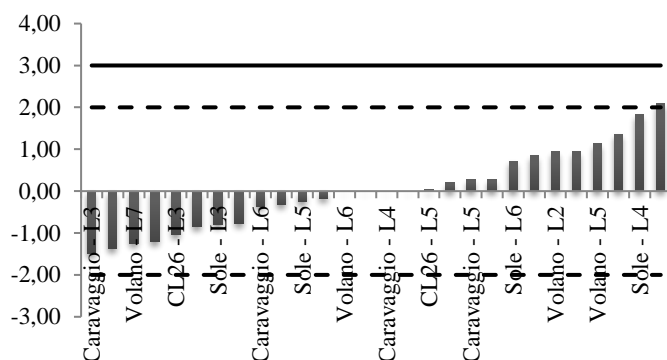
Presso il laboratorio di ENR, sui materiali lavorati, è stato determinato il contenuto in lipidi grezzi mediante estrazione in etere (AACC 30-25.01). Sui campioni di risone è stato altresì determinato l'indice di bianco mediante lo strumento Kett C-300 (metodo ENR MP28 rev.01 2011). Si sono quindi determinate, per ogni varietà, le correlazioni della resa alla lavorazione con il contenuto in lipidi grezzi e con il grado di bianco Kett, parametri fortemente influenzati dalla lavorazione

### **Risultati e discussione**

La *performance* di ciascun partecipante è stata determinata mediante un indicatore numerico,

$$z = \frac{x-X}{\hat{\sigma}}$$

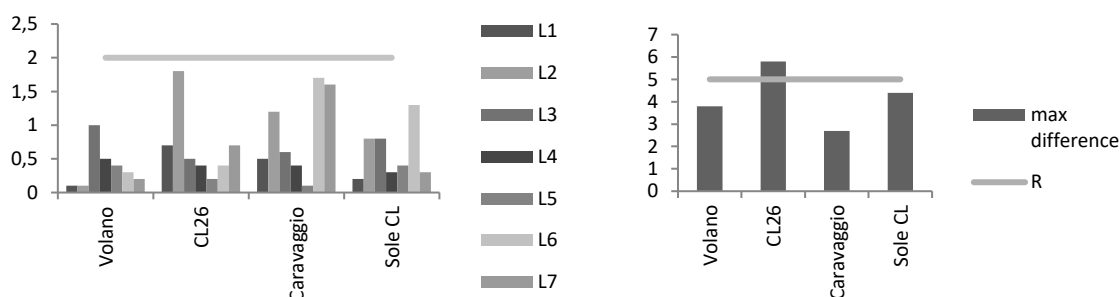
dove  $x$  è il risultato riportato dal partecipante,  $X$  è la media dei risultati e  $\hat{\sigma}$  è la deviazione standard. La *performance* è stata definita soddisfacente ( $|z| \leq 2.0$ ), discutibile ( $2.0 < |z| \leq 3.0$ ), insoddisfacente ( $|z| > 3.0$ ). I risultati sono riportati nella Figura 1.



**Figura 1.** Performance dei laboratori mediante z-score.

La performance di tutti i laboratori, valutata mediante z-score, è risultata buona: solo in un caso il parametro z è risultato superiore al valore 2 ( $z = 2,09$ ).

La ripetibilità per la resa a grani interi (Fig. 2a) è risultata rispettata: per tutte le varietà e i laboratori i valori di ripetibilità sono risultati inferiori al limite del 2% fissato dalla norma ISO 6646. La riproducibilità per la resa a grani interi (Fig. 2b) è risultata rispettata, tranne nel caso della varietà CL26, che ha superato il limite del 5% fissato dalla norma ISO 6646.

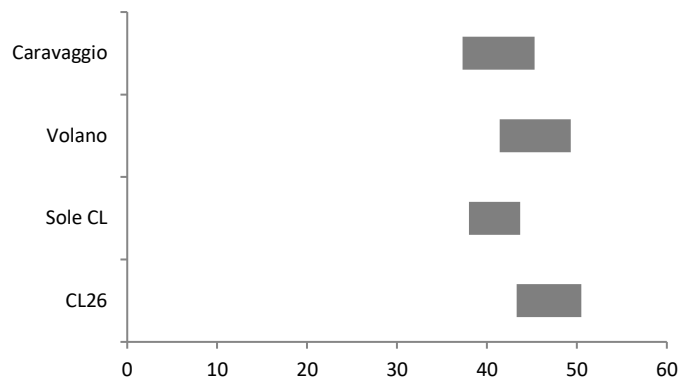


**Figura 2.** Ripetibilità (a) e riproducibilità (b) del metodo.

Il grado di lavorazione del riso è altamente correlato al contenuto in lipidi (Simonelli *et al.*, 2013) e al colore bianco del granello lavorato, espresso in grado di bianco Kett. Maggiore è il grado di lavorazione (e quindi l'asportazione del pericarpo è enfatizzata), minore è il contenuto in lipidi (presenti nelle parti più esterne del granello) e maggiore è l'indice di bianco. Nonostante sia stato applicato lo stesso metodo di lavorazione, si è riscontrata grande variabilità tra laboratori e tra varietà, sia per contenuto in lipidi sia per gradi di colore Kett. Il grado di colore Kett, sebbene non possa essere usato direttamente per valutare la resa alla lavorazione, in senso assoluto, se ne dimostra un valido marcatore.

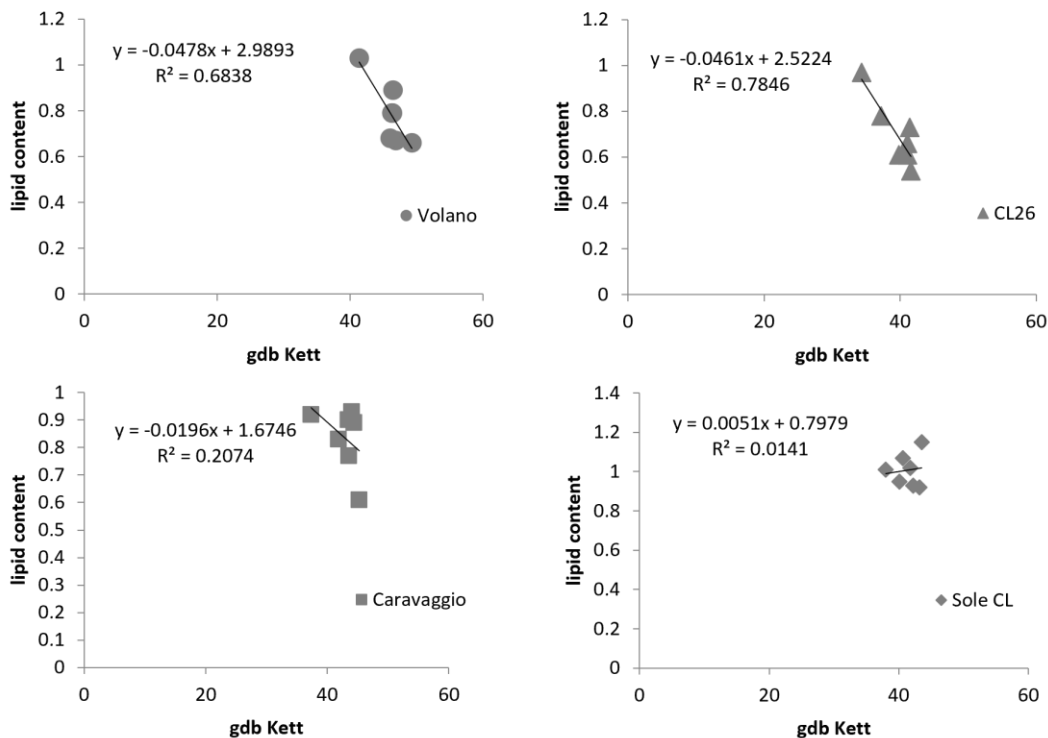
Nella Figura 3 è possibile notare come varietà differenti, processate secondo la norma ISO 6646 con un identico grado di lavorazione, mostrino valori di indice Kett che differiscono in maniera significativa. La varietà Volano, ad esempio, risulta significativamente più scura della varietà CL26. Questo dato è imputabile sia a component genetiche, sia ambientali (riferibili all'ambiente di coltivazione).





**Figura 3.** Intervallo di variazione del grado Kett nelle varietà in esame, processate in accordo alla norma ISO 6646 (f = 10)

La correlazione tra il contenuto lipidico e il grado di bianco Kett per ciascuna varietà in studio è riportata nella Figura 4. Dai grafici è evidente la correlazione negativa tra i due parametri. La varietà Sole CL presenta un più ristretto range di variazione per contenuto in lipidi in rapporto al grado di lavorazione



**Figura 4.** Correlazione tra il contenuto lipidico e il grado di bianco Kett

Dalle analisi effettuate si può affermare che la norma ISO 6646:2011 è applicabile con il rispetto dei limiti di ripetibilità e riproducibilità, definiti nella norma stessa. Tuttavia, è auspicabile la messa a punto di un metodo di più semplice applicazione per la filiera riso e con dei limiti di ripetibilità e riproducibilità più contenuti che aumentino quindi l'affidabilità della metodica

### Ringraziamenti

Si ringraziano B. Pignataro e P. Visintin per il loro supporto in UNI, A. Zone e E. Greppi per aver eseguito le rese per Ente Nazionale Risi, e M. Canella per aver eseguito le rese per il CREA-CI.

## **Bibliografia**

AACC 2000. *American Association of Cereal Chemists, Approved Methods*, 10th ed. Methods 44-19, 46-19. St. Paul, MN.

Bao J. 2019. *Rice: Chemistry and Technology*, 4<sup>th</sup> ed. College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou, Cina.

Bhattacharya K. R. 2011. *Rice Quality - A guide to rice properties and analysis*. Woodhead Publishing.

ISO 6646:2011. Rice - Determination of the potential milling yield from paddy and from husked rice.

ISO 13528:2005. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons.

Simonelli C., Zone A., Cormegna M., Abbiati A. Grado di lavorazione del riso. Poster (Open Day CRR, 11 settembre 2013).

UNI EN ISO 5725-2:2004. Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione. Parte 2: Metodo base per determinare la ripetibilità e la riproducibilità di un metodo di misurazione normalizzato.

## **Il Progetto CHANGE-UP - Innovative agro-ecological APPROACHES to achieving resilience to climate CHANGE in Mediterranean countries**

*G. Galaverna<sup>1\*</sup>, G. Visioli<sup>2</sup>, M. Bertola<sup>2</sup>, L. Gazza<sup>3</sup>, C. Rumpel<sup>4</sup>, A. Benbelkacem<sup>5</sup>, A. Fallot<sup>6</sup>, M. Annabi<sup>7</sup>, S. el-Fatehi<sup>8</sup>*

<sup>1</sup>S.A.F., Università di Parma, Parco Area delle Scienze 11/A, 43124 Parma (PR).

<sup>2</sup>S.C.V.S.A., Università di Parma, Parco Area delle Scienze 27/A, 43124 Parma (PR).

<sup>3</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari (CREA-IT), Via Manziana 30, 00189 Roma (RM).

<sup>4</sup>C.N.R.S., UMR Sorbonne U, CNRS, IRD, INRA, UPEC, Paris, Francia.

<sup>5</sup>I.N.R.A.A., Constantine, Algeria.

<sup>6</sup>C.I.R.A.D. Campus International de Baillarguet 34398 Montpellier cedex 5, Francia.

<sup>7</sup>I.N.R.A.T., Carthage University, Hedi Karray Street, Ariana 2049, Tunisia.

<sup>8</sup>F.P.L.-U.A.E., Abdelmalek Essaadi University, Larache 93004, Marocco.

\*E-mail: [gianni.galaverna@unipr.it](mailto:gianni.galaverna@unipr.it)

### **Abstract**

The CHANGE-UP project (<https://changeupproject.com>) is part of the PRIMA (Partnership for Research and Innovation in the Mediterranean Area) programme supported by the European Union. It aims to re-design innovative cereal cropping systems, in bordering Mediterranean countries, to make them more resilient to climate change and able to face and overcome adverse and unpredictable events, while ensuring food security and sustainable farmers' income. In order to achieve this, two different strategies are proposed: cultivation of New Perennial Grain (NPGs, perennial wheat lines) and Evolutionary Population (EPs – barley, common wheat, durum wheat, triticale) in combination with good farming practices (i.e., crop rotation with legumes). CHANGE-UP will ensure that the integration of such cropping systems is effective not only from the agronomical, but also from the economic and social viewpoints, increasing farmers' wealth and favoring the social inclusion process of all actors of the value chain. In particular, the project will study their impact on the food security of small farming households. A socio-economic analysis will identify and assess specific value chain policies aimed to introduce such innovations in the standard agricultural practices.

### **Riassunto**

Il progetto CHANGE-UP (<https://changeupproject.com>) fa parte del programma PRIMA (Partnership for Research and Innovation in the Mediterranean Area) sostenuto dall'Unione Europea. Mira a riprogettare sistemi innovativi di coltivazione dei cereali, nei paesi del Mediterraneo, che siano più resilienti ai cambiamenti climatici e in grado di affrontare e superare eventi avversi e imprevedibili, garantendo allo stesso tempo sicurezza alimentare e reddito per gli agricoltori. A tale fine, sono state proposte due strategie: grani perennanti (NPG) e Popolazioni evolutive (EP - orzo, frumento tenero, frumento duro, triticale) abbinati a buone pratiche agricole (es. rotazione delle colture con le leguminose). CHANGE-UP si propone di ottimizzare tali sistemi colturali in modo efficace non solo dal punto di vista agronomico, ma anche economico e sociale, aumentando la ricchezza degli agricoltori e favorendo il processo di inclusione sociale di tutti gli attori della catena del valore. In particolare, il progetto studierà il loro impatto sulla sicurezza alimentare delle piccole realtà contadine. Un'analisi socioeconomica identificherà e valuterà politiche specifiche della catena del valore volte a introdurre tali innovazioni nelle pratiche agricole standard.

## **Introduzione**

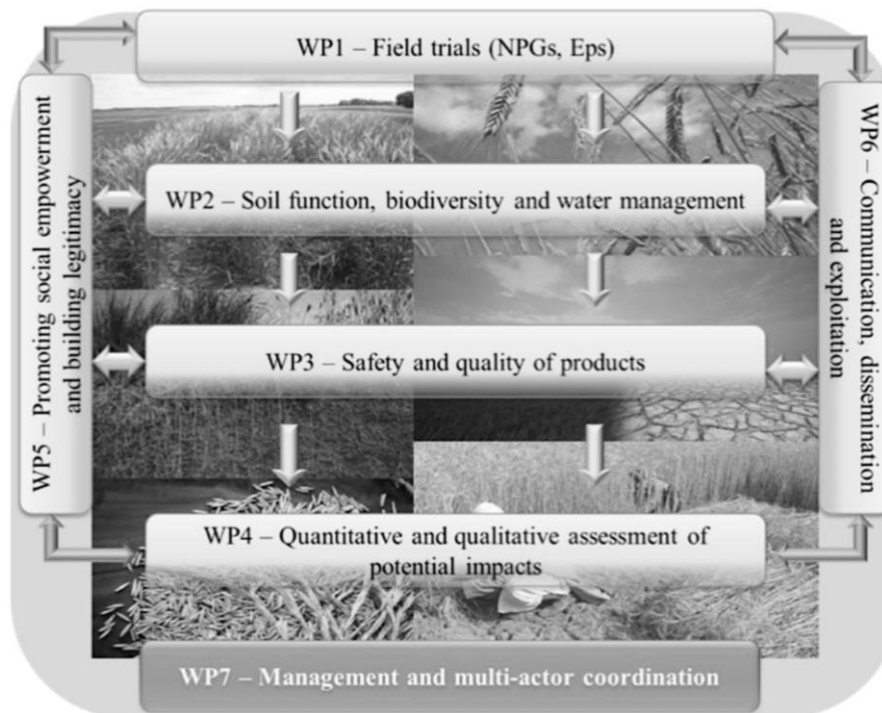
L'obiettivo principale del progetto CHANGE-UP consiste nel riprogettare sistemi innovativi di coltivazione dei cereali, nei paesi confinanti del Mediterraneo, che siano più resilienti ai cambiamenti climatici e in grado di affrontare e superare eventi avversi e imprevedibili, garantendo allo stesso tempo la sicurezza alimentare e il reddito sostenibile degli agricoltori.

Per assicurare una produzione alimentare stabile nel tempo nell'area mediterranea, è necessario che le colture resistano a cambiamenti climatici sempre più repentini e intensi. Tali colture dovrebbero inoltre essere in grado di utilizzare in modo più efficiente le risorse naturali, riducendo la quantità di input immessi nell'agro-ecosistema e preservandone quindi l'integrità. In Europa, Nord Africa e nei paesi del mediterraneo orientale, i cereali sono alla base dell'alimentazione umana e tra essi il frumento è quello più largamente coltivato (FAO, 2022), fondamentale per la sicurezza alimentare. Tuttavia, i cambiamenti climatici hanno già compromesso la produzione di frumento e incrementato la vulnerabilità delle popolazioni rurali (Kahiluoto *et al.*, 2019). Risulta perciò cruciale implementare la produzione e la resilienza dei cereali, in particolare quella del frumento. A questo proposito, sistemi colturali altamente diversificati, basati su principi ecologici, hanno già mostrato di avere dei potenziali vantaggi nella produzione, stabilità della resa, resilienza a condizioni ambientali avverse e nella sostenibilità ecologica (Ceccarelli e Grando, 2020; Pimentel *et al.*, 2012). Perciò, il progetto CHANGE-UP mira a sperimentare sistemi colturali innovativi che richiedano un minor impiego di risorse, basati su principi ecologici e che siano più resilienti ad eventi ambientali avversi e all'imprevedibilità climatica, tramite un disegno sperimentale ad hoc in paesi confinanti del Mediterraneo, considerando anche le catene del valore e le politiche agricole coinvolte. In questo contesto, l'approccio selezionato è l'adozione di grani perennanti (NPG) e Popolazioni evolutive (NPG – orzo, frumento tenero, frumento duro, triticale) abbinati a buone pratiche agricole (es. rotazione delle colture con le leguminose). I vantaggi degli NPG dipendono dalla loro stagione di crescita più lunga, dalla copertura permanente del suolo, dall'enorme produzione di biomassa sotterranea e dalle radici profonde. Ciò porterebbe a ridurre l'erosione del suolo e la salinizzazione, garantire un uso più efficiente di nutrienti e acqua, supportare reti alimentari strutturate e complesse e aumentare il sequestro del carbonio nel suolo, fornendo vantaggi fondamentali per la mitigazione/adattamento ai cambiamenti climatici (Glover *et al.*, 2010; Rasche *et al.*, 2017). Le EP di cereali possiedono invece un alto grado di diversità genetica (eterogeneità), mantenendo così una capacità tampone intrinseca maggiore rispetto alle varietà omogenee per adattarsi a vari stress abiotici e biotici. Le EP si adattano bene all'agricoltura biologica e a basso input, grazie alla loro capacità di produrre buone e stabili rese anche quando la disponibilità di risorse diminuisce o quando le condizioni climatiche diventano estreme (Ceccarelli and Grando, 2020). CHANGE-UP si propone dunque di ottimizzare tali sistemi colturali in modo efficace non solo dal punto di vista agronomico, ma anche economico e sociale, aumentando la ricchezza e favorendo il processo di inclusione sociale di tutti gli attori della catena del valore. In particolare, il progetto studierà il loro impatto sulla sicurezza alimentare delle piccole realtà contadine. In questo progetto, l'approccio multi-attore è garantito dal coinvolgimento di 7 enti di ricerca rispettivamente di Francia (CNRS, CIRAD), Italia (UNIPR, CREA-IT), Tunisia (INRAT), Algeria (INRAA) e Marocco (FPL-UAE) che collaborano con la comunità agricola e i decisori politici. Il coinvolgimento attivo delle diverse parti interessate (agricoltori, decisori politici, associazioni, produttori alimentari, ricercatori ecc. dei paesi partecipanti) in ciascun paese partner sarà fondamentale per garantire l'efficacia dei nuovi sistemi colturali e per lo sviluppo locale, specifico del contesto basato su soluzioni adottabili.

## **Materiali e metodi**

Il programma di ricerca del Progetto CHANGE-UP ha l'obiettivo di fornire sperimentalmente un insieme completo di dati riguardanti l'aspetto agronomico, ecologico e socioeconomico della

coltivazione degli NPG ed EP nei paesi affacciati sul bacino del Mediterraneo. Il progetto è organizzato in sette pacchetti di lavoro (WP) la cui interrelazione è mostrata in Figura 1.



**Figura 1.** Interrelazioni tra i gruppi di lavoro (WPs) di CHANGE-UP.

**WP1** è progettato per condurre prove in campo in diversi paesi del Mediterraneo che differiscono per le proprietà del suolo, condizioni climatiche e gestione dei campi, con lo scopo di testare le performance agricole e l'adattamento ambientale delle EP e di alcuni NPG selezionati. EP di frumento tenero (Italia), frumento duro (Algeria, Italia, Marocco e Tunisia), orzo (Algeria, Marocco) e triticale (Algeria) vengono coltivati in rotazione con varie leguminose annuali, scelte a seconda dell'uso e tradizione locale dei paesi partecipanti al progetto. Le EP vengono coltivate in aziende biologiche e a basso input e comparate con ecotipi comunemente coltivati e varietà moderne. Su tali colture vengono raccolti parametri riguardanti caratteristiche della pianta e della granella, la presenza di piante infestanti e la presenza di malattie. Quattro linee di NPG vengono coltivate in tutti i paesi considerati nel progetto, prevalentemente in zone marginali, e le loro caratteristiche agronomiche vengono confrontate con un frumento annuale. Un'attenzione particolare viene data alla valutazione degli schemi di crescita sia della biomassa apicale che ipogea, all'indice di crescita post-raccolta e alla salute del suolo (incluso la biodiversità microbica WP2). I dati raccolti nel WP1 alimentano le attività del WP2 e WP3 e tutti i campi sperimentali fungono anche da campi dimostrativi per disseminare i risultati agli agricoltori e a tutti i soggetti coinvolti (WP5). Un elemento fondamentale del WP1 è la partecipazione attiva degli agricoltori che valuteranno visivamente le differenti unità sperimentali esprimendo un giudizio qualitativo sulle nuove colture.

**WP2** mira a studiare i processi biogeochimici che avvengono nel suolo in seguito alla coltivazione di NPG ed EP, al fine di valutare la loro attinenza a fornire servizi ecosistemici quali il sequestro del carbonio, la protezione del suolo contro l'erosione, l'utilizzo più efficiente di nutrienti e acqua, così come il supporto ad una maggiore biodiversità. Sia per gli NPG che per le EP le proprietà chimiche e biologiche dei suoli vengono comparate con quelle dei suoli dove crescono colture tradizionali. In tutti i siti d'interesse, un approccio chemometrico viene utilizzato per sviluppare degli indicatori della qualità del suolo che si possano applicare ad un numero considerevole di

campioni. Analisi idrologiche, biogeochimiche e microbiologiche più dettagliate vengono condotte a Roma (sulle NPG, dove sono già presenti prove sperimentali di lunga durata, e sulle EP) e a Parma (sulle EP). Nel caso degli NPG, studi sulla morfologia dell'apparato radicale vengono effettuati per valutare sia l'efficacia di utilizzo della risorsa idrica che gli effetti del loro apparato radicale sul potenziale sequestro del carbonio.

**WP3** effettua la caratterizzazione nutrizionale, tecnologica e di sicurezza alimentare sulla granella e sui prodotti derivanti dai NPG e dalle EP, confrontandoli con i prodotti derivanti dagli omologhi tradizionali coltivati nelle stesse condizioni ambientali. Le proprietà tecnologiche, la qualità nutrizionale e la sicurezza alimentare (insorgenza di micotossine) vengono valutati prevalentemente per le EP dato che la farina derivante dalla loro granella viene già commercializzata. Al contrario, la possibile resistenza o suscettibilità degli NPG alle micotossine, così come la resistenza della pianta a stress biotici e abiotici vengono valutate mediante sistemi colturali micro-propagati in vitro e mediante approcci metabolomici.

**WP4** combina analisi quantitative e qualitative sul potenziale degli NPG ed EP nel migliorare la sostenibilità lungo la catena del lavoro. Un modello quantitativo “Positive Mathematical Programming” (PMP) per le aziende cerealicole viene utilizzato per valutare gli effetti di tecnologie alternative, scenari economici e politici sulla resilienza, sostenibilità e sostentamento degli agricoltori e aziende commerciali, anche in scenari di carenza idrica. Gli elementi essenziali della catena del valore cerealicolo in Algeria, Italia, Marocco e Tunisia, il ruolo socioeconomico ad ogni fase della catena e la tipologia di azienda agricola adatta alla coltivazione di NPG e EP vengono identificati e analizzati all'interno del progetto. Dati primari e secondari su politiche attuali, prezzi incentivi/disincentivi, problemi ambientali, costi variabili, resa dei prodotti, utilizzo dei terreni ecc., vengono raccolti facendo riferimento alle aziende selezionate nel progetto e il modello PMP viene di conseguenza utilizzato per costruire farm “household models”. Infine, verrà redatto un inventario del quadro normativo nei vari paesi partner relativo alla commercializzazione delle granelle. Una modellizzazione socio-ecologica viene infine condotta attraverso una serie di workshop atti a riunire le parti interessate.

**WP5** è volto a costruire la legittimità sociale e favorisce l'effettiva partecipazione del pubblico al programma di ricerca sia durante che dopo la fase di implementazione, al fine di capitalizzare i risultati. Il WP5 (i) analizza le determinanti tecnologiche, socioeconomiche e culturali che possono favorire o ostacolare l'introduzione di EP e NPG all'interno delle catene del valore e (ii) facilita l'adozione delle innovazioni da parte delle comunità locali e il loro empowerment.

**WP6** si rivolge a diversi gruppi target attraverso la diffusione attiva del concetto alla base del progetto e dei suoi risultati chiave. I canali di diffusione includono workshop, conferenze e social media. Vengono organizzati eventi, tra cui visite in loco. Vengono inoltre promossi siti web, video e campagne di sensibilizzazione. Come parte del piano di sfruttamento, è inclusa una tabella di marcia verso il lancio sul mercato, che definisce le ulteriori risorse e i passi necessari per colmare le lacune del mercato (ad esempio, le deroghe alle attuali legislazioni sulle sementi).

**WP7** assicura un'efficace gestione amministrativa, finanziaria, scientifica e organizzativa del progetto. Il progetto è coordinato dall'Università di Parma

## **Bibliografia**

Ceccarelli S., Grando S. 2020. Review Organic agriculture and evolutionary populations to merge mitigation and adaptation strategies to fight climate change. *South Sustainability* 1, e013. <https://doi.org/10.21142/SS-0102-2020-013>  
FAO 2022. FAO Cereal Supply and Demand Brief.

Glover J.D., Reganold J.P., Bell L.W., Borevitz J., Brummer E.C., Buckler E.S., Cox C.M., Cox T.S., Crews T.E., Culman S.W., DeHaan L.R., Eriksson D., 2010. Perennial questions of hydrology and climate response. *Science* 330, 33-34. <https://doi.org/10.1126/science.264.5156.282>

Kahiluoto H., Kaseva J., Balek J., Olesen J.E., Ruiz-Ramos M., Gobin A., Kersebaum K.C., Takáč J., Ruget F., Ferrise R., Bezak P., Capellades G., Dibari C., Mäkinen H., Nendel C., Ventrella D., Rodríguez A., Bindi M., Trnka M. 2019. Decline in climate resilience of European wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116, 123. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804387115>

Pimentel D., Cerasale D., Stanley R.C., Perlman R., Newman E.M., Brent L.C., Mullan A., Chang D.T.-I. 2012. Annual vs. perennial grain production. *Agriculture Ecosystem and Environment* 161, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2012.05.025>

Rasche F., Blagodatskaya E., Emmerling C., Belz R., Musyoki M.K., Zimmermann J., Martin K. 2017. A preview of perennial grain agriculture: knowledge gain from biotic interactions in natural and agricultural ecosystems. *Ecosphere* 8, e02048. <https://doi.org/10.1002/ecs2.2048>

## Formulazione di starter microbici per la produzione di pizza

A. Reale, T. Di Renzo, S. Marulo\*, F. Boscaino, G. Mamone

Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Scienze dell'Alimentazione, Via Roma 64, 83100 Avellino (AV).

\*E-mail: [serena.marulo@gmail.com](mailto:serena.marulo@gmail.com)

### Abstract

The use of selected microbial starters, mainly lactic acid bacteria and yeasts, is of increasing interest in the baking industry. The study of technological characteristics and stress response of microbial strains is of great importance for the formulation of more competitive starter cultures. In this study, 100 strains of lactic acid bacteria (LAB) were characterized for technological performance and stress survival during leavening of model doughs. Specifically, the lactic acid bacteria were evaluated for their ability to survive different conditions of acidity (pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.5, 6.5), salinity (NaCl 2, 3, 4, 5, 6, 8%), presence of ethanol (2, 4 and 6%) and sucrose (20 and 30%) during a 48h fermentation period. The strains were also characterized for proteolytic, ureasic and amylasic activity and for the ability to produce exopolysaccharides. The strains with the best performances were used for starter formulation and employed in leavening tests for pizza production.

### Riassunto

L'uso di starter microbici selezionati, principalmente batteri lattici e lieviti, è di crescente interesse nel settore della panificazione. Lo studio della diversità della risposta agli stress di processo e delle caratteristiche tecnologiche dei ceppi microbici è di grande importanza per la formulazione di colture starter più competitive.

In questo studio 100 ceppi di batteri lattici sono stati caratterizzati per le performance tecnologiche e per la resistenza agli stress durante la lievitazione di impasti modello. In particolare, i LAB sono stati valutati per la loro capacità di sopravvivere a diverse condizioni di acidità (pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.5, 6.5), salinità (NaCl 2, 3, 4, 5, 6, 8%), presenza di etanolo (2, 4 e 6%) e saccarosio (20 e 30%) durante 48 ore di fermentazione. I ceppi sono stati, inoltre, caratterizzati per attività proteolitica, ureasica, amilasica e per la capacità di produrre esopolisaccaridi. I ceppi con le migliori performance sono stati impiegati per la formulazione di starter ed impiegati in test di lievitazione per la produzione di pizze modello.

### Introduzione

Il lievito madre viene impiegato per la produzione di numerosi prodotti da forno dolci e salati (Minervini *et al.*, 2012). La lievitazione con lievito madre o pasta acida può essere avviata in differenti modalità: mediante “fermentazione spontanea”, grazie al microbiota endogeno presente nelle materie prime e nell'ambiente di lavorazione (Yu *et al.*, 2018); mediante metodo “backslopping”, ovvero aggiungendo “l'impasto madre maturo” della precedente lievitazione per l'avvio della fermentazione (Harth *et al.*, 2016); mediante l'impiego di impasti acidi liquidi, essiccati o liofilizzati (Reale *et al.*, 2019); oppure mediante colture starter con uno o più ceppi selezionati di batteri lattici e/o lieviti (Dimitrellou *et al.*, 2009).

Quest'ultima modalità, ovvero l'utilizzo di starter selezionati, negli ultimi anni è di crescente interesse nel settore dei prodotti lievitati da forno, come pane e pizza. La fase della caratterizzazione dei ceppi microbici è di grande importanza per consentire la formulazione di colture starter specifiche, più competitive ed interessanti da un punto di vista tecnologico.

Obiettivo dello studio è stato quello di selezionare ceppi di batteri lattici da utilizzare come colture starter nella produzione di prodotti da forno lievitati. A tal fine, sono stati caratterizzati 100 ceppi di batteri lattici in base alla capacità di crescita e di acidificazione. In seguito, sono stati



caratterizzati per la capacità di far fronte ai principali stress incontrati durante la fermentazione del lievito naturale, come acidità, presenza di sale, saccarosio ed etanolo. I ceppi sono stati caratterizzati anche per l'attività ureasica, amilasica e proteolitica e per la capacità di produrre esopolisaccaridi (EPS). I migliori ceppi selezionati sono stati quindi impiegati nella formulazione di starter per la produzione di pizze modello.

## **Materiali e metodi**

### ***Ceppi batterici***

Cento batteri lattici, appartenenti alla ceppoteca dell'Istituto di Scienze dell'Alimentazione, Consiglio Nazionale delle Ricerche (Avellino, Italia), sono stati utilizzati nello studio.

### ***Screening per capacità di crescita, e acidificante***

I LAB sono stati coltivati in substrato MRS pH 6.8 (MRS, Oxoid, Milano, Italia) per 16 ore a 28°C. Le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione (10.000 × g per 10 min), lavate due volte in NaCl sterile 0.85% (p/v) e inoculate in brodo MRS alla concentrazione finale di  $1 \times 10^6$  ufc/mL. I campioni sono stati incubati per 24 ore a 28°C e la densità ottica a 595nm (OD<sub>595nm</sub>) e i valori di pH sono stati misurati a intervalli regolari.

### ***Screening per la tolleranza agli stress***

I ceppi sono stati preparati come descritto precedentemente ed inoculati in substrato MRS modificato per simulare le differenti condizioni di stress: a) stress acido, MRS brodo a pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.5 e 6.5; b) stress salino, in MRS brodo pH 6.8 con 2, 3, 4, 5 e 6% (p/v) di NaCl; c) stress osmotico, in brodo MRS pH 6.8 con 20 e 30% (p/v) di saccarosio; d) resistenza ad etanolo, in MRS brodo pH 6.8 con etanolo al 2, 4 e 6% (v/v). I substrati inoculati sono stati incubati a 28°C per 48 ore. A tempo zero e dopo 6, 24 e 48 h di incubazione è stata misurata l'assorbanza a OD<sub>595nm</sub>. I risultati sono stati espressi come  $\Delta OD_{595nm}$  a 6, 24 e 48 h, ovvero come differenza tra OD<sub>595nm</sub> a 6 o 24 o 48 h e OD<sub>595nm</sub> al tempo zero.

### ***Screening per la produzione di esopolisaccaridi (EPS)***

La produzione di EPS è stata valutata come descritto da Ruas-Madiedo e de los Reyes-Gavilàn (2005). In breve, i LAB sono stati inoculati in MRS agar modificato, contenente rosso rutenio (0.08 g/L) e glucosio 20 g/L o maltosio 20 g/L o saccarosio 50 g/L come fonte di carbonio. Dopo 48 h di incubazione a 28 °C, il colore delle colonie ha consentito di distinguere i ceppi produttori di EPS (colonia bianca) e i ceppi non produttori (colonia rossa).

### ***Screening per attività ureasi, amilasica e proteolitica***

I ceppi selezionati sono stati testati per l'attività dell'ureasi come riportato in Zotta *et al.*, (2007). L'attività dell'amilasi è stata valutata come descritto in Padmavathi *et al.*, (2018). L'attività dell' $\alpha$ -amilasi nei ceppi che hanno generato una zona chiara su terreno agar, è stata valutata mediante un test enzimatico come descritto da Tavea *et al.*, (2016). L'attività proteolitica è stata valutata misurando la concentrazione di amminoacidi liberi totali (acido trinitrobenzensolfonico, metodo TNBS; Adler-Nissen, (1979) durante la fermentazione in impasti modello come riportato in Zotta *et al.*, (2006).

### ***Produzione di impasti per pizza e analisi della componente volatile***

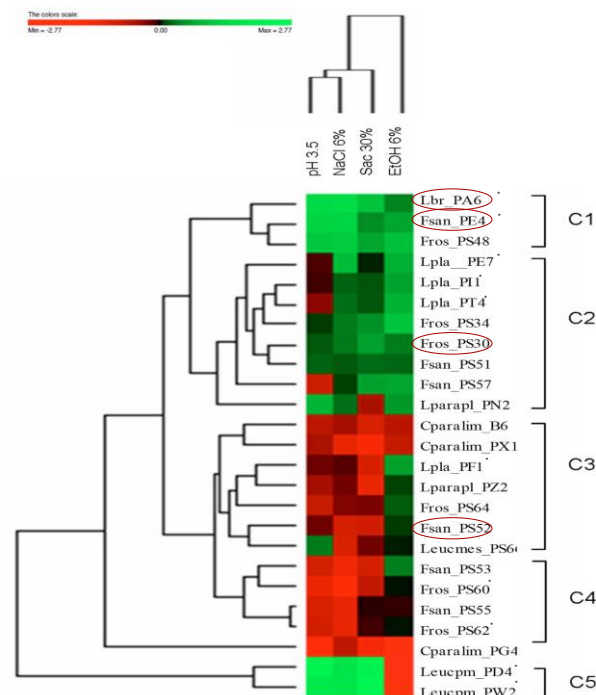
I ceppi con le migliori performance tecnologiche sono stati utilizzati per la formulazione di differenti colture starter (I1, I2, I3, I4, I5) che sono state impiegate in prove di lievitazione di impasti modello per pizza. Gli impasti sono stati preparati mescolando 60 mL di acqua sterile e 40 g di farina, aggiungendo gli starter ad una concentrazione di circa  $1 \times 10^6$  ufc/g. Gli impasti sono stati incubati a 28°C per 24h e dopo modellati e cotti in un forno per pizze. Sugli impasti a fine lievitazione e sulle pizze cotte (P1, P2, P3, P4, P5) sono stati valutati i composti organici volatili (VOCs) mediante SPME-GC/MS come descritto da Reale *et al.*, (2016).

## Analisi statistiche

Le analisi statistiche e i grafici sono stati eseguiti utilizzando SYSTAT 13.0 per Windows (Systat Software Inc., Richmond, CA, USA), mentre la Matrix Hierarchical Cluster Analysis è stata ottenuta con il programma PermutMatrix v. 1.9.3 (LIMM, Francia).

## Risultati e discussione

Da un totale di 100 batteri lattici oggetto dello studio, sono stati selezionati 25 ceppi in possesso di buona capacità acidificante e di crescita. Questi ceppi sono stati sottoposti a differenti condizioni di stress e i risultati sono illustrati nella Fig. 1.



**Figura 1.** Cluster Analisi dei 25 ceppi di LAB in risposta a diversi fattori di stress. *Lbr*: *Levl. brevis*; *Fros*: *Furl. rossiae*; *Fsan*: *Fl. sanfranciscensis*; *Lpla*: *Lacp. plantarum*; *Lparapl*: *Lacp. paraplantarum*; *Cparalim*: *C. paralimentarius*; *Leucmes*: *Leuc. mesenteroides*; *Leucpm*: *Leuc. pseudomesenteroides*). La scala dei colori: dal rosso (dati negativi) al verde (dati positivi) (Adattata da Reale et al., 2020; <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110092>).

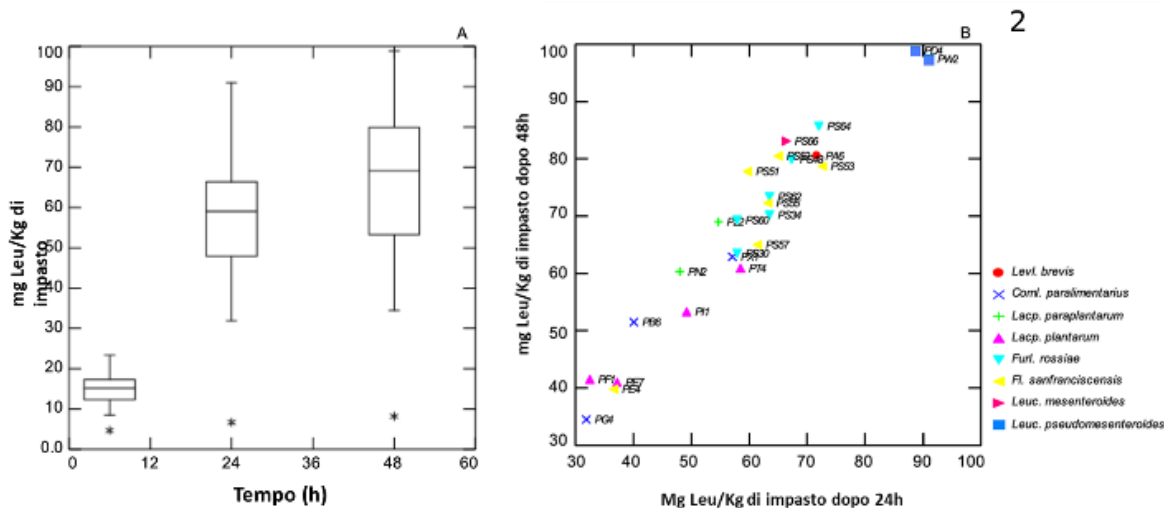
L'analisi ha generato cinque cluster principali in base ai diversi livelli di tolleranza agli stress. Il cluster C1 comprendeva i tre ceppi più forti (*Levl. brevis* PA6, *Furl. rossiae* PS48, *Fl. sanfranciscensis* PE4) che hanno mostrato la massima robustezza a tutti gli stress. Il cluster C5 comprendeva due ceppi di *Leuc. pseudomesenteroides* (PD4, PW2) altamente tolleranti a pH 3.5, NaCl 6% e saccarosio 30%, ma sensibili all'etanolo 6%. Il cluster C2 comprendeva 7 ceppi sensibili alle condizioni acide, ma più resistenti a NaCl, saccarosio ed etanolo. I cluster C3 e C4 raggruppavano ceppi altamente sensibili a tutte le condizioni di stress.

Dei 25 ceppi solo pochi hanno mostrato la capacità di produrre EPS: in particolare, i ceppi *Leuc. pseudomesenteroides* (PD4 e PW2), *Lacp. plantarum* PI1 e PT4, due ceppi di *Furl. rossiae* (PS60 e PS62) e 1 ceppo delle specie *Levl. brevis*, *Lacp. paraplantarum* e *Fl. sanfranciscensis*.

Nessuno dei ceppi ha mostrato attività ureasica, mentre 17 hanno mostrato attività amilasica.

L'attività proteolitica dei ceppi è stata valutata mediante il rilascio di aminoacidi liberi durante la fermentazione dell'impasto (Fig. 2A). Dopo 6 ore di fermentazione, tutti i ceppi hanno mostrato un livello proteolitico ridotto, mentre dopo 24 ore e, soprattutto, dopo 48 ore, nella maggior parte

dei campioni si registrava un aumento di aminoacidi liberi totali. La Fig. 2B riporta la distribuzione dei 25 ceppi sulla base della produzione totale di aminoacidi liberi dopo 24 e 48 ore di fermentazione. I ceppi con la più alta attività proteolitica sono stati *L. pseudomesenteroides* PD4 e PW2, insieme con *Levl. brevis* A6, *Furl. rossiae* PS64, PS48, *Leuc. mesenteroides* PS66 e *Fl. sanfranciscensis* PS53 e PS52. Va notato che alcuni dei ceppi più proteolitici (*Levl. brevis* PA6, *Furl. rossiae* PS48, *Leuc. pseudomesenteroides* PD4 e PW2) erano anche i più tolleranti agli stress.



**Figura 2.** A) Contenuto di aminoacidi liberi totali (FAA) in 25 impasti modello dopo 6 h, 24 h e 48 h di fermentazione. Il simbolo \* indica i valori di FAA negli impasti di controllo non inoculati, durante la fermentazione; B) Contenuto totale di FAA negli impasti modello inoculati con i 25 ceppi LAB dopo 24 h e 48 h di fermentazione (adattata da Reale et al, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110092>).

I ceppi più interessanti sono stati quindi utilizzati nella formulazione di colture starter multiple per prove di produzione di pizza (Fig. 3).

**COLTURE STARTER MISTE** per produzione di pizze modello:

1. *Fl. sanfr.* SB52, *Leuc. mesenteroides* PD4, *Levl. brevis* A6 + *S. cerevisiae* YP12
2. *Fl. sanfr.* PE4, *Leuc. mesenteroides* PD4, *Levl. brevis* A6 + *S. cerevisiae* YP12
3. *Fl. sanfr.* PS30, *Leuc. mesenteroides* PD4, *Levl. brevis* A6 + *S. cerevisiae* YP12
4. Lievito di birra commerciale (Controllo)
5. Lievito selezionato (*S. cerevisiae* YP12)

**Figura 3.** Formulazione di colture starter multiple

Gli impasti e le pizze prodotte sono stati analizzati per il pattern aromatico. Gli impasti dopo 24h di fermentazione erano caratterizzati da oltre 80 composti volatili appartenenti principalmente ad aldeidi, alcoli, acidi, chetoni, esteri e altri composti minori. Gli impasti ottenuti con le tre miscele starter (I1, I2, I3) presentavano un profilo volatile molto simile tra loro (caratterizzato in maggior misura da acidi ed esteri) e differente dai campioni prodotti con i soli lieviti (I4 e I5). Dopo cottura, invece, i campioni P1, P2, P3 presentavano profili aromatici diversi. In particolare, il campione P1 si differenziava dagli altri per la maggiore presenza di furani e pirazine e terpenoidi che gli conferiva note di cioccolato, tostato, noce, mandorla e caramello. Tale risultato derivava probabilmente dalla maggiore attività proteolitica dei ceppi selezionati che consentiva durante la cottura la formazione di composti aromatici derivanti dalla reazione di Maillard.

Tale lavoro ha confermato la necessità di effettuare un'attenta selezione per identificare ceppi competitivi, in grado di sopravvivere e propagarsi durante l'intero processo fermentativo. Alte concentrazioni di saccarosio, etanolo e NaCl sono stati i fattori principali che hanno consentito di

classificare ceppi sensibili e tolleranti. Ceppi appartenenti alle specie *Leuc. pseudomesenteroides*, *Levl. brevis* e *Fl. sanfranciscensis*, grazie all'elevata robustezza alle diverse condizioni di stress, al pattern aromatico conferito ai prodotti finiti, sono risultati altamente idonei per la formulazione di colture starter per impasti per pizza.

### Ringraziamenti

Questo studio è stato realizzato nell'ambito del Progetto PRIN 2017 (2017SFTX3Y) e sostenuto dal progetto NUTR-AGE del CNR (FOE-2019, DSB.AD004.271).

### Bibliografia

- Adler-Nissen J. 1979. Determination of degree of hydrolysis of food proteins hydrolysates by trinitrobenzensulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27: 1256-1262.
- Dimitrellou D., Kandylis P., Kourkoutas Y., Koutinas A., Kanellaki M. 2009. Evaluation of thermally-dried *Kluyveromyces marxianus* as baker's yeast. *Food Chemistry*, 115: 691-696.
- Harth H., Van Kerrebroeck S., De Vuyst L. 2016. Community dynamics and metabolite target analysis of spontaneous, backslopped barley sourdough fermentations under laboratory and bakery conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 228: 22-32.
- Minervini F., Di Cagno R., Lattanzi A., De Angelis M., Antonielli L., Cardinali G., Cappelle S., Gobbetti M. 2012. Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of 19 sourdoughs used for traditional/typical Italian breads: Interactions between ingredients and microbial species diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 1251-1264.
- Padmavathi T., Bhargavi R., Priyanka P.R., Niranjan N.R., Pavitra P.V. 2018. Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification *Journal, Genetic Engineering & Biotechnology*, 16: 357-362.
- Reale A., Di Renzo T., Preziuso M., Panfili G., Cipriano L., Messia M.C. 2019. Stabilization of sourdough starter by spray drying technique: New breadmaking perspective. *LWT- Food Science and Technology*, 99: 458-475.
- Reale A., Di Renzo T., Zotta T., Preziuso M., Boscaino F., Ianniello R., et al. 2016. Effect of respirative cultures of *Lactobacillus casei* on model sourdough fermentation. *Food Science Technology*, 73: 622-629.
- Reale A., Zotta T., Ianniello R., Mamone G., Di Renzo T. 2020. Selection criteria of lactic acid bacteria to be used as starter for sweet and salty leavened baked products. *LWT - Food Science and Technology*, 133: 110092.
- Ruas-Madiedo P., de los Reyes-Gavilán C.G. 2005. Invited review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 88: 843-856.
- Tavea F., Bert Fossi B., Takop N., Ndjouenkeu R. 2016. Extracellular highly thermostable  $\alpha$ -amylase from a strain of *Lactobacillus fermentum*: Production and partial characterization. *Journal of Microbiology Research*, 6: 47-54.
- Yu Y., Wang L., Qian H., Zhang H., Qi X. 2018. Contribution of spontaneously-fermented sourdoughs with pear and navel orange for the bread-making. *LWT - Food Science and Technology*, 89: 336-343
- Zotta T., Ricciardi A., Parente E. 2007. Enzymatic activities of lactic acid bacteria isolated from Cornetto di Matera sourdoughs *International Journal of Food Microbiology*, 115: 65-172.
- Zotta T., Piraino P., Ricciardi A., McSweeney P.L.H., Parente E., 2006. Proteolysis in model sourdough fermentations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 2567-2574.

## Proprietà e digeribilità di impasti di frumento tenero per pizza napoletana durante la fase di lievitazione

A. Romano<sup>1,2\*</sup>, C. Nitride<sup>1</sup>, P. Masi<sup>1,2</sup>, G. Mamone<sup>3</sup>, L. Di Stasio<sup>3</sup>, P. Ferranti<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Napoli 'Federico II', Via Università 100, 80055 Portici (NA).

<sup>2</sup>CAISIAL, Università degli Studi di Napoli 'Federico II', Via Università 133, 80055 Portici (NA).

<sup>3</sup>ISA-CNR, Via Roma, 64, 83100 Avellino (AV).

\*E-mail: [annalisa.romano@unina.it](mailto:annalisa.romano@unina.it)

### Abstract

Neapolitan pizza is an Italian product of the traditional Neapolitan cuisine and a global success story, appreciated in many countries around the world. It was recognized as one of the traditional specialties guaranteed (TSG) by the European Commission Regulation No. 97/2010 (EC, 2010). However, despite its popularity and economic relevance, only a few studies have been carried out on this topic, and so far, a unique comprehensive examination of the relationships between pizza preparation technology, characteristics of ingredients and quality perceived by consumers has appeared in the literature (Masi *et al.*, 2015).

The aim of the present work was to evaluate the properties and the digestibility of pizza dough prepared using flours with different strength - 310W (A) and 200W (B) - leavened with baker's yeast for different times.

A significant increase in dough volumes was observed when the flour A was used compared to B. Differences in protein digestibility were more related to the leavening times than the flour used, as demonstrated by HPLC MS and electrophoretic analysis. The data obtained support the influence of processing on structure and digestibility and provide insight into pizza production with improved digestibility and functional properties.

### Riassunto

La pizza napoletana è senza dubbio il prodotto della gastronomia italiana più noto e diffuso nel mondo, un emblema degli alimenti "glocal" (Bauman, 2005). Tuttavia, solo pochi studi scientifici sono stati condotti sulle relazioni tra le caratteristiche degli ingredienti e la tecnologia di preparazione della pizza napoletana artigianale (Masi *et al.*, 2015).

Obiettivo del presente studio è stato valutare lo sviluppo della struttura e la digeribilità di impasti per pizza preparati con sfarinati di frumento tenero con diversi valori del parametro alveografico della forza (W) durante la fase di lievitazione.

I risultati sperimentali hanno dimostrato che la variazione di volume dell'impasto nel tempo era significativamente diversa ( $p < 0.05$ ) in funzione dello sfarinato utilizzato al termine della fase di lievitazione (360 minuti). Le differenze nella digeribilità delle proteine erano più correlate ai tempi di lievitazione che alla composizione proteica delle farine utilizzate, come dimostrato dalle analisi elettroforetiche e l'analisi di spettrometria di massa. In conclusione, i dati ottenuti supportano l'influenza del contenuto proteico sullo sviluppo della struttura e sulla digeribilità degli impasti per pizza e forniscono nuove informazioni per la produzione di una pizza con una migliore digeribilità e proprietà funzionali.

**Parole chiave:** pizza napoletana artigianale, lievitazione, forza della farina, proteomica, spettrometria di massa.

### Introduzione

La pizza napoletana artigianale è uno dei più famosi prodotti da forno lievitati nel mondo, simbolo della cucina italiana, nonché della dieta mediterranea. Il Regolamento della Commissione Europea

n. 97/2010 ha iscritto la denominazione Pizza Napoletana nell'albo delle specialità tradizionali garantite (STG). Inoltre, nel 2017 l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Educazione, la Scienza e la Cultura (UNESCO, 2017) ha iscritto l'arte del pizzaiolo napoletano nella Lista Rappresentativa del Patrimonio Culturale Immateriale dell'Umanità. Tuttavia, solo pochi studi scientifici sono stati condotti sulle relazioni tra le caratteristiche degli ingredienti e la tecnologia di preparazione della pizza napoletana (Masi *et al.*, 2015; Falciano *et al.*, 2022). La sua qualità globale dipende principalmente dalle proprietà dell'impasto che sono indubbiamente influenzate dagli ingredienti (come per es. la farina) e dal processo di produzione, in particolare dalla fase di lievitazione. Gli impasti sono solitamente preparati utilizzando lievito di birra come starter (Coppola *et al.*, 1998; Masi *et al.*, 2015).

Obiettivo del presente studio è stato valutare lo sviluppo della struttura e la digeribilità di impasti per pizza preparati con due sfarinati di frumento tenero con diversi parametri alveografici (W e P/L) in funzione del tempo di lievitazione con metodiche analitiche innovative nel settore dell'utilizzazione dei cereali.

### **Materiale e metodi**

Due tipologie di farina di frumento tenero commerciale (A e B) con il 12% di proteine sono state gentilmente fornite dal molino DALLAGIOVANNA srl (Italia) con un contenuto di umidità nominale del 12% p/p.

I parametri alveografici, W (forza della farina), P (resistenza dell'impasto) e L (estensibilità dell'impasto) forniti dal produttore erano pari a:

A: 310 (W) e 0,70 (P/L);

B: 200 (W) e 0,55 (P/L).

#### ***Preparazione del campione***

Per preparare le basi per pizza napoletana utilizzate in questo studio, gli impasti sono stati preparati con un farinografo Brabender AT (Belotti strumenti S.r.l., Milano, Italy) e sono stati utilizzati i seguenti ingredienti: 63% farina di grano tenero tipo 00 (A o B), 1.8% sale (Ital-kali, Petralia, Palermo, Italy), 0.2% lievito di birra (Lesaffre Italia, Trecasali, Parma, Italy). Per ciascuna farina (A, B), sono stati scelti il contenuto d'acqua ed il tempo di miscelazione per ottenere una consistenza dell'impasto di 500UB.

Dopo la fase di miscelazione, gli impasti, non lievitati ( $t_0$ ) e lievitati per il tempo ottimale ( $t_{260}$ ) in cella a  $34 \pm 3^\circ\text{C}$  con  $70 \pm 5\%$  UR (3/4 DVmax, Romano *et al.*, 2013), sono stati quindi laminati manualmente e cotti per 90 secondi in un forno a legna pilota del Dipartimento di Agraria dell'Università degli Studi di Napoli-Federico II con peso, lunghezza e diametro medi rispettivamente pari a  $600 \pm 200$  g,  $250 \pm 20$  mm e  $40 \pm 10$  mm.

Sono stati preparati tre lotti di produzione indipendenti.

#### ***Prove farinografiche degli impasti***

Gli indici farinografici valutati mediante un farinografo Brabender AT (Belotti strumenti S.r.l., Milano, Italy) erano: il tempo di sviluppo (min) per raggiungere la massima consistenza, il tempo di stabilità (min), l'elasticità (UB), che è fornita dallo spessore della banda, il grado di rammollimento (UB), che rappresenta la differenza tra la massima consistenza e quella che si riscontra dopo 12 minuti.

Ogni risultato rappresenta la media di tre ripetizioni.

#### ***Studio della cinetica di lievitazione degli impasti***

La cinetica di lievitazione degli impasti attraverso la misura fenomenologica della variazione di volume del prodotto nel tempo è stata valutata mediante un protocollo di analisi dell'immagine (Romano *et al.*, 2013).

Ogni risultato rappresenta la media di tre ripetizioni.

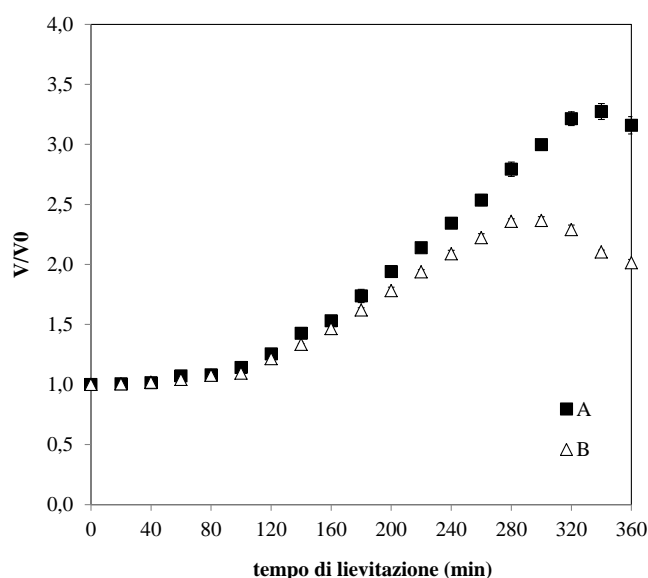
### Valutazione della digeribilità in vitro degli impasti e caratterizzazione del digestato

La digestione gastroduodenale delle pizze è stata simulata utilizzando il modello standardizzato e validato INFOGEST, che include la digestione orale, gastrica e duodenale (Brodkorb *et al.*, 2019). I campioni ottenuti al termine della digestione duodenale (120 min) sono stati centrifugati ed il surnatante è stato sottoposto ad analisi. I peptidi resistenti alla digestione sono stati sequenziati mediante spettrometria di massa interfacciata alla cromatografia liquida, mentre il contenuto di azoto alpha amminico degli amminoacidi di e tri peptidi assorbibili è stato determinato mediante derivatizzazione con metodo otfotalaldeide (OPA).

### Risultati e discussione

La lievitazione è la fase critica della lavorazione della pizza, durante la quale il volume (V) dell'impasto aumenta drasticamente.

In Figura 1 sono riportate le cinetiche di variazione di volume ( $V$  al tempo  $t$  /  $V$  iniziale) degli impasti con A e B durante la lievitazione (360 min). Tale tecnica consente di quantificare il volume dell'impasto e studiarne l'evoluzione (Romano *et al.*, 2013).



**Figura 1.** Evoluzione del volume degli impasti con A (■) e B (Δ) durante la fase di lievitazione (360 min).

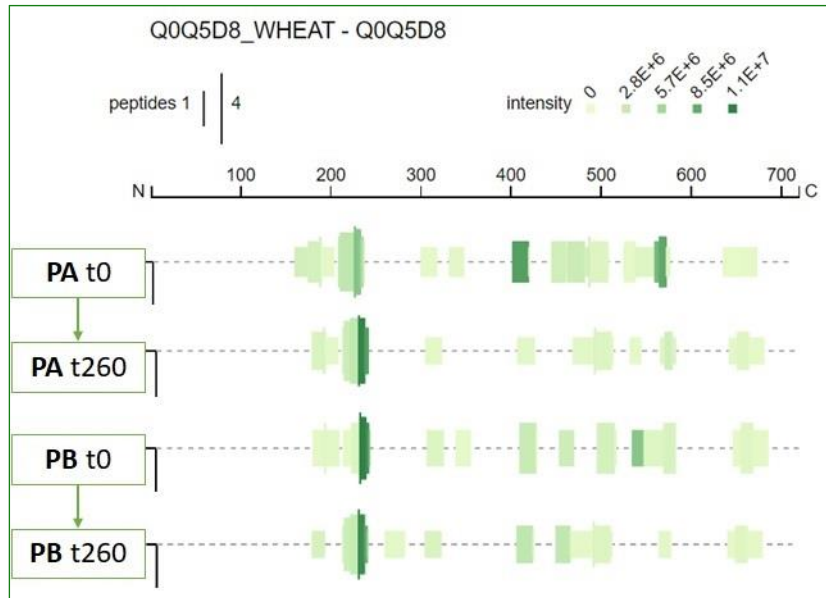
La variazione di volume totale degli impasti nel tempo aumenta da 1,0 fino a 2,0 (B) e a 3,2 (A). Le differenze osservate tra gli impasti dipendono dalle caratteristiche reologiche e strutturali degli sfarinati A e B (W, P/L), come evidenziato anche dalle analisi proteomiche degli impasti.

La digeribilità proteica degli impasti di pizza è stata valutata in funzione di A e B e della durata della lievitazione ( $t_0$ ,  $t_{260}$ ), mediante il protocollo in vitro INFOGEST.

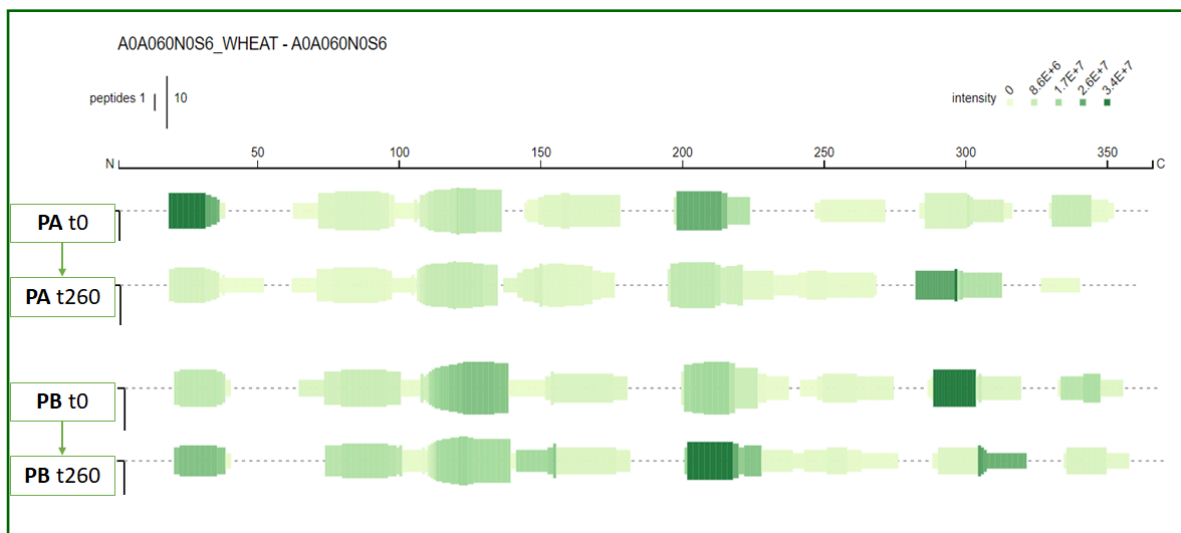
I peptidi derivanti dalla digestione in vitro delle pizze preparate con A (PA) e B (PB) sono stati analizzati dopo cottura allo scopo di determinare eventuali differenze in digeribilità proteica attribuibili ai parametri W e P/L e alla lievitazione (Fig. 2, 3).

Nelle Figure 2 e 3 sono riportate le sequenze proteiche di due proteine modello su cui sono stati mappati i peptidi resistenti alla digestione in vitro: glutenina ad alto peso molecolare (HMW- GS, Fig. 2) e l'Omega Gliadina ( $\omega$ -Gli, Fig. 3).

L'intensità di colore indica la maggiore abbondanza relativa di peptidi nella regione proteica.



**Figura 2.** Peptidi resistenti alla digestione in vitro attribuiti ad una proteina HMW-GS delle pizze con A (PA) e B (PB) ai tempi t0 e t260 di lievitazione identificati via LC MSMS.



**Figura 3.** Peptidi resistenti alla digestione in vitro della proteina  $\omega$ -Gli delle pizze con A (PA) e B (PB) ai tempi t0 e t260 di lievitazione identificati via LC MSMS.

Alcuni peptidi si sono dimostrati resistenti alla digestione (Fig. 2, residuo 150-250) indipendentemente dalla farina (A, B) e dal tempo di lievitazione (t0, t260), mentre altre zone della proteina hanno dimostrato maggiore suscettibilità alla digestione simulata *in vitro* in funzione sia della tipologia di farina che della lievitazione (Fig. 2, residuo 400-600). Nel caso dell'omega gliadina, differenze semiquantitative sono state evidenziate nella regione proteica 200-300 (Fig. 3). Non sono state osservate differenze significative ( $p > 0,05$ ) nel contenuto di aminoacidi liberi assorbibili tra i campioni di pizza analizzati. Le metodiche analitiche utilizzate sono risultate appropriate ed innovative, ma ulteriori studi sono quindi necessari per una correlazione con la digestione umana.

In conclusione, le pizze prodotte (con A e B) mostrano profili differenti in termini di peptidi resistenti a parità di tempo di lievitazione, riflettendo una diversa espressione proteica ed accessibilità agli enzimi gastroduodenali.



## **Bibliografia**

- Bauman Z. 2005. Globalizzazione e glocalizzazione. Armando Editore, Rome.
- Brodkorb A., Egger L., Alminger M., Alvito P., Assunção R., Ballance S., Bohn T., Bourlieu-Lacanal C., Boutrou R., Carrière F., Clemente A., Corredig M., Dupont D., Dufour C., Edwards C., Golding M., Karakaya S., Kirkhus B, Le Feunteun S., Lesmes U., Macierzanka A., Mackie A.R., Martins C., Marze S., McClements D.J., Ménard O., Minekus M., Portmann R., Santos C.N., Souchon I., Singh R.P., Vegarud G.E., Wickham M.S.J., Weitschies W., Recio I. 2019. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4): 991-1014.
- Coppola S., Pepe O., Mauriello G. 1998. Effect of leavening microflora on pizza dough properties. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 891-897.
- EC. 2010. Commission regulation (EU) No. 97/2010, entering a name in the register of traditional SPECIALITIES guaranteed [Pizza Napoletana (TSG)]. *Official Journal of the European Union*, 34: 5. <https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/HTML/?uri=OJ:L:2010:034>.
- Falciano A., Masi P., Moresi M. 2022. Performance characterization of a traditional wood-fired pizza oven. *Journal of Food Science*, 87: 4107-4118.
- Masi P., Romano A., Coccia E. 2015. La Pizza Napoletana. Doppia voce editore, Napoli, ISBN:9788889972519. pp. 1-172.
- Romano A., Cavella S., Toraldo G., Masi P. 2013. 2D Structural imaging study of bubble evolution during leavening. *Food Research International*, 50: 324-329.
- UNESCO (United Nations Education, Scientific and Cultural Organization) 2017. Decision of the Intergovernmental Committee: 12.COM 11.B.17, 2017.

## **Congelamento di panetti per pizza: effetti sulla cinetica di lievitazione e sul comportamento reologico**

C. Covino<sup>1\*</sup>, A. Sorrentino<sup>2\*</sup>, P. Di Pierro<sup>1,2</sup>, P. Masi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Agraria, Università di Napoli Federico II, Via Università 100, 80055 Portici (NA).

<sup>2</sup>Centro di Ateneo per l'Innovazione e lo Sviluppo dell'Industria Alimentare, Università di Napoli Federico II, Via Università 133, 80055 Portici (NA).

\*E-mail: [clelia.covino@unina.it](mailto:clelia.covino@unina.it); [angela.sorrentino@unina.it](mailto:angela.sorrentino@unina.it)

### **Abstract**

The spread on a global scale of the consumption of pizza together with the growing demand for quality products faithful to the tradition of origin of this food, opens the way towards new market frontiers in which it can be hypothesized to sell a pizza dough prepared according to the regulations “TSG”, and then frozen to be distributed as a semi-finished product. In this sense, a study was launched aimed at evaluating the effects of freezing on leavening and on the rheological properties of the doughs after subsequent thawing. The purpose of this study was to identify the optimal leavening stage for freezing pizza dough, in order to obtain thawed and leavened blocks with a similar rheological behavior compared to the non-frozen control. From the analysis of the leavening kinetics, a reduction in the final volume of the dough is observed compared to the control, the more marked the longer the leavening time prior to freezing. Furthermore, there are significant differences in the rheological properties of frozen doughs after thawing, which can be attributed to the damage on gluten cross-linking, mainly produced by the formation of ice crystals during storage.

### **Riassunto**

La diffusione su scala globale del consumo di pizza insieme alla crescente domanda di prodotti di qualità fedeli alla tradizione di origine di questo alimento, apre la strada verso nuove frontiere di mercato in cui si può ipotizzare di commercializzare un panetto per pizza preparato secondo il disciplinare “STG”, e poi congelato per essere distribuito come semilavorato. In tal senso, è stato avviato uno studio rivolto alla valutazione degli effetti del congelamento sulla lievitazione e sulle proprietà reologiche degli impasti dopo successivo scongelamento. Lo scopo di tale studio era quello di individuare lo stadio di lievitazione ottimale per il congelamento degli impasti per pizza, in modo da ottenere panetti scongelati e lievitati con un comportamento reologico simile rispetto al controllo non congelato. Dalle analisi delle cinetiche di lievitazione si osserva una riduzione del volume finale dell'impasto rispetto al controllo, tanto più marcata, quanto più lungo è il tempo di lievitazione precedente al congelamento.

Inoltre, sono riscontrabili sensibili differenze nelle proprietà reologiche degli impasti congelati dopo lo scongelamento, che possono essere attribuite al danno sulla reticolazione del glutine, prodotto principalmente dalla formazione di cristalli di ghiaccio durante la conservazione.

### **Introduzione**

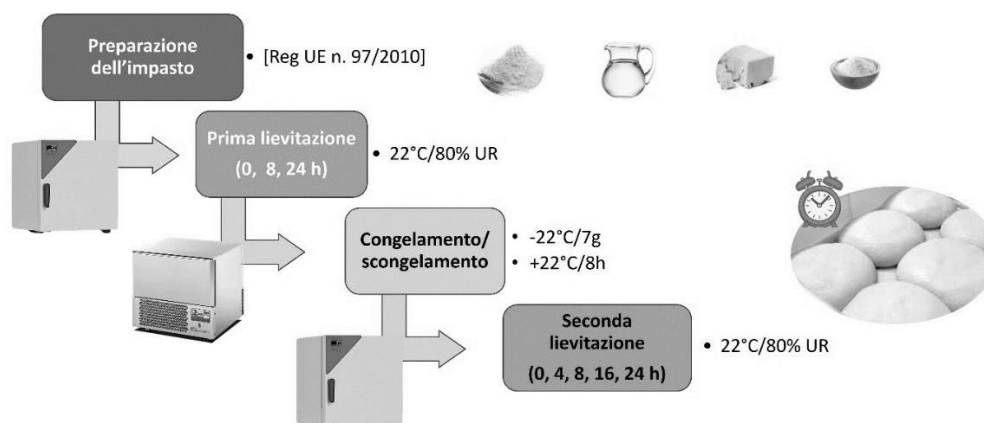
Dal 2017 l'arte del pizzaiolo napoletano è patrimonio culturale dell'Umanità Unesco, e nel mondo cresce sempre più il desiderio di riprodurre la pizza napoletana per soddisfare le richieste di consumatori esigenti. Il processo di preparazione degli impasti per pizza richiede sapienza e maestria che spesso sono difficili da trasferire. I panetti per pizza congelati potrebbero rivelarsi una valida alternativa per garantire alle pizzerie in tutto il mondo la preparazione di vera pizza napoletana di qualità. In tale prospettiva, è stato studiato l'effetto del congelamento sulla capacità di lievitazione, in termini di aumento in volume, e sulle caratteristiche strutturali e

reologiche dei panetti per pizza (Meziani *et al.*, 2012). È noto, infatti, che il congelamento dell'impasto può influire sulle prestazioni di lievitazione dopo scongelamento agendo su due fattori principali: la vitalità dei lieviti e l'integrità della maglia glutinica. Entrambi questi fattori si riflettono sul volume dell'impasto, il primo in maniera diretta, il secondo alterando la capacità dell'impasto di trattenere la CO<sub>2</sub> (Havet *et al.*, 2000).

L'obiettivo di questo studio è quello di individuare lo stadio di lievitazione ottimale per il congelamento degli impasti per pizza, in modo da ottenere panetti scongelati e lievitati con un comportamento reologico simile rispetto al controllo non congelato.

## Materiali e metodi

Il disegno sperimentale per lo studio degli impasti per pizza congelati è illustrato in Figura 1. Dopo la preparazione degli impasti (secondo il regolamento UE n. 97/2010), i panetti per pizza vengono sottoposti ad una prima fase di lievitazione, in una cella a temperatura e umidità controllata (22°C, 80% UR) per diversi tempi (0, 8, 24 h), seguita dal congelamento rapido in abbattitore a -22°C per 7 giorni. Lo scongelamento viene effettuato per 8 ore in cella di lievitazione a 22°C e 80% UR, dopodiché i panetti permangono nelle stesse condizioni per una seconda fase di lievitazione.



**Figura 1.** Schema di processo per la preparazione dei campioni di impasti per pizza.

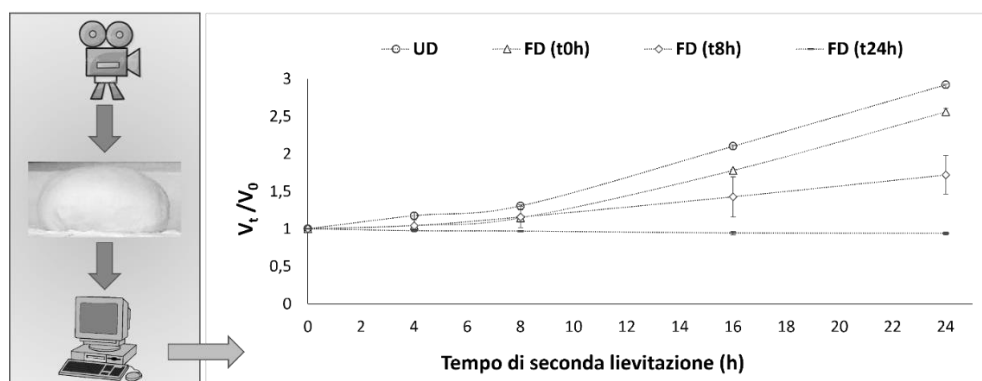
Le variazioni di volume sono state monitorate durante scongelamento e seconda lievitazione, e calcolate con un software per l'analisi dell'immagine (Image J).

A tempi stabiliti di lievitazione totale (0, 4, 8, 16, 24 h) i panetti sono prelevati e sottoposti a prove di stress-relaxation, utilizzando un dinamometro Instron (mod. 5900R).

Per la valutazione della struttura dei panetti lievitati e congelati rispetto al controllo, i campioni sono analizzati mediante prove dinamico-meccaniche con il reometro rotazionale (Haake™Mars™, Thermo Fisher Scientific, USA) e calorimetria a scansione differenziale (DSC Q200, TA Instruments, USA).

## Risultati e Discussione

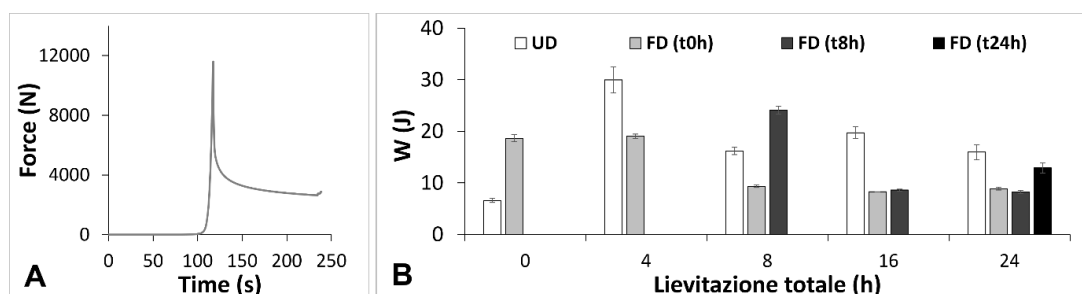
Le curve di cinetica di lievitazione secondaria, dopo congelamento, indicano una riduzione del volume degli impasti congelati rispetto al controllo (Fig. 2). In particolare, il volume del panetto è tanto più ridotto, quanto più lungo è il tempo di lievitazione precedente al congelamento.



**Figura 2.** Cinetica di seconda lievitazione dei panetti per pizza congelati a diversi tempi di prima lievitazione (FD 0, 8, 24) rispetto al controllo non congelato (UD).

Le analisi, attraverso il test di stress-relaxation, sono state effettuate utilizzando dei piatti progettati appositamente per simulare la laminazione della pizza da parte del pizzaiolo, con lo scopo di valutare la risposta del panetto all'applicazione di una forza di compressione sia in termini di lavoro compiuto per ottenere la deformazione (Fig. 3), sia in termini di rilassamento della struttura degli impasti (Peleg, 1979).

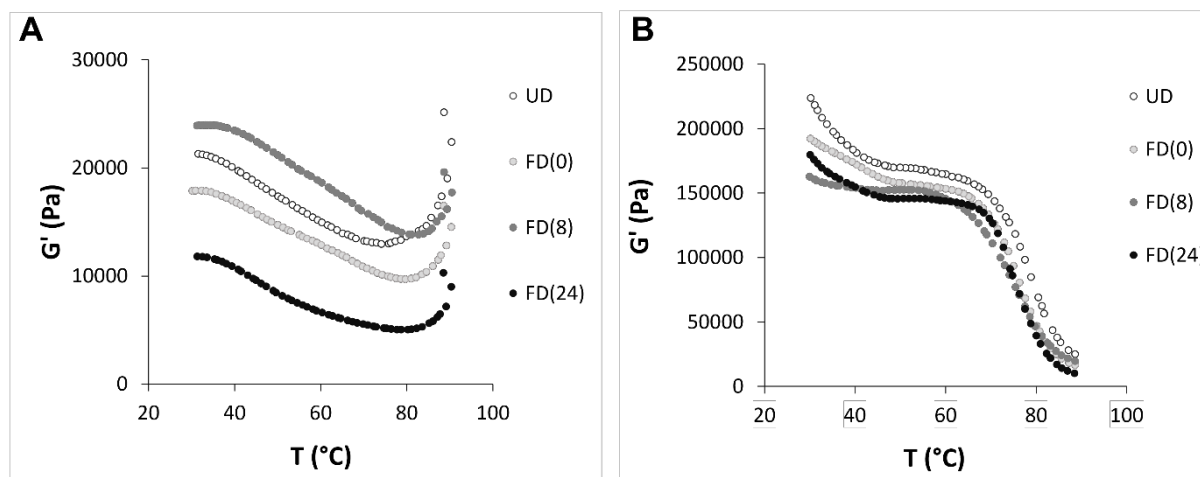
I risultati, hanno evidenziato che il congelamento riduce il lavoro necessario per ottenere la deformazione dei panetti, se paragonati al controllo non congelato allo stesso tempo di lievitazione totale. Fanno eccezione i campioni congelati a t0h e t8h dove i valori di W misurati subito dopo lo scongelamento sono più alti dei rispettivi controlli. Inoltre, la percentuale e le velocità di rilassamento diminuiscono rispetto al controllo e all'aumento dei tempi di lievitazione pre-congelamento (dai non mostrati).



**Figura 3.** Test di Stress-relaxation dei panetti per pizza congelati. A, Curva tipica registrata all'INSTRON; B, lavoro compiuto per ottenere la deformazione, corrispondente all'area sotto la curva. I valori sono riportati in funzione del tempo di lievitazione totale. FD, panetti congelati dopo il tempo di prima lievitazione indicato in parentesi. UD, controllo con congelato.

Informazioni riguardo le alterazioni della rete glutinica possono essere ottenute dall'analisi del modulo elastico ( $G'$ ) degli impasti congelati (Fig. 4).

Durante il riscaldamento le proteine del glutine si denaturano conferendo una maggiore flessibilità alla maglia; al contempo l'amido gelatinizza e il passaggio dallo stato di solido a gel comporta la riduzione della viscosità. Nella fase di raffreddamento, le interazioni tra amido e glutine si consolidano e la viscosità aumenta nuovamente. I risultati dimostrano che soltanto il campione congelato al tempo zero FD (0), mostra un profilo di  $G'$  simile al controllo (UD) indicando che l'interruzione della lievitazione mediante congelamento a qualunque tempo, influisce sulla struttura della matrice, indebolendone la tessitura.



**Figura 4.** Sweep Temperature test di panetti sottoposti a prima lievitazione per il tempo indicato in parentesi, poi congelati e lasciati lievitare nuovamente fino a un tempo totale di 24h dopo scongelamento. Frequenza di oscillazione di 1 Hz, deformazione 0.1%; riscaldamento da 30 a 90 °C (A) e raffreddamento a ritroso (B) con una variazione di 10 °C/min (Masi, 1989).

Analisi preliminari alla DSC hanno rivelato un aumento del  $\Delta H$  di gelatinizzazione dell'amido nei campioni di impasto congelati rispetto al controllo (dati non mostrati), indicando la presenza di un danno arrecato all'amido nel corso del congelamento (Ahmed *et al.*, 2021).

In conclusione, i risultati preliminari delle cinetiche di lievitazione dopo congelamento indicano una riduzione del volume degli impasti congelati rispetto al controllo. Inoltre, sono riscontrabili sensibili differenze nelle proprietà reologiche degli impasti congelati dopo lo scongelamento che possono essere attribuite al danno sulla reticolazione del glutine e all'amido, come evidenziano le proprietà termiche, prodotto principalmente dalla formazione di cristalli di ghiaccio durante la conservazione.

### Ringraziamenti

Questa ricerca è stata finanziata dal MIUR (PRIN 2017 -2017SFTX3Y- La pizza napoletana: lavorazione, distribuzione, innovazione e aspetti ambientali).

### Bibliografia

- Ahmed J., Thomas L., Al-Hazzan A. 2021. Effects of frozen storage on texture, microstructure, water mobility and baking quality of brown wheat flour/ $\beta$ -glucan concentrate Arabic bread dough. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15: 1258-1269.
- Havet M., Mankai M., Le Bail A. 2000. Influence of the freezing condition on the baking performances of French frozen dough. *Journal of Food Engineering*, 45: 139-145.
- Masi P. 1989. Study of the influence of temperature on the rheological behaviour of gluten by means of dynamic mechanical analysis. *Food Properties and Computer-Aided Engineering of Food Processing Systems*, 357-363.
- Meziani S., Jasniewski J., Ribotta P., Arab-Tehrany E., Muller J., Ghouli M., Desobry S. 2012. Influence of yeast and frozen storage on rheological, structural and microbial quality of frozen sweet dough. *Journal of Food Engineering*, 109: 538-544.
- Peleg M. 1979. Characterization of the stress relaxation curves of solid foods. *Journal of Food Science*, 44(1): 277-281.

## **Impiego di farine di legumi nella produzione di basi-pizza gluten-free**

A. Pasqualone\*, M. Costantini, D. De Angelis, F. Vurro, R. Silletti, G. Squeo, F. Caponio, C. Summo

Università di Bari, Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Via Amendola 165/a, 70126 Bari (BA).

\*E-mail: [antonella.pasqualone@uniba.it](mailto:antonella.pasqualone@uniba.it)

### **Abstract**

Many companies market gluten-free pizza bases already seasoned or plain, to be garnished at home, however the nutritional characteristics of these products are not always optimal, since their formulation is too low in fiber and often includes poor quality fats. The use of legumes, rich in proteins and fiber, has not been considered in the pizza bases on the market so far. Therefore, the aim of the present research was to produce gluten-free pizza bases enriched with chickpea flour. The nutritional characteristics of the pizza base significantly improved with the addition of chickpea flour, reaching the level of fiber necessary to claim "source of fiber" on the label (> 3 g of fiber per 100 g product) according to the EU Reg. no. 1924/06. The chickpea-enriched pizza base was different from the control only for a perceivable smell and flavor of chickpeas and in the color, which was darker, with orange hues. No significant differences were observed in flexibility and compressibility, determined sensorially and using a structure analyzer. The liking level of the chickpea-enriched pizza was not significantly different to that of control pizza.

### **Riassunto**

Numerose aziende commercializzano basi-pizza gluten-free, già condite o da guarnire; tuttavia, non sempre le caratteristiche nutrizionali di questi prodotti sono ottimali, poiché la loro formulazione è troppo povera di fibre e spesso include grassi di scarsa qualità. Finora, nelle basi-pizza in commercio non è stato considerato l'impiego di legumi che, invece, sono ricchi di proteine e fibre. Pertanto, lo scopo della presente ricerca è stato quello di produrre basi-pizza senza glutine arricchite di farina di ceci. Le caratteristiche nutrizionali della base-pizza sono risultate significativamente migliori con l'aggiunta di farina di ceci e hanno consentito di raggiungere il livello di fibre necessario per poter apporre in etichetta il claim "fonte di fibre" (> 3 g di fibre per 100 g di prodotto) secondo il Reg. UE no. 1924/06. La base-pizza ai ceci è risultata diversa dal controllo solo per la presenza di odore e *flavor* di ceci e nel colore, che risultava più scuro, con sfumature aranciate. Non si è osservata nessuna differenza significativa nella flessibilità e comprimibilità, determinate sensorialmente e mediante analizzatore di struttura. I risultati del consumer test hanno evidenziato che il gradimento della pizza ai ceci era statisticamente uguale a quello del controllo.

### **Introduzione**

I legumi presentano un buon tenore proteico e aminoacidi essenziali complementari a quelli dei cereali, oltre a molti composti bioattivi, per cui la loro combinazione dietetica con i cereali è altamente consigliata (Temba *et al.*, 2016). Negli ultimi anni, inoltre, i legumi sono stati oggetto di un crescente interesse in quanto rappresentano una fonte proteica sostenibile data la capacità azotofissatrice che esplicano nei suoli.

La pizza è uno degli alimenti italiani più noti e apprezzati in tutto il mondo, anche nelle sue versioni gluten-free. Numerose aziende commercializzano pizze gluten-free, da guarnire o anche già condite; tuttavia, non sempre le caratteristiche nutrizionali di questi prodotti sono ottimali, poiché la loro formulazione è troppo povera di fibre e spesso include grassi di scarsa

qualità (Miranda *et al.*, 2014). Finora, nelle basi-pizza in commercio non è stato considerato l'impiego di legumi, che essendo gluten-free sono invece un ingrediente idoneo.

Uno studio precedente dello stesso gruppo di ricerca ha dimostrato che l'aggiunta di farina di ceci alla pizza convenzionale, pur influenzando negativamente le caratteristiche reologiche dell'impasto, consente comunque di ottenere un prodotto gradevole migliorandone le proprietà nutrizionali in termini di proteine e fibre (Pasqualone *et al.*, 2019).

Lo scopo della presente ricerca è stato, quindi, quello di produrre basi-pizza senza glutine arricchite di farina di legumi, in particolare di ceci, cercando di migliorare le caratteristiche nutrizionali del prodotto finale, senza trascurare la qualità sensoriale.

## Materiali e metodi

La farina di ceci integrale, ottenuta macinando ceci di varietà *kabuli* con un molino da laboratorio (ETA, Vercella Giuseppe, Mercenasco, Italy) munito di un setaccio da 0.6 mm, è stata utilizzata in miscela con farina di riso (Bongiovanni, Villanova Mondovì, Italia), farina di mais (EcorNaturasi SpA, Verona, Italia) e amido di mais (Bongiovanni, Villanova Mondovì, Italia). Le funzionalità del glutine sono state simulate con una miscela di *Psyllium* (*Plantago ovata* Forsk) (Erbavoglio, Brescia, Italia) e idrossipropilmetilcellulosa (HPMC) (Laboratori Bio Line, Canaro, Italia). Sono state realizzate due tipologie di pizza: una pizza controllo a base di farina di riso e mais e una pizza ai ceci (15% sul peso dell'impasto), le cui formulazioni sono riportate in Tabella 1. La formulazione è stata ottimizzata attraverso prove preliminari e il processo produttivo è stato realizzato in reali condizioni di lavoro presso un'azienda produttrice (Antico Forno, Bitonto, Italia). La produzione consisteva nell'idratare lo *Psyllium* con metà dell'acqua da adottare, aggiungervi gli altri ingredienti e impastare con un'impastatrice a spirale (Mecnosud, Flumeri, Italia) per 12 min. L'impasto è poi stato diviso in porzioni di circa 200 g che sono state arrotondate manualmente, lasciate lievitare per 45 min a 35 °C, RH = 20% (EKL 1264, Tecnoeka Srl, Borgoriccio, Italia), appiattite manualmente fino a raggiungere lo spessore di 0.5 cm (diametro circa 28 cm) e cotte a 380 °C per 3 min in un forno elettrico per pizza avente la platea di pietra refrattaria (G3, Ferrari, Rimini, Italia).

**Tabella 1.** Formulazione delle pizze sperimentali

Ingrediente (g/100 g)	Tipo di pizza	
	Controllo	Pizza ai ceci
Farina di riso	30	15
Farina di mais	7,5	7,5
Farina di ceci	-	15
Amido di mais	7,5	7,5
HPMC	1,0	1,0
<i>Psyllium</i>	1,5	1,5
Lievito compresso	1,0	1,0
Sale	1,5	1,5
Acqua	50	50

Le analisi nutrizionali (umidità, proteine, grassi, fibre, ceneri) sono state eseguite secondo i metodi AACC (2009). I composti bioattivi e l'attività antiossidante (test ABTS) sono stati determinati come riportato in Pasqualone *et al.* (2022). Le caratteristiche fisiche (flessibilità e comprimibilità) sono state determinate mediante analizzatore di struttura come riportato in Pasqualone *et al.*, (2019; 2022). L'analisi sensoriale (analisi quantitativa descrittiva) è stata eseguita da un panel addestrato costituito da 8 persone, come riportato in Pasqualone *et al.*, (2019). Il consumer test è stato condotto coinvolgendo 70 consumatori non addestrati (37 donne e 33 uomini di età compresa tra i 30 e i 65 anni), abituali consumatori di pizza e di legumi, nelle

modalità descritte in Pasqualone *et al.*, (2022). Ai consumatori è stato chiesto di indicare se i campioni di pizza fossero graditi o sgraditi, utilizzando una scala da 1 a 5 (1 = poco gradito o poco sgradito; 5 = molto gradito o molto sgradito). Tutti i partecipanti hanno firmato un consenso informato.

## Risultati e discussione

Le caratteristiche nutrizionali della base-pizza (Tab. 2) sono risultate significativamente migliorate a seguito dell'aggiunta di farina di ceci, con incrementi significativi del livello di proteine e fibre. In particolare, hanno consentito di raggiungere i livelli di fibre necessari per poter apporre in etichetta il claim "fonte di fibre" (> 3 g di fibre per 100 g di prodotto) secondo il Reg. UE no. 1924/06. L'attività fermentativa intestinale a carico delle fibre porta alla formazione di acidi grassi a catena corta aventi numerosi effetti positivi sulla salute umana, come il mantenimento dell'omeostasi immunitaria e di quella del glucosio, l'integrità della barriera intestinale e la regolazione dell'appetito (Holscher *et al.*, 2017; Koh *et al.*, 2016). L'apporto di fibre nella dieta occidentale è solitamente inferiore al livello suggerito dai nutrizionisti (Barber *et al.*, 2020), per cui sarebbe necessario riformulare gli alimenti per incrementare il contenuto di fibre degli stessi. Il contenuto di fibre osservato nel controllo era imputabile in parte all'impiego di farina di *Psyllium*. Anche il tenore di lipidi aumentava significativamente aggiungendo la farina di ceci, ma comunque si attestava su valori piuttosto bassi.

**Tabella 2.** Composizione centesimale delle pizze sperimentali

Tipo di pizza	Carboidrati (g/100 g)	Lipidi (g/100 g)	Proteine (g/100 g)	Fibre (g/100 g)
Pizza controllo	69,42 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,03 <sup>b</sup>	7,32 ± 0,01 <sup>b</sup>	2,8 ± 0,1 <sup>b</sup>
Pizza ai ceci	67,64 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,89 ± 0,03 <sup>a</sup>	8,97 ± 0,04 <sup>a</sup>	5,1 ± 0,1 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Lettere diverse in colonna indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0.05$ ).

Per quanto riguarda i composti bioattivi, la pizza ai ceci mostrava un contenuto di carotenoidi totali significativamente maggiore del controllo e, di conseguenza, mostrava un'attività antiossidante maggiore di quest'ultimo (Tab. 3). Il contenuto di composti fenolici osservato nella pizza controllo era simile a quello osservato nella pizza arricchita di farina di ceci. Questo risultato era da attribuirsi alla presenza, nei ceci, di composti bioattivi quali soprattutto i carotenoidi e, in secondo luogo, i composti fenolici (Summo *et al.*, 2019).

**Tabella 3.** Composti bioattivi e attività antiossidante (test ABTS) delle pizze sperimentali

Tipo di pizza	Composti fenolici totali (mg/g acido ferulico)	Carotenoidi totali (mg/kg $\beta$ -carotene)	Attività antiossidante ( $\mu$ mol Trolox/g)
Pizza controllo	0,65 ± 0,05 <sup>b</sup>	3,91 ± 0,04 <sup>b</sup>	1,06 ± 0,07 <sup>b</sup>
Pizza ai ceci	0,71 ± 0,05 <sup>a</sup>	4,71 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,38 ± 0,04 <sup>a</sup>

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

Per quanto riguarda la *texture* della pizza (Tab. 4), la forza necessaria a piegare il campione (da mettere in relazione alla flessibilità dello stesso) aumentava all'aggiunta di farina di ceci, ma senza differenze statisticamente significative. Un simile risultato si è osservato per la comprimibilità. Analogamente, non si sono osservate differenze statisticamente significative nelle variazioni dimensionali in cottura.



**Tabella 4.** Caratteristiche fisiche delle pizze sperimentali

Tipo di pizza	Flessibilità ( <i>bending test</i> ) (N/mm <sup>2</sup> )	Comprimitibilità (N)	Variazione di diametro in cottura	Variazione di spessore in cottura
Pizza controllo	5,27 ± 1,03 <sup>a</sup>	11,2 ± 1,54 <sup>a</sup>	-11,9 ± 1,2 <sup>a</sup>	111,1 ± 19,2 <sup>a</sup>
Pizza ai ceci	6,64 ± 1,02 <sup>a</sup>	13,3 ± 1,23 <sup>a</sup>	-10,1 ± 1,5 <sup>a</sup>	103,9 ± 3,21 <sup>a</sup>

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

La base-pizza ai ceci è risultata significativamente diversa dal controllo solo nel colore, che risultava leggermente più scuro, con sfumature aranciate (Tab. 5). Infatti, i valori di  $a^*$  e  $b^*$  nella pizza arricchita ai ceci erano significativamente maggiori di quelli della pizza controllo, mentre  $L^*$  diminuiva.

**Tabella 5.** Colore delle pizze sperimentali

Tipo di pizza	$L^*$	$a^*$	$b^*$
Pizza controllo	81,31 ± 0,81 <sup>a</sup>	2,60 ± 0,43 <sup>b</sup>	20,38 ± 0,87 <sup>b</sup>
Pizza ai ceci	74,94 ± 0,57 <sup>b</sup>	5,24 ± 0,86 <sup>a</sup>	28,65 ± 0,97 <sup>a</sup>

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

Dal punto di vista sensoriale (Tab. 6), l'odore e il *flavor* di ceci erano entrambi percettibili nelle pizze arricchite.

**Tabella 6.** Caratteristiche sensoriali e risultati del consumer test condotto sulle pizze sperimentali

Descrittore	Tipo di pizza	
	Pizza controllo	Pizza ai ceci
<i>Quantitative Descriptive Analysis</i>		
Odore globale	4,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	4,9 ± 0,1 <sup>a</sup>
Odore di ceci	0,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	3,5 ± 0,6 <sup>a</sup>
Colore	3,7 ± 0,2 <sup>b</sup>	5,2 ± 0,4 <sup>a</sup>
Consistenza	5,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	5,6 ± 0,2 <sup>a</sup>
Flessibilità	5,6 ± 0,4 <sup>a</sup>	5,9 ± 0,2 <sup>a</sup>
Dolce	2,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	2,7 ± 0,2 <sup>a</sup>
Salato	1,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,9 ± 0,4 <sup>a</sup>
<i>Flavor</i> di ceci	0,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	3,9 ± 0,1 <sup>a</sup>
<i>Consumer test*</i>		
Sgradito	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
Gradito	3,8 ± 1,1 <sup>a</sup>	3,8 ± 1,2 <sup>a</sup>

Lettere diverse in riga indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ). \*I dati del consumer test sono stati sottoposti al test non parametrico di Friedman.

Si sono, inoltre, osservate differenze significative con il controllo anche nel colore dei prodotti, in accordo con quanto determinato strumentalmente. Non sono state osservate differenze significative per gli altri descrittori considerati.

I risultati del consumer test hanno evidenziato che il gradimento della pizza ai ceci era uguale a quello del controllo. Considerando che i due prodotti presentavano però delle differenze chiaramente percettibili nel colore (più scuro nella pizza ai ceci) e nell'odore e *flavor* (che, nella pizza ai ceci, rivelavano la presenza degli stessi), l'aver riscontrato un gradimento uguale indica che i consumatori moderni non penalizzano gli alimenti aventi caratteristiche sensoriali nuove,

con un carattere di maggiore “integralità”, in quanto sono guidati nella loro valutazione dalla consapevolezza del maggior valore salutare di tali prodotti.

### **Conclusioni**

In conclusione, l’arricchimento della base pizza con farina di ceci rappresenta un modo semplice ed efficace per aumentare l’apporto dietetico di fibre e proteine. I risultati ottenuti sono di immediata applicabilità pratica e sono importanti non solo dal punto di vista nutrizionale ma anche nell’ottica di pervenire a una maggiore sostenibilità delle produzioni alimentari.

### **Ringraziamenti**

Ricerca condotta nell’ambito del Progetto PRIN 2017 “*The Neapolitan pizza: processing, distribution, innovation and environmental aspects*”.

### **Bibliografia**

- AACC 2009. *American Association of Cereal Chemists, Approved Methods*, 10<sup>th</sup> ed. St Paul, MN.
- Barber T.M., Kabisch S., Pfeiffer A.F., Weickert M.O. 2020. The health benefits of dietary fibre. *Nutrients*, 12(10): 3209.
- Holscher H.D. 2017. Dietary Fiber and Prebiotics and the Gastrointestinal Microbiota. *Gut Microbes*, 8: 172–184.
- Koh A., de Vadder F., Kovatcheva-Datchary P., Bäckhed F. 2016. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell*, 165: 1332–1345.
- Miranda J., Lasa A., Bustamante M.A., Churrua I., Simon E. 2014. Nutritional differences between a gluten-free diet and a diet containing equivalent products with gluten. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69: 182-187.
- Pasqualone A., Costantini M., Faccia M., Difonzo G., Caponio F., Summo C. 2022. The Effectiveness of Extruded-Cooked Lentil Flour in Preparing a Gluten-Free Pizza with Improved Nutritional Features and a Good Sensory Quality. *Foods*, 11(3): 482.
- Pasqualone A., De Angelis D., Squeo G., Difonzo G., Caponio F., Summo C. 2019. The effect of the addition of Apulian black chickpea flour on the nutritional and qualitative properties of durum wheat-based bakery products. *Foods*, 8(10): 504.
- Summo C., De Angelis D., Ricciardi L., Caponio F., Lotti C., Pavan S., Pasqualone A. 2019. Nutritional, physico-chemical and functional characterization of a global chickpea collection. *Journal of Food Composition and Analysis*, 84: 103306.
- Temba M.C., Njobeh P.B., Adebo O.A., Olugbile A.O., Kayitesi E. 2016. The role of compositing cereals with legumes to alleviate protein energy malnutrition in Africa. *International Journal of Food Science and Technology*, 51(3): 543-554.

## Valutazione dell'attività antimicrobica di luppolo indigeno per la produzione di birra artigianale

F. Nazzaro<sup>1\*</sup>, B. Testa<sup>2</sup>, S. J. Lombardi<sup>2</sup>, P. Tremonte<sup>2</sup>, E. Sorrentino<sup>2</sup>, R. Coppola<sup>2</sup>, M. Iorizzo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CNR Istituto di Scienze dell'Alimentazione, Via Roma 64, 83100 Avellino (AV).

<sup>2</sup>Dipartimento Agricoltura, Ambiente e Alimenti (DiAAA), Università degli Studi del Molise, Via Francesco De Sanctis, 86100 Campobasso (CB).

\*E-mail: [filomena.nazzaro@isa.cnr.it](mailto:filomena.nazzaro@isa.cnr.it)

### Abstract

Indigenous ecotypes of hops were evaluated for their suitability in the production process of craft beers, ascertaining their bittering and antimicrobial action. In this regard, the antimicrobial action expressed by six hop samples, differing by sampling area, was evaluated against four potentially altering indicator strains. In addition, through pilot-scale brewing trials, their technological aptitude was verified. Samples of beers brewed with the same ingredients but differing in the use of conventional hops were used as controls. The results showed that the different ecotypes, especially when blended (Mix), not only exhibited an optimal bittering effect, but also a significantly higher protective action than that produced by the conventionally used commercial hops. These results, albeit preliminary, positively meet the "*cleen label*" requirement, which for craft beers is difficult to achieve and to reconcile with the characters of microbiological and sensory quality.

### Riassunto

Ecotipi indigeni di luppolo sono stati valutati per la loro idoneità nel processo produttivo di birre artigianali accertandone l'azione amaricante e antimicrobica. A tal proposito, è stata valutata l'azione antimicrobica espressa da sei campioni di luppolo, differenti per area geografica di raccolta, nei confronti di 4 ceppi indicatori potenzialmente alteranti. Inoltre, attraverso prove di birrificazione su scala pilota è stata accertata la loro attitudine tecnologica. Campioni di birre preparate con i medesimi ingredienti ma differenti per l'impiego di luppolo convenzionale sono stati utilizzati come controllo. Dai risultati ottenuti è emerso che i diversi ecotipi, soprattutto quando impiegati in miscela tra loro (mix), oltre a far apprezzare un ottimale effetto amaricante, hanno esibito un'azione protettiva significativamente superiore rispetto a quella prodotta dal luppolo commerciale convenzionalmente utilizzato. Questi risultati, seppur preliminari, rispondono positivamente al requisito «*cleen label*» che per le birre artigianali è di difficile raggiungimento e poco conciliabile con i caratteri della qualità microbiologica e sensoriale.

### Introduzione

La birra in virtù delle sue caratteristiche chimico e chimico-fisiche può essere considerata una bevanda sicura. Il contenuto di etanolo, la presenza dei composti del luppolo, in particolare quella degli acidi amari (*bitter acid*), il basso pH nonché elevato contenuto di anidride carbonica rappresentano un ostacolo per lo sviluppo di patogeni e molti altri microrganismi. Tuttavia, diversi autori (Juste *et al.*, 2014; Rodriguez-Saavedra *et al.*, 2020) hanno riscontrato la contaminazione da parte di alcuni microrganismi, quali lieviti, batteri lattici (LAB) e batteri

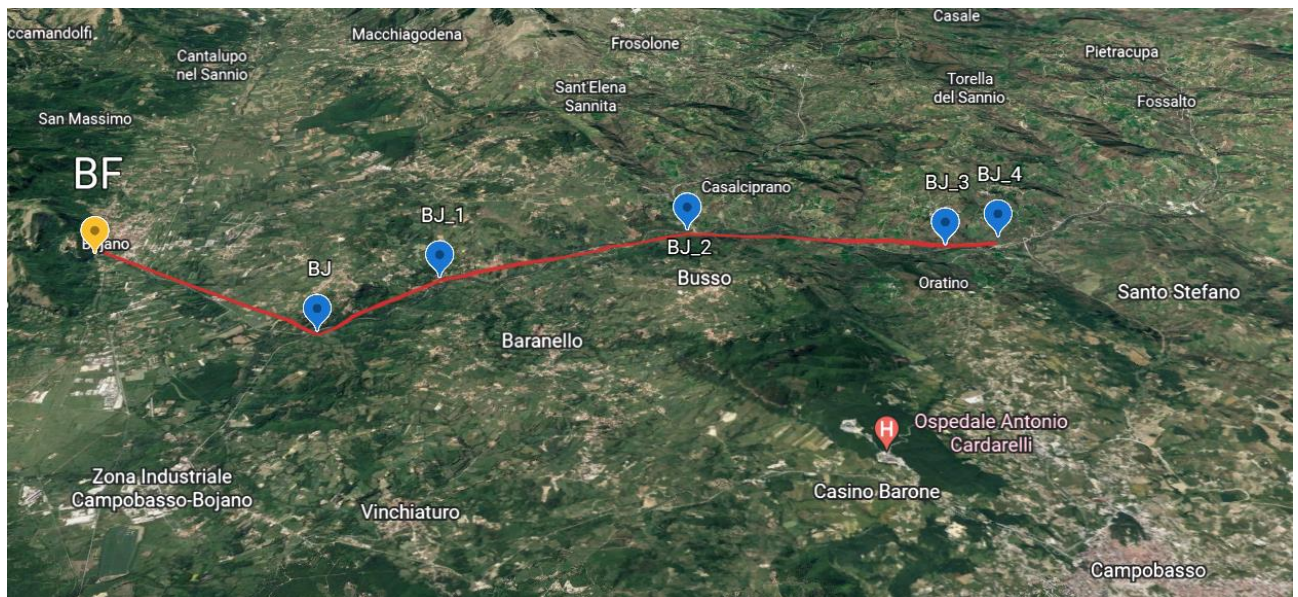
Gram-negativi, responsabili di fenomeni di deterioramento che hanno un impatto negativo sulla qualità della birra.

La problematica assume particolare rilievo nelle birre artigianali il cui processo, mancante delle operazioni di risanamento, consente la permanenza di diverse forme batteriche, soprattutto quelle maggiormente resistenti, quali LAB capaci di formare biofilm (Garofalo *et al.*, 2015). La conservazione attraverso approcci poco invasivi e basati sull'impiego di bio-preservanti naturali rappresenta un emergente tematica di studio nell'ambito della produzione di bevande alcoliche fermentate a base di cereali (Ignat *et al.*, 2020; Rahman *et al.* 2022). Sulla base di tali considerazioni è da sottolineare un interesse crescente nei confronti di antimicrobici naturali provenienti da microrganismi, piante o animali da utilizzare per migliorare la conservabilità della birra. Il luppolo, anche nell'ottica di rispondere al requisito “*clean label*”, sembra essere l'agente protettivo di maggiore interesse (Morrison e McDowell 2022).

## Materiali e Metodi

### Ecotipi di luppolo indigeno

Sei lotti di luppolo indigeno (*Humulus lupulus*) sono stati reperiti nell'areale molisano a ridosso delle sponde del fiume Biferno, nella sua parte prossima alla sorgente (Fig. 1).



**Figura 1.** Mappa satellitare dell'areale caratterizzato dalla presenza spontanea di luppolo (*Humulus lupulus*) indigeno. I punti contrassegnati indicano i sei differenti siti presso i quali sono stati prelevati campioni di luppolo al momento dell'antesi. La linea rossa segue il corso del fiume Biferno che collega i siti di campionamento. Il punto in giallo corrisponde alla sorgente del fiume Biferno

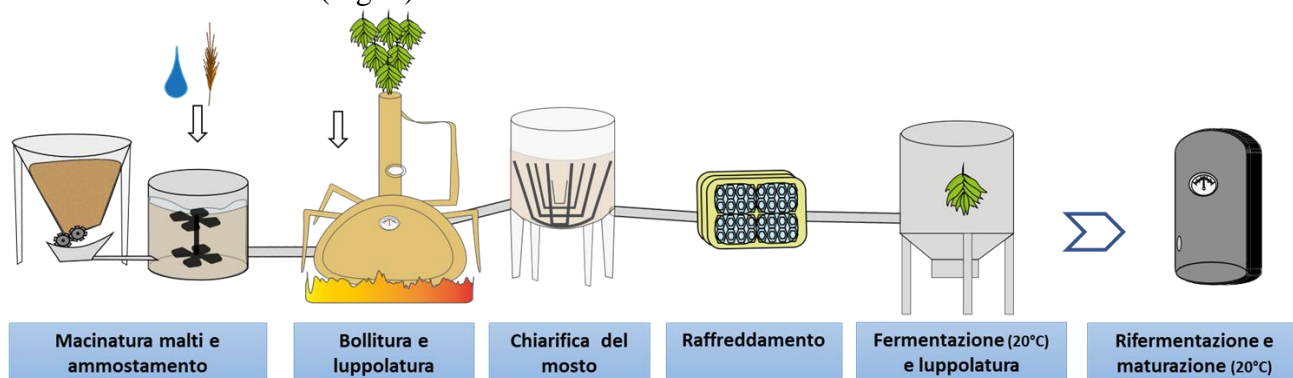
### Attività antimicrobica degli estratti

Da ciascun sito, sono stati prelevati coni di luppolo indigeno sottoposti a successiva estrazione per macerazione. Nello specifico, sono stati ottenuti estratti acquosi, mediante macerazione per 48 ore a freddo in acqua, ed estratti idroalcolici per mezzo di macerazione in soluzione alcolica al 6% v/v, dei sei luppoli utilizzati in purezza (BF, BJ, BJ\_1, BJ\_2, BJ\_3, BJ\_4) e in miscela tra loro (Mix). Di ciascun estratto è stata valutata, mediante tecnica agar *well diffusion assay*, l'azione antagonista espressa nei confronti di quattro ceppi utilizzati come indicatori di

alterazione, quali: *Lactiplantibacillus plantarum* DSM 20174, *Levilactobacillus brevis* DSM 20054, *Pediococcus acidilactici* DSM 20284, *Fructilactobacillus lindneri* DSM 20690.

### **Birrificazioni su scala pilota**

Al fine di valutarne l'attitudine tecnologica e qualitativa, i campioni di luppolo indigeno, in miscela tra loro, sono stati utilizzati in prove di birrificazione su scala pilota. Sono state allestite due tesi (HM e Mix), ciascuna utilizzando 25 L di mosto base «Blonde Ale» (pH=5.2; °P=11.4; EBC=15) seguendo lo schema di lavorazione riportato in Figura 2. Per l'ammestamento è stato utilizzato malto d'orzo distico da filiera italiana e acqua del Matese. Il luppolo è stato utilizzato in fase di bollitura e in quella di fermentazione. Nella tesi HM, utilizzata come tesi di confronto, è stato impiegato un luppolo commerciale della varietà «Huell Melon» (Yackima chief hops, LLC). Per la tesi Mix il mosto è stato amaricato e aromatizzato con la miscela di coni di luppolo fresco raccolti dai sei siti (Fig. 1).



**Figura 2.** Schema della birrificazione condotta su impianto pilota da 25 L (reparto R&S del Birrifico artigianale «Birra del Contado»).

### **Analisi sensoriale**

Al termine della rifermentazione e maturazione in bottiglia, è stata condotta l'analisi sensoriale delle birre ottenute dalle due birrificazioni. L'analisi è stata eseguita da una commissione panel costituita da una giuria di 20 giudici (10 femmine e 10 maschi), di età compresa tra i 22 e i 61 anni, reclutati dall'Organizzazione Nazionale Assaggiatori di Vino (ONAV, Italia, 1981). Nel processo di valutazione sono stati inclusi tredici attributi, derivati dalla letteratura (Da Costa *et al.*, 2018), quattro attributi visivi (persistenza della schiuma, consistenza della schiuma, limpidezza e colore), sei gustativi (persistenza, amaro, dolce, corpo, astringenza, equilibrio) e tre riguardavano la valutazione olfattiva (intensità, complessità e qualità). È stata utilizzata una scheda di assaggio, con una scala numerica da 0 a 5, dove 0 corrispondeva ad assenza di percezione dell'attributo e 5 ad una intensità molto alta. I giudici hanno ricevuto acqua minerale e grissini secchi non salati per la pulizia del palato tra i campioni, per evitare effetti di trascinamento.

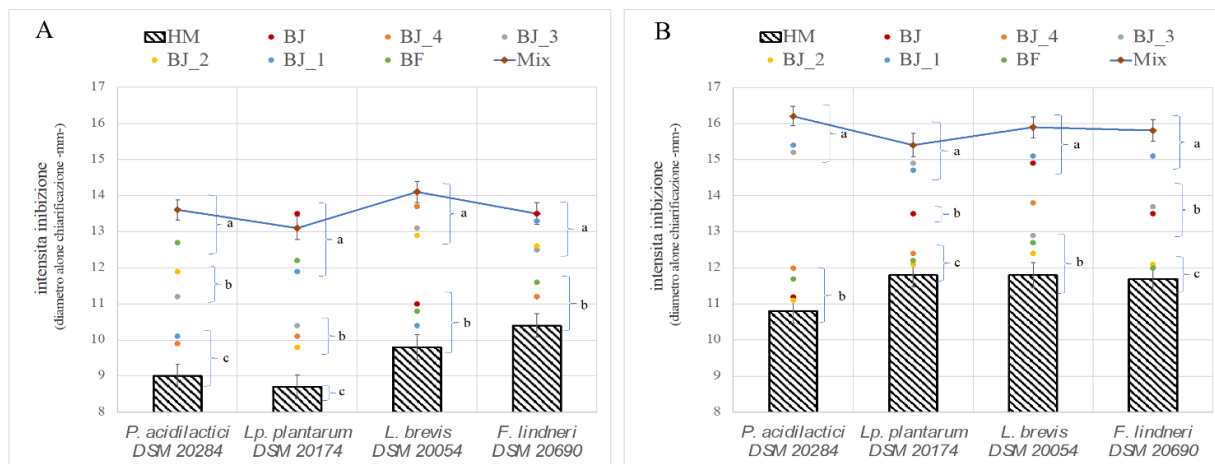
### **Risultati e discussione**

#### **Attività bioprotettiva**

L'efficacia antimicrobica dei luppoli indigeni è stata valutata nei confronti di quattro differenti ceppi di batteri lattici. Sono numerosi i batteri, sia Gram-negativi sia Gram-positivi (Bose *et al.*, 2021), descritti come resistenti ai composti antimicrobici del luppolo e alcuni ceppi riferibili a specie di batteri lattici appaiono particolarmente insidiosi per la qualità della birra (Rodríguez-Saavedra 2020). I risultati relativi all'attività antimicrobica (Fig. 3) hanno evidenziato che gli



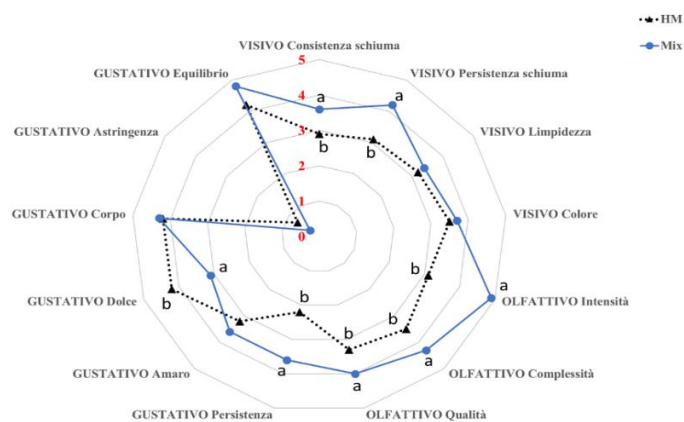
estratti dei luppoli indigeni causano, nei confronti dei microrganismi indesiderati, una attività inibente significativamente superiore rispetto a quella prodotta dagli estratti di luppolo commerciale. Un effetto sinergico nell'attività antimicrobica si è registrato con il mix degli estratti ottenuti dai luppoli indigeni facendo apprezzare, nei confronti dei ceppi batterici indicatori, una azione inibente maggiore rispetto a quella degli estratti impiegati singolarmente.



**Figura 3.** Attività antimicrobica espressa dagli estratti acquosi (A) e dagli estratti idroalcolici (B) di coni freschi di luppolo (*Humulus lupulus*) indigeno (BF, BJ, BJ\_1, B\_J2, B\_J3, B\_J4), del luppolo commerciale (HM) e del mix di luppoli (Mix). Il diametro (mm) dell'alone di inibizione prodotto dagli estratti dei luppoli nei confronti dei 4 ceppi microbici indicatori è riportato come media di 5 determinazioni. L'azione inibente espressa dagli estratti di luppolo commerciale è rappresentata con gli istogrammi, quella espressa dagli estratti di luppolo indigeno è rappresentata con punti di colore diverso. I punti rossi collegati con la linea azzurra rappresentano l'azione espressa dagli estratti della miscela dei sei lotti di luppolo (Mix). Lettere differenti (a,b,c) indicano differenze significative tra i valori rilevati.

### Effetto sulla qualità sensoriale

L'introduzione di innovazioni tecnologiche e biotecnologiche nella preparazione di birra non può prescindere dal loro effetto sugli attributi olfattivi e gustativi (Kordialik-Bogacka, 2022). I risultati derivanti dall'analisi sensoriale (Fig. 4) evidenziano che la miscela di luppoli indigeni influenza positivamente alcuni attributi olfattivi e gustativi del prodotto finale.



**Figura 4.** Attributi sensoriali, visivi, olfattivi e gustativi delle birre ottenute da birrificazioni di mosti di malto amari e aromatizzati con la miscela di luppoli indigeni (Mix) e luppolo commerciale

(HM). I valori di ciascun attributo rappresentano la media dei punteggi attribuiti. Le lettere differenti (a,b) indicano differenze sensoriali significative.

## Conclusioni

I risultati evidenziano che la luppolatura influenza significativamente la qualità microbiologica delle birre. Il ricorso a ecotipi di luppolo indigeno rappresenta una interessante strategia nello sviluppo di innovazioni biotecnologiche atte a diversificare i prodotti e garantire una elevata qualità microbiologica e sensoriale delle birre.

## Bibliografia

- Bose N., Auvil D. P., Moore E. L., Moore S. D. 2021. Microbial communities in retail draft beers and the biofilms they produce. *Microbiology Spectrum*, 9(3): e01404-21.
- Ignat M. V., Salanță L. C., Pop O. L., Pop C. R., Tofană M., Mudura E., Pasqualone A. 2020. Current functionality and potential improvements of non-alcoholic fermented cereal beverages. *Foods*, 9(8): 1031.
- da Costa Jardim C., De Souza D., Cristina Kasper Machado I., Massochin Nunes Pinto L., de Souza Ramos R. C., Garavaglia J. 2018. Sensory profile, consumer preference and chemical composition of craft beers from Brazil. *Beverages*, 4(4): 106.
- DPR 563 8 Luglio 1981-Riconoscimento Della Personalità Giuridica dell'O.N.A.V.; G.U., 1981; Volume 280.
- Garofalo C., Osimani A., Milanovic V., Taccari M., Aquilanti L., Clementi F. 2015. The occurrence of beer spoilage lactic acid bacteria in craft beer production. *Journal of Food Science*, 80(12): M2845-M2852.
- Juste A., Malfliet S., Waud M., Crauwels S., De Cooman L., Aerts G., Lievens B. 2014. Bacterial community dynamics during industrial malting, with an emphasis on lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 39: 39-46.
- Kordialik-Bogacka E. 2022. Biopreservation of beer: Potential and constraints. *Biotechnology Advances*, 58: 107910.
- Morrison E., McDowell S. "Back to the Wild: A Comparative Study of the Antimicrobial Properties of *Humulus lupulus*" (2022). *Celebration of Scholarship*. 5. <https://digitalcommons.shawnee.edu/cos/2022/trustees/5>
- Rahman M., Islam R., Hasan S., Zzaman W., Rana M. R., Ahmed S., Mukta Roy I, Sayem A., Matin A., Raposo A., Zandonadi R.P., Assunção Botelho R.B., Sunny A. R. 2022. A Comprehensive review on bio-preservation of bread: An approach to adopt wholesome strategies. *Foods*, 11(3): 319.
- Rodríguez-Saavedra M., de Llano D. G., Moreno-Arribas M. V. 2020. Beer spoilage lactic acid bacteria from craft brewery microbiota: Microbiological quality and food safety. *Food Research International*, 138: 109762.

## **Caratterizzazione di un malto tipico siciliano attraverso l'introduzione di metodi di coltivazione e di trasformazione delle materie prime innovative: Il Progetto INNO.MALTO**

A.M. Lo Scalzo<sup>1</sup>, S. Licciardello<sup>1\*</sup>, F. Sciacca<sup>1</sup>, E. Li Puma<sup>1</sup>, A. Leonardi<sup>1</sup>, A. Pesce<sup>1</sup>, D. D'Angelo<sup>2</sup>, A. Gianinetti<sup>3</sup>, N. Faccini<sup>3</sup>, M. Palumbo<sup>1</sup>, N. Virzi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali (CREA-CI), Corso Savoia 190, 95024 Acireale (CT).

<sup>2</sup>ESA - Ente di Sviluppo Agricolo – Contrada S. Barbara, S.P.21, Agira (EN).

<sup>3</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Genomica e Bioinformatica (CREA-GB), Via S. Protaso 302, 29017 Fiorenzuola d'Arda (PC).

\*E-mail: [stefania.licciardello@crea.gov.it](mailto:stefania.licciardello@crea.gov.it)

### **Abstract**

The INNO.MALTO project involves farms, breweries and research centers in Sicily, with the following objectives: the creation of a supply chain that includes the use of raw materials grown in Sicily; obtain an agricultural and craft beer by creating a direct link between farms and processors; promote on the markets a final product that can be defined as "born in Sicily". The aim of this work is the characterization of beer production with the introduction of innovations in the supply chain, using innovative raw materials. Within the production chain of malt for beer, 4 two-row barley varieties with high malt quality and particularly suitable for Sicilian environments (Concerto, Fortuna, Fandaga and Planet), and 4 old Sicilian wheat landraces (Bidi, Strazzavisazzi, Timilia and Maiorca) have been used. Wheat and barley genotypes, selected in previous experiments conducted by CREA and Catania University, were cultivated in the farms involved in the project and their agronomic performances and malt characteristics were validated. Field activities had the purpose of introducing alternative crops to durum wheat in crop rotation, in order to enhance biodiversity and adopting new cultivation protocols. The first results show good yields and excellent adaptability of some two-row barley varieties, in particular of the earliest genotypes.

### **Riassunto**

Il progetto INNO.MALTO, coinvolge in Sicilia aziende agricole, birrifici e centri di ricerca, con i seguenti obiettivi: creare una filiera che preveda l'utilizzo di materie prime coltivate in Sicilia; ottenere una birra agricola e artigianale creando un collegamento diretto tra aziende agricole e trasformatori; promuovere sui mercati un prodotto finale "Born in Sicily". Nel presente lavoro vengono riportati i dati preliminari riguardanti la caratterizzazione delle materie prime da destinare alla maltazione siciliana. In particolare, sono state utilizzate 4 varietà di orzo distico (Concerto, Fortuna, Fandaga e Planet), ad elevata qualità maltaria e particolarmente adatte agli ambienti siciliani, e 4 *landraces* di frumenti siciliani (Bidi, Strazzavisazzi, Timilia e Maiorca). Presso le aziende agrarie coinvolte nel progetto, sono state verificate le caratteristiche agronomiche e maltarie delle varietà di orzo distico e di frumento, selezionate nelle sperimentazioni già condotte dal CREA e dall'Università di Catania. I primi risultati mostrano buone rese e ottima adattabilità di alcune varietà di orzo distico, in particolare dei genotipi più precoci. Inoltre, le condizioni ambientali siciliane, che assicurano la maturazione delle cariossidi in assenza di umidità elevata, favoriscono l'ottenimento di produzioni di buona qualità maltaria e ottima qualità igienico-sanitaria, in quanto esenti da micotossine.



## Introduzione

La continua espansione della produzione di birra agricola e artigianale ha evidenziato l'esigenza di proporre sul mercato nuovi prodotti che vadano incontro alle necessità della filiera brassicola e, in particolare, all'esigenza di disporre di malto caratterizzato e tracciato, legato al territorio di produzione e quindi proveniente da orzi e frumenti di origine locale. La capacità dei birrai artigianali di creare connessioni con il territorio locale produce un senso di distintività che soddisfa il desiderio dei consumatori di ristabilire il collegamento con i luoghi, le comunità e le economie locali. Questa peculiarità permette di differenziare i prodotti conferendo una forte identità ai birrifici artigianali (Garavaglia *et al.*, 2020).

Nell'ambito del PSR Sicilia 2014-2020, è stato avviato il progetto "INNO.MALTO - Caratterizzazione di un malto tipico siciliano attraverso l'introduzione di metodi di coltivazione e di trasformazione delle materie prime innovative". Il progetto coinvolge in Sicilia aziende agricole, birrifici e centri di ricerca, con l'obiettivo di incrementare il reddito degli attori della filiera cereali-malto-birra, mediante l'immissione sul mercato di una tipologia innovativa di prodotto (malto) contraddistinto da una forte caratterizzazione locale ("*Born in Sicily*" e "100% siciliano") e da elevate proprietà qualitative. In quest'ottica, le attività previste nel progetto rappresentano una favorevole occasione per trasferire innovazione alle imprese siciliane attive nel settore brassicolo, interessate a investire su una qualificazione e caratterizzazione del prodotto legata alla specificità delle materie prime, quali malti d'orzo e di frumento di varietà locali siciliane e lieviti di elevata qualità. Attraverso la caratterizzazione del malto, ottenuto con l'utilizzo delle più idonee varietà di orzi e frumenti siciliani, e l'introduzione nel processo produttivo di lieviti innovativi, il progetto si propone di fornire nuove soluzioni al comparto cerealicolo, in un contesto di difficoltà produttive ed organizzative. In particolare, le aziende agricole verificheranno la possibilità di differenziare proficuamente i propri ordinamenti produttivi, con l'inserimento di innovazioni in grado di portare ad una definizione di nuovi prodotti in modo da attivare una filiera brassicola interamente siciliana, con ricadute positive per tutti gli attori della filiera stessa. A monte della filiera, le aziende agricole potranno beneficiare di innovazioni utili ad una diversificazione aziendale, in modo da andare incontro alle rinnovate esigenze di mercato e con la possibilità di stipulare contratti di filiera. A valle, invece, i birrifici agricoli /artigianali, ma anche le industrie di trasformazione di alimenti funzionali a base di orzo, potrebbero disporre di un prodotto finale innovativo, caratterizzato e tracciato, da proporre nel mercato con un *brand* "Sicilia", che conferirebbe un valore aggiunto intrinseco (Virzì *et al.*, 2017).

## Materiali e metodi

La fase preliminare, per la scelta dei genotipi da suggerire alle aziende agricole, ha previsto la caratterizzazione e la valutazione agronomica di varietà di orzo e di frumenti, coltivate in Sicilia in regime convenzionale e biologico. Presso l'azienda agricola sperimentale del CREA sono state condotte prove sperimentali parcellari di confronto varietale di genotipi di orzo da malto e vecchie popolazioni siciliane di frumento duro e tenero. Nell'annata 2020/2021, a supporto delle aziende agricole coinvolte nel progetto, in località Libertinia (CT), è stata condotta una prova sperimentale, comprendente 16 cultivar di orzo distico, seminate in parcelle da 10 m<sup>2</sup> secondo uno schema sperimentale a blocchi randomizzati e tre ripetizioni. Nelle quattro aziende agricole partner del progetto, dislocate nelle aree interne della Sicilia, quali Aidone (EN), Dittaino (EN), Valledolmo (PA) e Nicosia (EN), è stata effettuata la coltivazione in pieno campo di tre *landraces* siciliane di frumento duro (Bidì, Strazzavisazzi, Timilia), una di frumento tenero (Maiorca) e quattro varietà di orzo distico da malto (Concerto, Fortuna, Fandaga e RGT Planet). A sostegno delle aziende coinvolte nel progetto, il CREA di Acireale ha predisposto un protocollo di coltivazione basato sull'individuazione di percorsi agronomici

idonei alla produzione di orzo e frumento di elevata qualità maltaria. Durante il ciclo biologico, sono stati rilevati in campo i seguenti parametri: epoca di spigatura, altezza delle piante, numero di spighe per m<sup>2</sup>. Dopo la raccolta, presso i laboratori del CREA di Acireale, i campioni di granella sono stati analizzati attraverso la strumentazione Infratec Grain Analyzer 1241- FOSS, che si avvale del metodo della trasmittanza nel vicino infrarosso, per la determinazione di umidità, contenuto proteico e peso ettolitrico. Inoltre, è stato determinato il peso di 1000 semi.

## Risultati e discussioni

Nelle Tabelle 1 e 2 vengono illustrati i risultati agronomici e qualitativi dei genotipi di orzo e frumenti coltivati nell'annata 2020/21, presso le aziende agricole coinvolte nel progetto.

**Tabella 1.** Risultati medi dei genotipi in prova nelle quattro aziende.

	VARIETA'	epoca di spigatura (gg da 1/04)	altezza pianta (cm)	N spighe /m <sup>2</sup>	resa t/ha	umidità (%)	proteine (% ss)	peso ettolitrico (kg/hl)	peso 1000 semi (g)	
ORZO	CONCERTO	35	65	822	3,48	9,0	10,5	64,8	33,3	
	FORTUNA	36	63	853	3,88	9,6	9,1	67,7	39,7	
	FANDAGA	35	63	776	4,21	9,9	9,4	65,7	37,0	
	PLANET	38	68	679	3,67	9,9	10,0	64,8	36,7	
	MEDIA	36	65	783	3,81	9,6	9,7	65,7	36,7	
	LANDRACES	epoca di spigatura (gg da 1/04)	altezza pianta (cm)	N spighe /m <sup>2</sup>	resa t/ha	umidità (%)	proteine (% ss)	glutine (% ss)	peso ettolitrico (kg/hl)	peso 1000 semi (g)
FRUMENTO	BIDI'	36	95	385	1,81	9,2	11,7	7,8	83,6	43,2
	STRAZZAVISAZZI	26	110	305	1,66	9,3	12,2	8,8	80,3	48,0
	TIMILIA	44	95	352	1,66	9,0	12,2	9,1	82,6	31,3
	MAIORCA (FT)	39	90	555	2,07	9,0	11,1		80,9	36,2
	MEDIA	36	97	399	1,80	9,1	11,8	8,6	81,8	39,7

**Tabella 2.** Risultati medi ottenuti nelle quattro aziende.

	località	epoca di spigatura (gg da 1/04)	altezza pianta (cm)	N spighe /m <sup>2</sup>	resa t/ha	umidità (%)	proteine (% ss)	peso ettolitrico (kg/hl)	peso 1000 semi (g)
ORZO	Aidone	39	60	526	2,58	8,1	10,2	64,6	36,9
	Dittaino	26	54	1051	4,60	8,9	11,0	63,9	26,8
	Valledolmo	43	70	673	2,75	10,1	8,1	67,0	41,0
	Nicosia	37	75	881	<b>5,32</b>	11,4	9,6	67,3	42,1
	MEDIA	36	65	783	3,81	9,6	9,7	65,7	36,7
	località	epoca di spigatura (gg da 1/04)	altezza pianta (cm)	N spighe /m <sup>2</sup>	resa t/ha	umidità (%)	proteine (% ss)	peso ettolitrico (kg/hl)	peso 1000 semi (g)
FRUMENTO	Aidone	31	100	328	1,33	8,3	13,9	81,2	40,5
	Dittaino	28	99	481	2,29	8,5	11,2	81,3	38,8
	Valledolmo	46	82	305	1,47	9,4	10,4	82,5	41,5
	Nicosia	39	108	483	2,11	10,3	11,7	82,4	38,0
	MEDIA	36	97	399	1,80	9,1	11,8	81,8	39,7

I risultati mettono in evidenza le differenti caratteristiche qualitative delle accessioni in studio. Per quanto riguarda gli orzi, la resa più elevata, nella media dei quattro campi, è stata riscontrata

per la cultivar Fandaga. La varietà Fortuna ha mostrato i valori più elevati per il peso ettolitrico, il peso dei 1000 semi e il numero di spighe per unità di superficie, evidenziando così ottima capacità di accostamento. In riferimento alle accessioni di frumento duro e tenero, va rilevato come le *landraces* siciliane abbiano mostrato rese ampiamente inferiori rispetto agli orzi. Solo il grano tenero Maiorca ha superato, nella media dei quattro ambienti, le 2 t/ha, mostrando anche una buona densità di spighe. Fra i grani duri, Strazzavisazzi ha evidenziato un elevato peso dei semi e una buona precocità, mentre le altre varietà da conservazione hanno confermato di avere un ciclo biologico tardivo. La *landrace* Bidì ha presentato un ottimo peso ettolitrico. Nella Tabella 3 sono riportati i risultati agronomici e produttivi delle 16 varietà di orzo da malto valutate nella prova parcellare condotta dal CREA di Acireale, in località Libertinia, nell'annata agraria 2020/2021. Le cultivar Sunshine, Lg Belcanto, Rgt Planet, Rgt Orbiter e Quench hanno mostrato la produttività più elevata, con rese superiori a 5 t/ha. Le varietà più tardive hanno mostrato rese più modeste. Il contenuto in proteine della granella è risultato inversamente proporzionale alla resa e le varietà più produttive, quindi, hanno fatto rilevare un tenore proteico più basso.

**Tabella 3.** Prova rete nazionale varietà di orzo da malto - Libertinia (CT) 2020/2021.

Varietà	Resa (t/ha)	Umidità granella (%)	Peso 1000 semi (g)	Peso ettolitrico (kg/hl)	Fittezza parcella (0-9)	Epoca di spigatura (gg da 1/4)	Altezza pianta (cm)	Proteine granella (%)
SUNSHINE	5,48	8,5	38,6	66,2	9	22	55	10,2
LG BELCANTO	5,19	8,7	39,2	62,9	8	25	54	10,6
RGT PLANET	5,15	8,6	41,7	65,0	8	22	57	10,0
RGT ORBITER	5,01	8,8	39,7	63,5	8	23	62	10,6
QUENCH	5,00	8,5	37,9	64,5	9	25	52	10,1
BULLE	4,98	8,8	38,9	62,8	8	22	57	9,2
ALASTRO	4,85	8,6	42,8	62,4	9	19	67	11,4
RGT ASTEROID	4,55	8,9	39,8	64,9	8	25	57	11,3
TEA	4,55	9,0	39,0	65,7	8	23	68	11,0
STANZA	4,55	8,4	39,1	64,2	8	23	59	10,9
FATIMA	4,52	8,6	40,7	65,9	8	22	55	10,7
FORTUNA	4,45	8,6	39,3	61,8	6	22	58	11,4
CONCERTO	4,32	8,3	37,7	63,3	8	24	63	11,7
LAUREATE	4,13	8,7	39,7	60,9	7	27	56	10,4
MONROE	3,50	8,7	34,2	56,9	7	26	66	11,2
SUEZ	2,55	8,9	29,1	53,0	7	29	55	13,4
Media	4,55	8,6	38,6	62,7	8	24	59	10,9
Coeff. Variabilità (CV)	11,14	2,8	5,28	2,87	11,25	5,06	5,95	6,57
Significatività (1)	***	*	***	***	***	***	***	***

I risultati intermedi ottenuti pongono le basi per la realizzazione di una filiera brassicola che preveda l'utilizzo di materie prime coltivate in Sicilia e che porti a un prodotto finale "*Born in Sicily*" di elevata qualità.

### Bibliografia

Garavaglia C. 2020. The emergence of Italian craft breweries and the development of their local identity. In: *The geography of beer*. Springer, Cham, 2020. pp. 135-147.

Virzì N., Licciardello S., Sciacca F., Palumbo M. 2017. Orzo da malto: prospettive di sviluppo per una filiera di "birra made in Sicily". *Agrisicilia* (ISSN 2039-8212), 10: 41-44.

*Lavoro realizzato nell'ambito del progetto "INNO.MALTO. "Caratterizzazione di un malto tipico siciliano attraverso l'introduzione di metodi di coltivazione e di trasformazione delle materie prime innovative" approvato e finanziato nell'ambito della Sottomisura 16.1 "Sostegno per la costituzione e la gestione dei gruppi operativi del P.E.I. in materia di produttività e sostenibilità dell'Agricoltura" del Programma di Sviluppo Rurale 2014-2022 della Regione Sicilia, in attuazione del Fondo europeo agricolo di sviluppo rurale (FEASR).*

## **Impiego del lievito criotollerante *Saccharomyces cerevisiae* 41CM nella produzione di birra lager**

M. Iorizzo, B. Testa, P. Tremonte, S. J. Lombardi, M. Succi, F. Letizia\*, G. Albanese, E. Sorrentino, R. Coppola

Dipartimento di Agricoltura Ambiente e Alimenti, Università degli Studi del Molise, via De Sanctis, 86100 Campobasso (CB).

\*E-mail: [f.letizia@studenti.unimol.it](mailto:f.letizia@studenti.unimol.it)

### **Abstract**

The aim of the study was to evaluate the technological aptitude of the cryotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* 41CM in the production of “Lager” beer, which is usually brewed using strains belonging to the *Saccharomyces pastorianus* species. The experiment, conducted on a laboratory scale, involved the use of a model wort and the commercial strain *S. pastorianus* Weihenstephan 34/70 (Fachhochschule Weihenstephan, Freising, Germany) as reference strain. The fermentation kinetics of the two yeasts (at 12 °C) and the quantities of the main fermentation products were similar. The results demonstrated the good potential of *S. cerevisiae* strain 41CM to be used as a starter in Lager beer production.

### **Riassunto**

Lo studio ha inteso valutare l’attitudine tecnologica del lievito criotollerante *Saccharomyces cerevisiae* 41CM nella produzione di birra ‘Lager’ che, usualmente, viene prodotta utilizzando ceppi appartenenti alla specie *Saccharomyces pastorianus*. La sperimentazione, effettuata su scala di laboratorio, ha previsto l’utilizzo di un mosto di birra modello e come lievito di riferimento il ceppo commerciale *S. pastorianus* Weihenstephan 34/70 (Fachhochschule Weihenstephan, Freising, Germany). Le cinetiche fermentative dei due lieviti (a 12 °C) e le quantità dei principali prodotti di fermentazione sono state simili. I risultati hanno evidenziato buone potenzialità del ceppo *S. cerevisiae* 41CM ad essere usato come starter nella produzione di birra Lager.

### **Introduzione**

È noto che le caratteristiche chimiche e sensoriali della birra, oltre alla qualità delle materie prime impiegate, sono strettamente correlate al metabolismo dei lieviti coinvolti nel processo di fermentazione (Castro *et al.*, 2020). Usualmente i lieviti appartenenti alla specie *S. cerevisiae* vengono utilizzati nella produzione di birre Ale, mentre nella produzione di birre Lager vengono utilizzati lieviti ibridi interspecifici appartenenti alla specie *S. pastorianus* (Iorizzo *et al.*, 2021). Negli ultimi anni, soprattutto alla luce della cosiddetta “*craft beer revolution*”, si sta assistendo ad un crescente interesse per l’individuazione di nuovi ceppi da impiegare come starter fermentativi nella produzione di birre artigianali allo scopo di ottenerne una maggiore diversificazione, mantenendo standard qualitativi elevati. Allo scopo, sono state adottate nuove strategie e delineate nuove linee di ricerca per aumentare la disponibilità di starter da impiegare nella produzione di birra Lager, compresa la creazione in laboratorio di nuovi ceppi di lievito ottenuti per ibridazione interspecifica. I microbiomi degli ambienti terrestri costituiscono fonti di biodiversità vaste, poco esplorate e non appieno valorizzate. In tale ottica, l’enorme biodiversità del microbioma del vigneto può rappresentare una fonte interessante per il reperimento di lieviti in possesso di peculiari caratteristiche fisiologiche idonee ad una loro applicazione non soltanto nel settore enologico ma anche nel settore birrario. Utilizzando un mosto di birra modello è stata valutata l’attitudine del ceppo criotollerante *S. cerevisiae* 41CM,

isolato da vigneto (Iorizzo *et al.*, 2021), ad essere usato come starter nella produzione di birra Lager.

### Materiali e metodi

Come starter fermentativi sono stati utilizzati il ceppo *S. cerevisiae* 41CM (accession number to GenBank OM037660), appartenente alla collezione del Di.A.A.A (Dipartimento Agricoltura Ambiente e Alimenti dell'Università degli Studi del Molise) e il lievito Lager commerciale *S. pastorianus* W-34/70 (Fachhochschule Weihenstephan, Freising, Germany). I lieviti sono stati coltivati in YPD broth (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a 18°C e dopo 16 ore le cellule ottenute per centrifugazione sono state inoculate nel mosto, in modo da avere una concentrazione iniziale di 10<sup>6</sup> UFC/mL. I test fermentativi sono stati effettuati a 12 °C utilizzando un mosto di birra modello (Tab. 1). Le cinetiche fermentative sono state valutate monitorando la concentrazione degli zuccheri (maltosio e glucosio) durante il corso della fermentazione alcolica (14 giorni). Sul fermentato finale sono state eseguite le analisi chimiche utilizzando le metodiche ufficiali descritte dall'*Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005).

### Risultati e discussione

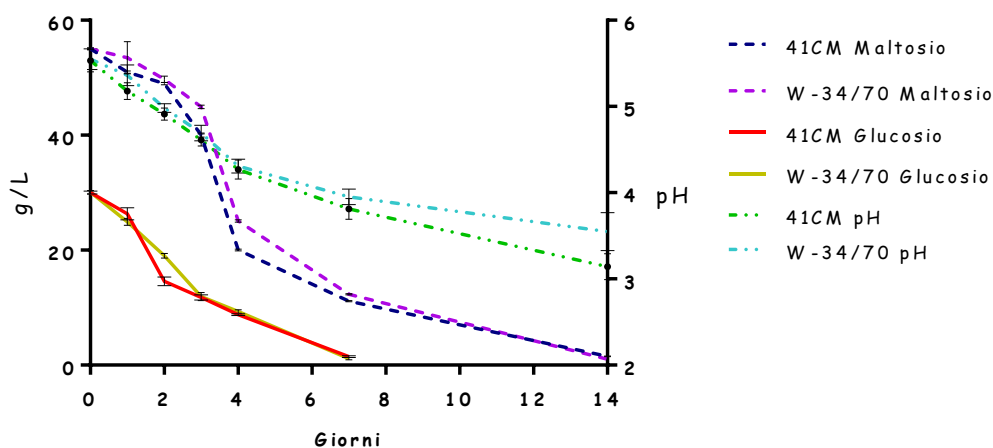
Le cinetiche di fermentazione e i risultati delle analisi chimiche del fermentato finale sono riportate rispettivamente in Figura 1 e nella Tabella 2. Il lievito *S. cerevisiae* 41CM ha avuto un comportamento simile al ceppo commerciale *S. pastorianus* W-34/70, sia nelle cinetiche fermentative che nella definizione delle caratteristiche chimiche del fermentato finale. I risultati hanno evidenziato la potenzialità del ceppo *S. cerevisiae* 41CM ad essere usato come starter nella produzione di birra Lager. Sono in corso ulteriori test per la produzione di birra Lager su scala pilota, utilizzando un mosto di birra naturale ed impiegando questo lievito come starter, allo scopo di valutare le caratteristiche compositive ed organolettiche del prodotto finale.

**Tabella 1.** Composizione chimica del mosto di birra modello

Mosto di birra modello	
Estratto di malto (g/L)	70.0
Glucosio (g/L)	30.0
Peptone (g/L)	1.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	1.14
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (g/L)	1.23
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (g/L)	0.44
Tiamina HCl (mg/L)	0.5
ZnCl <sub>2</sub> (µg/L)	135.0
pH	5.5

**Tabella 2.** Parametri chimici del fermentato finale. I valori numerici sono espressi come  $\pm$  SD (n = 3); lettere differenti (a, b) in ogni riga indicano differenze significative  $p < 0.05$ .

Parametri chimici	<i>S. cerevisiae</i> 41CM	<i>S. pastorianus</i> W-34/70
Acetaldeide (mg/L)	8.2 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	7.8 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
Acido acetico (mg/L)	8.1 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	7.7 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>
Acido citrico (mg/L)	12.2 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	11.0 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>
Acido L-malico (mg/L)	10.6 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	9.9 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>
Acido L-lattico (mg/L)	49.5 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>	52.4 $\pm$ 4.7 <sup>a</sup>
Acido succinico (mg/L)	126.0 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>	112.0 $\pm$ 4.0 <sup>b</sup>
Alcol (% vol)	4.3 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	4.2 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
Diacetile ( $\mu$ g/L)	293.7 $\pm$ 11.9 <sup>a</sup>	288.7 $\pm$ 4.4 <sup>a</sup>
Glicerolo (g/L)	1.7 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	1.7 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
pH	3.1 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	3.6 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
SO <sub>2</sub> totale (mg/L)	7.0 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	8.6 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>



**Figura 1.** Cinetiche fermentative a 12 °C dei lieviti *S. cerevisiae* 41CM e *S. pastorianus* W-34/70. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard della media (n = 3).

## **Bibliografia**

- Castro R., Díaz A.B., Durán-Guerrero E., Lasanta C. 2022. Influence of Different Fermentation Conditions on the Analytical and Sensory Properties of Craft Beers: Hopping, Fermentation Temperature and Yeast Strain. *Journal of Food Composition and Analysis*, 106: 104278.
- Iorizzo M., Coppola F., Letizia F., Testa B., Sorrentino E. 2021. Role of Yeasts in the Brewing Process: Tradition and Innovation. *Processes*, 9: 839.
- Iorizzo M., Letizia F., Albanese G., Coppola F., Gambuti A., Testa B., Aversano R., Forino M., Coppola R. 2021. Potential for Lager Beer Production from *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from the Vineyard Environment. *Processes*, 9: 1628.
- Delwiche S. 2003. Official Method 920.86. Off. Methods Anal. AOAC Int., 5: 20001310621.
- AOAC 2005. *Official methods of analysis*, 18th ed. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists 684, (<https://www.aoac.org/official-methods-of-analysis-21st-edition-2019>).

## **Pani di frumento duro funzionalizzati mediante aggiunta di sfarinati di carciofo ottenuti da scarti di lavorazione**

M. Canale<sup>1\*</sup>, R. Palmeri<sup>2</sup>, F. Pesce<sup>2</sup>, A. Todaro<sup>3</sup>, M. Amenta<sup>4</sup>, M.C. Strano<sup>4</sup>, M. Bizzini<sup>5</sup>, M. Allegra<sup>4</sup>, A. Spina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di Ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali (CREA-CI), Corso Savoia 190, 95024 Acireale (CT).

<sup>2</sup>Di3A Università degli Studi di Catania, Via S. Sofia 100, 95123 Catania (CT).

<sup>3</sup>Dipartimento S.A.A.F. Università degli Studi di Palermo, Viale delle Scienze ed. 4, 90128 Palermo (PA).

<sup>4</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura (CREA-OFA), Corso Savoia 190, 95024 Acireale (CT).

<sup>5</sup>Stazione Consorziale Sperimentale di Granicoltura per la Sicilia, Via Sirio 1, 95041 Santo Pietro Fraz. di Caltagirone (CT).

\*E-mail: [michele.canale@crea.gov.it](mailto:michele.canale@crea.gov.it)

### **Abstract**

The importance of the Mediterranean diet in the prevention of some diseases, and in part as a support to therapies related to metabolic diseases such as type 2 diabetes, triglyceridemia and cholesterolemia, combined with the greater sensitivity of the consumer towards high quality foods and linked to environmental sustainability and enhancement of the products of the territory, are the assumptions from which this study originates.

In the bread under study, flours produced from artichoke processing waste such as stems and bracts were used. The flours were characterized from a technological point of view. The re-milled durum wheat semolina was subjected to different percentages of integration (5%, 7.5%, 10%) of artichoke flour, then assessments were carried out on the physico-chemical and rheological characteristics of the mix of flours and doughs, and carried out technological tests (baking test, firmness) on the loaves. All technological determinations were carried out in accordance with official methods, AACC, UNI, AOAC standards. The results obtained showed loaves of good appearance, volume and height, which suggest their future use in artisanal and industrial bakery.

### **Riassunto**

L'importanza della dieta mediterranea nella prevenzione di alcune malattie, ed in parte come supporto alle terapie legate alle patologie metaboliche quali diabete di tipo 2, trigliceridemia e colesterolemia, unite alla maggiore sensibilità del consumatore verso alimenti di elevata qualità e ai temi legati alla sostenibilità ambientale e valorizzazione dei prodotti del territorio, sono i presupposti da cui ha avuto inizio questo studio.

Nella produzione dei pani oggetto di studio, sono state utilizzate farine ottenute dalla macinazione di scarti di lavorazione del carciofo quali, brattee e parte terminale dei fusti. Le farine sono state caratterizzate dal punto di vista tecnologico. Alla semola rimacinata di frumento duro sono state effettuate tre diverse percentuali d'integrazione (5%, 7,5%, 10%) di farina di carciofo; quindi, sono state condotte delle analisi chimico-fisiche e reologiche sui mix di sfarinati, sugli impasti, mentre sulle pagnotte sono state eseguite prove tecnologiche (*baking test*, *firmness*) in accordo ai metodi ufficiali, AACC, norme UNI, AOAC. I risultati ottenuti



hanno mostrato dei pani di buon aspetto, volume e altezza, che ne suggeriscono un futuro impiego sia in panificazione artigianale sia industriale.

### **Introduzione**

L'importanza della dieta mediterranea nella prevenzione di alcune malattie, ed in parte come supporto alle terapie legate alle patologie metaboliche quali diabete di tipo 2, trigliceridemia e colesterolemia, unite alla maggiore sensibilità del consumatore verso i temi legati alla sostenibilità ambientale e valorizzazione dei prodotti del territorio, sono i principali argomenti di interesse che hanno dato il via a questo studio. Da un paio d'anni, si assiste ad un mutevole atteggiamento culturale e sociale da parte dei consumatori, i quali mostrano una maggiore sensibilità alle tematiche riguardanti sostenibilità, salvaguardia ambientale e centralità del cibo, inteso come funzionale, per il miglioramento del proprio stile di vita e condizione di salute (Canale, 2021).

Scopo di questo lavoro è stato quello di sviluppare prodotti da forno, in particolare pani di grano duro addizionati con farine ottenute da scarti di lavorazione del carciofo ad elevato contenuto in fibra e in composti bioattivi, capaci di indurre una risposta glicemica post-prandiale e, inoltre, rispondere anche ai temi di sostenibilità e di basso impatto ambientale.

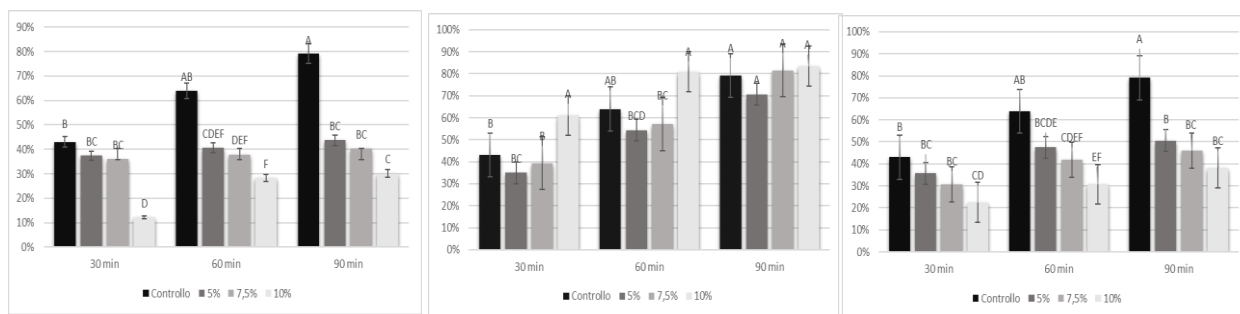
### **Materiali e metodi**

Partendo da semola rimacinata di qualità, ottenuta dalla macinazione del grano duro prodotto dai soci della Cooperativa Agricola a r.l. "Valle del Dittaino" di Assoro (EN), impiegata nella produzione del pane "DOP Pagnotta del Dittaino" sono state aggiunte delle differenti percentuali d'integrazione (5%, 7,5%, 10%) di farina di brattee, di gambi (parte terminale dei fusti) e del loro mix (50-50). Sono stati utilizzati gli scarti di lavorazione del carciofo (*Cynara cardunculus* subsp. *scolymus* (L.) Hayek), cv. "Violetto ramacchese", importante coltura industriale siciliana, diffusa soprattutto nella Piana di Catania. I capolini, lavorati secondo metodo industriale, con eliminazione delle brattee esterne e dei gambi, sono stati essiccati in stufa ventilata a 40°C e poi trasformati in farina mediante frullatore da banco e, successivamente resi in farina, mediante molinetto Cyclotec. Sui mix di sfarinati e impasti opportunamente approntati, sono state condotte delle valutazioni biologiche, chimico-fisiche e reologiche e sul pane, sono state eseguite prove tecnologiche, secondo metodologie ufficiali AACC, norme UNI e AOAC.

### **Risultati e discussione**

La prova di lievitazione degli impasti in cilindri mostra che, ad un aumento dei quantitativi di farina di brattee diminuisce la capacità di lievitazione, mentre aumenta nel caso dell'aggiunta di farina di gambi (Fig. 1).

In particolare, i risultati ottenuti dalla prova di lievitazione mostrano dei dati diversi per le due tipologie di farine di carciofo addizionate. L'aggiunta del mix gambi-brattee (50-50) mostra un andamento simile a quello con aggiunta di farina di brattee, ma una maggiore capacità fermentativa rispetto alle sole brattee (Fig. 1).



**Figura 1.** Prove di lievitazione a diverse percentuali di aggiunte di farina di brattee (sx), gambi (centro) e del mix gambi-brattee (dx) (dati presentati come media  $\pm$  deviazione standard). Differenti lettere indicano una differenza significativa ( $p \leq 0,001$ ), secondo l'ANOVA, seguita dal test di Tukey.

Per quanto riguarda i parametri farinografici, all'aumentare della percentuale di integrazione, il tempo di sviluppo dell'impasto aumenta con tutte e tre le tipologie di sfarinati di carciofo. Riguardo la stabilit  farinografica, invece, per tutte e tre le tipologie di sfarinati di carciofo, tende ad aumentare maggiormente con le percentuali di integrazione pi  basse. Il grado di rammollimento dell'impasto, essendo correlato negativamente con la stabilit , ha un andamento opposto a quello registrato per quest'ultimo parametro. Relativamente all'assorbimento idrico al farinografo (Tab. 1), rispetto al controllo, si   osservato un incremento in tutte le tesi; nel caso specifico dei gambi l'assorbimento idrico   maggiore e supera il 70% col 10% di integrazione con farina di gambi.

Per quanto concerne i parametri alveografici, la forza dell'impasto (W), all'aumentare dell'integrazione di sfarinati di carciofo, tende a diminuire per tutte le tesi. Invece, comportamento opposto   stato osservato per il rapporto P/L, il quale, per tutte e tre le tipologie di sfarinati di carciofo, tende ad aumentare significativamente all'aumentare dell'aggiunta di farine di carciofo.

Questi risultati reologici fanno presagire l'ottenimento di pani con volume e altezza pi  ridotti, pagnotte pi  tenaci e con mollica pi  compatta.

**Tabella 1.** Parametri farinografici e alveografici a diverse percentuali di integrazione di farina di brattee, gambi e del mix gambi-brattee (dati presentati come media  $\pm$  deviazione standard).

CAMPIONE	FARINOGRAMMA				ALVEOGRAMMA		
	Sviluppo (min)	Stabilit� (min)	Grado di rammollimento ICC (U.B.)	Assorb. Idrico a 500 U.B.	W $\times 10^{-4}$	J	P/L
<b>CONTROLLO 100% SEMOLA</b>	1,8 $\pm$ 0,14h	3,2 $\pm$ 0,00ef	55 $\pm$ 0,00d	61,7 $\pm$ 0,07e	225,50 $\pm$ 3,54a	2,40 $\pm$ 0,03e	
<b>SEMOLA + 5% BRATTEE</b>	2 $\pm$ 0,07gh	18,4 $\pm$ 0,00a	14 $\pm$ 0,49f	65,1 $\pm$ 0,07d	170,00 $\pm$ 6,08b	6,88 $\pm$ 0,43cde	
<b>SEMOLA+7,5% BRATTEE</b>	2,5 $\pm$ 0,14fg	4,6 $\pm$ 0,07e	67 $\pm$ 0,07cd	65 $\pm$ 0,07d	101,00 $\pm$ 9,07cde	10,87 $\pm$ 0,85abc	
<b>SEMOLA+10% BRATTEE</b>	2,8 $\pm$ 0,07f	1,9 $\pm$ 0,07f	141 $\pm$ 0,07a	64,6 $\pm$ 0,07d	75,00 $\pm$ 6,43de	15,20 $\pm$ 0,30a	
<b>SEMOLA +5% GAMB</b>	5,6 $\pm$ 0,07e	7,2 $\pm$ 0,07cd	76 $\pm$ 0,14bc	66,1 $\pm$ 0,07c	129,00 $\pm$ 20,40bc	7,00 $\pm$ 1,26cde	
<b>SEMOLA+7,5% GAMB</b>	6 $\pm$ 0,14cd	5,9 $\pm$ 0,07d	86 $\pm$ 0,07b	68,8 $\pm$ 0,00b	103,00 $\pm$ 18,93cde	9,45 $\pm$ 2,38bcd	
<b>SEMOLA + 10% GAMB</b>	7,3 $\pm$ 0,07b	6,1 $\pm$ 0,14d	83 $\pm$ 0,07bc	70,2 $\pm$ 0,14a	78,00 $\pm$ 7,77de	14,37 $\pm$ 1,42a	
<b>SEMOLA + 5% MIX</b>	5,9 $\pm$ 0,00de	7,7 $\pm$ 0,07c	66 $\pm$ 0,14cd	66,4 $\pm$ 0,07c	115,00 $\pm$ 7,94cd	4,76 $\pm$ 1,04de	
<b>SEMOLA + 7,5% MIX</b>	6,5 $\pm$ 0,07c	15,1 $\pm$ 0,00b	33 $\pm$ 0,21e	68,6 $\pm$ 0,07b	105,00 $\pm$ 5,29cde	5,83 $\pm$ 0,33de	
<b>SEMOLA + 10% MIX</b>	3,9 $\pm$ 0,14ef	3,7 $\pm$ 0,07ef	109 $\pm$ 0,14ab	71,2 $\pm$ 0,14a	61,00 $\pm$ 4,36e	12,37 $\pm$ 0,57ab	

Differenti lettere indicano una differenza significativa ( $p \leq 0,001$ ), secondo l'ANOVA, seguita dal test di Tukey.

Riguardo i risultati del baking test, nel caso dei pani arricchiti sia con farina di brattee sia con farina di gambi, all'aumentare delle percentuali di integrazione si osserva una riduzione del volume specifico e dell'altezza dei pani (Tab. 2). Per quanto riguarda il pane arricchito con il mix gambi-brattee, si è registrato un comportamento opposto a quello mostrato dall'aggiunta di farina di sole brattee o di soli gambi. I dati ottenuti, pur con una diminuzione di volume e altezza delle pagnotte, mostrano un interessante potenziale tecnologico che il mix delle due farine di carciofo conferisce ai pani, grazie agli elevati valori di assorbimento idrico, migliorano sia i parametri strutturali che la resa in pane.

**Tabella 2.** Caratteristiche fisiche dei pani a diverse percentuali di integrazione con sfarinati di carciofo (dati presentati come media  $\pm$  deviazione standard).

Campione	Volume specifico (cm <sup>3</sup> /g)	Altezza (mm)	Firmness esterna (N)	Porosità (1-8)*	Struttura interna (1-2)**
Controllo (100% Semola)	3,05 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	81,95 $\pm$ 1,20 <sup>a</sup>	12,11 $\pm$ 0,64 <sup>b</sup>	5	1
Semola + 5% F. Brattee	1,78 $\pm$ 0,03 <sup>d</sup>	61,20 $\pm$ 2,83 <sup>bcd</sup>	16,88 $\pm$ 0,94 <sup>ab</sup>	7	1
Semola + 7,5% F. Brattee	1,52 $\pm$ 0,02 <sup>e</sup>	54,35 $\pm$ 1,20 <sup>cde</sup>	16,77 $\pm$ 0,54 <sup>ab</sup>	7,5	1
Semola + 10% F. Brattee	1,37 $\pm$ 0,01 <sup>e</sup>	47,60 $\pm$ 2,26 <sup>e</sup>	21,38 $\pm$ 0,43 <sup>a</sup>	8	1
Semola + 5% F. Gambi	2,40 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	69,10 $\pm$ 1,13 <sup>b</sup>	12,20 $\pm$ 1,15 <sup>b</sup>	6	1
Semola + 7,5% F. Gambi	2,05 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>	63,15 $\pm$ 1,34 <sup>bc</sup>	13,14 $\pm$ 1,83 <sup>ab</sup>	6	1
Semola + 10% F. Gambi	1,85 $\pm$ 0,02 <sup>d</sup>	57,35 $\pm$ 0,35 <sup>cde</sup>	11,91 $\pm$ 1,38 <sup>b</sup>	6,5	1
Semola + 5% Mix	1,96 $\pm$ 0,01 <sup>cd</sup>	59,90 $\pm$ 0,00 <sup>cd</sup>	11,80 $\pm$ 2,18 <sup>b</sup>	6,5	1
Semola + 7,5% Mix	1,79 $\pm$ 0,01 <sup>d</sup>	54,35 $\pm$ 0,49 <sup>cde</sup>	11,42 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	7	1
Semola + 10% Mix	1,55 $\pm$ 0,02 <sup>e</sup>	52,00 $\pm$ 0,71 <sup>de</sup>	13,25 $\pm$ 0,99 <sup>ab</sup>	7,5	1

\* Porosità 1 = Molto poroso; 8= Poco poroso.

\*\* Struttura interna 1= regolare; 2= irregolare.

Differenti lettere indicano una differenza significativa ( $p \leq 0,001$ ), secondo l'ANOVA, seguita dal test di Tukey.

Per quanto concerne i parametri colorimetrici di crosta e mollica (Tab. 3), per tutti e tre le tipologie di sfarinati di carciofo alle diverse integrazioni, la crosta dei pani è apparsa leggermente meno bruna rispetto al controllo, mentre la mollica assume una colorazione decisamente bruna, tendente leggermente al rossastro. In pratica, il colore interno ed esterno dei pani addizionati con le tre farine di carciofo, a diverse percentuali di integrazione, ricorda quello del pane integrale.

**Tabella 3.** Parametri colorimetrici di crosta e mollica dei pani a diverse concentrazioni di farina di brattee, gambi e del mix gambi-brattee (dati presentati come media  $\pm$  deviazione standard).

Campione	Crosta			Mollica		
	Indice di bruno (100-L)	Indice di rosso (a*)	Indice di giallo (b*)	Indice di bruno (100-L)	Indice di rosso (a*)	Indice di giallo (b*)
Controllo (100% semola)	62,54 $\pm$ 1,10 <sup>a</sup>	12,85 $\pm$ 1,27 <sup>a</sup>	17,82 $\pm$ 4,11 <sup>c</sup>	23,78 $\pm$ 2,14 <sup>d</sup>	-2,92 $\pm$ 0,28 <sup>e</sup>	19,34 $\pm$ 2,04 <sup>c</sup>
Semola + 5% F. Brattee	56,95 $\pm$ 0,18 <sup>ab</sup>	11,94 $\pm$ 0,23 <sup>ab</sup>	21,06 $\pm$ 0,24 <sup>abc</sup>	49,57 $\pm$ 1,77 <sup>bc</sup>	1,06 $\pm$ 0,05 <sup>d</sup>	19,63 $\pm$ 0,28 <sup>abc</sup>
Semola + 7,5% F. Brattee	53,93 $\pm$ 0,32 <sup>b</sup>	10,63 $\pm$ 0,04 <sup>ab</sup>	22,77 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup>	53,68 $\pm$ 0,11 <sup>abc</sup>	1,63 $\pm$ 0,11 <sup>cd</sup>	19,55 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
Semola + 10% F. Brattee	56,27 $\pm$ 0,59 <sup>ab</sup>	10,25 $\pm$ 0,67 <sup>ab</sup>	22,08 $\pm$ 0,45 <sup>ab</sup>	55,04 $\pm$ 0,53 <sup>ab</sup>	2,19 $\pm$ 0,21 <sup>bc</sup>	19,33 $\pm$ 0,04 <sup>ab</sup>
Semola + 5% F. Gambi	62,17 $\pm$ 2,47 <sup>ab</sup>	11,71 $\pm$ 0,88 <sup>ab</sup>	17,46 $\pm$ 2,07 <sup>c</sup>	45,72 $\pm$ 0,89 <sup>c</sup>	2,17 $\pm$ 0,02 <sup>bc</sup>	20,51 $\pm$ 0,33 <sup>c</sup>
Semola + 7,5% F. Gambi	58,39 $\pm$ 1,59 <sup>ab</sup>	10,11 $\pm$ 0,09 <sup>ab</sup>	18,68 $\pm$ 1,32 <sup>bc</sup>	53,60 $\pm$ 0,29 <sup>abc</sup>	3,24 $\pm$ 0,15 <sup>ab</sup>	20,35 $\pm$ 0,04 <sup>bc</sup>
Semola + 10% F. Gambi	57,18 $\pm$ 1,03 <sup>ab</sup>	9,89 $\pm$ 0,33 <sup>ab</sup>	20,70 $\pm$ 0,38 <sup>abc</sup>	57,22 $\pm$ 0,78 <sup>ab</sup>	3,75 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	19,56 $\pm$ 0,62 <sup>abc</sup>
Semola + 5% Mix	55,30 $\pm$ 1,81 <sup>ab</sup>	11,80 $\pm$ 0,43 <sup>ab</sup>	22,92 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	50,04 $\pm$ 0,18 <sup>abc</sup>	1,66 $\pm$ 0,17 <sup>cd</sup>	19,90 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>
Semola + 7,5% Mix	57,64 $\pm$ 0,23 <sup>ab</sup>	11,13 $\pm$ 0,01 <sup>ab</sup>	20,69 $\pm$ 0,91 <sup>abc</sup>	51,53 $\pm$ 1,68 <sup>abc</sup>	2,49 $\pm$ 0,17 <sup>bc</sup>	20,79 $\pm$ 0,42 <sup>abc</sup>
Semola + 10% Mix	60,72 $\pm$ 0,85 <sup>ab</sup>	9,02 $\pm$ 1,05 <sup>b</sup>	18,69 $\pm$ 0,18 <sup>bc</sup>	58,75 $\pm$ 1,83 <sup>a</sup>	3,15 $\pm$ 0,07 <sup>ab</sup>	19,42 $\pm$ 0,47 <sup>bc</sup>

Differenti lettere indicano una differenza significativa ( $p \leq 0,001$ ;  $\leq 0,01$  per a\* crosta;  $\leq 0,05$  per b\* crosta), secondo l'ANOVA, seguita dal test di Tukey.

L'importanza del riutilizzo degli scarti di lavorazione del carciofo e del relativo basso impatto ambientale ed economico, unito ad un potenziale effetto funzionale conferito dal carciofo, grazie alla ricchezza in fibre insolubili e solubili, e fra quest'ultime, l'inulina, carboidrato capace di contrastare l'aumento glicemico post-prandiale, risulterebbero fra gli scarti agroalimentari che maggiormente dovrebbero essere utilizzati ed attenzionati per la produzione di prodotti da forno per soggetti con valori di glucosio ematico *border line* e/o per diabetici di tipo 2 (Lattanzio *et al.*, 2009; Shoaib *et al.*, 2016). Inoltre, questo utilizzo rappresenterebbe anche un potenziale indice economico per le aziende, le quali potrebbero valorizzare adeguatamente uno scarto, trasformandolo in sottoprodotto e poi in materia prima ad alto valore economico. I risultati ottenuti ne incoraggiano un futuro impiego sia in panificazione artigianale sia industriale. Ulteriori studi si rendono necessari in futuro per confermare e approfondire i risultati di questo studio.

### **Bibliografia**

- Canale M. 2021. Impiego di sottoprodotti della lavorazione del carciofo (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) per la produzione di prodotti da forno *gluten free* ad elevato potere funzionale. Tesi di laurea magistrale in Scienze e Tecnologie Alimentari. Di3A, Università di Catania. Relatrice Prof.ssa Rosa Palmeri.
- Lattanzio V., Kroon P. A., Linsalata V., Cardinali A. 2009. Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. *Journal of Functional Foods*, 1(2), 131-144.
- Shoaib M., Shehzad A., Omar M., Rakha A., Raza H., Sharif H. R., Niazi, S. 2016. Inulin: Properties, health benefits and food applications. *Carbohydrate Polymers*, 147: 444-454.

## **Sviluppo di pani di frumento duro ad elevata valenza salutistica a base di farina e concentrato proteico di lupino bianco**

M. Canale<sup>1\*</sup>, V. Giannone<sup>2</sup>, A. Todaro<sup>2</sup>, M.C. Strano<sup>3</sup>, A. Pasqualone<sup>4</sup>, M. Allegra<sup>3</sup>, M. Bizzini<sup>5</sup>  
E. Li Puma<sup>1</sup>, A. Spina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali (CREA-CI), Corso Savoia, 190, 95024 Acireale (CT).

<sup>2</sup>S.A.A.F. Università degli Studi di Palermo, Viale delle Scienze ed. 4, 90128 Palermo (PA).

<sup>3</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura (CREA-OFA), Corso Savoia 190, 95024 Acireale (CT).

<sup>4</sup>Di.S.S.P.A. Università degli studi di Bari, Via G. Amendola, 165/a, 70126 Bari (BA).

<sup>5</sup> Stazione Consorziale Sperimentale di Granicoltura per la Sicilia, Via Sirio 1, 95041 Santo Pietro Fraz. di Caltagirone (CT).

\*E-mail: [michele.canale@crea.gov.it](mailto:michele.canale@crea.gov.it)

### **Abstract**

The use of pulse flours in addition to flours and semolina, for the production of bakery products, is growing rapidly, thanks to the ability to confer important health benefits.

In the following study, starting from re-milled durum wheat semolina, integration percentage differences (3%, 7%, 10%, 15%) of flour of white lupin (*Lupinus albus* L.) and protein concentrate of narrow-leaf lupin (*Lupinus angustifolius* L.) were added, then carried out assessments on the physico-chemical and rheological characteristics of mixes of flours and doughs, and the execution of technological tests on bread (*baking test, firmness*), following the official AACC methodologies, UNI, AOAC standards.

From the results obtained, it was found that the high intake of proteins and fibers, ensured by the addition of lupin flours, improves the technological characteristics and the bread obtained. The high content of proteins and fibers and the natural absence of gluten in the flours obtained from lupin, suggest a future use in breadmaking, as well as for the production of other baked goods, especially for particular categories of consumers (sportsmen, vegetarians, vegans, people with gluten sensitivity, etc.), who could have a significant protein intake to achieve their daily protein requirement.

### **Riassunto**

L'impiego di farine di legumi, in aggiunta alle farine e semole, per la produzione di prodotti da forno, è in forte crescita, grazie alla capacità di conferire importanti benefici salutistici.

Nel presente studio, partendo da semola rimacinata di frumento duro sono state aggiunte delle differenti percentuali d'integrazione (3%, 7%, 10%, 15%) di farina di lupino bianco (*Lupinus albus* L.) e concentrato proteico di lupino azzurro (*Lupinus angustifolius* L.), quindi condotte delle valutazioni sulle caratteristiche chimico-fisiche, reologiche su mix di sfarinati e impasti, ed eseguite sul pane prove tecnologiche (*baking test, firmness*), seguendo le metodologie ufficiali AACC, norme UNI, AOAC.

Dai risultati ottenuti si è riscontrato che l'elevato apporto in proteine e fibre, assicurato dall'aggiunta di sfarinati di lupino, ha permesso un miglioramento delle caratteristiche tecnologiche e strutturali dei pani ottenuti.

L'elevato contenuto in proteine e fibre e la naturale assenza in glutine degli sfarinati ottenuti dal lupino, ne suggeriscono un futuro impiego in panificazione, oltre che per la produzione di altri prodotti da forno, soprattutto per categorie particolari di consumatori (sportivi, vegetariani, vegani, persone affette da *gluten sensitivity*, ecc.), i quali potrebbero avere un significativo apporto in proteine per il raggiungimento del loro fabbisogno proteico giornaliero.

## Introduzione

Negli ultimi anni si è diffuso l'impiego di sfarinati di legumi da soli o in miscela a sfarinati di frumenti nella produzione di pasta, biscotti, sostituti del pane ecc. (Ranalli *et al.*, 2018; Spina, 2020). Fra i legumi, il lupino è uno dei più interessanti in quanto, oltre all'elevato contenuto in fibre alimentari e proteine (Spina *et al.*, 2010), presenta un basso impatto glicemico, in quanto apporta pochissimo amido e, inoltre, contiene la  $\gamma$ -conglutina, una particolare glicoproteina insulino-mimetica (Spina, 2020). Inoltre, esso presenta un basso contenuto in altri principi antinutrizionali, tranne che per gli alcaloidi quinolizidinici ma, grazie alla recente selezione di varietà a bassissimo contenuto in alcaloidi, il lupino rappresenta un ottimo *food ingredient*. (Spina e Roccasalva, 2017).

## Materiali e metodi

Partendo da semola rimacinata di qualità impiegata nella produzione del pane "DOP Pagnotta del Dittaino", ottenuta dalla macinazione del grano duro prodotto dai soci della Cooperativa Agricola a r.l. "Valle del Dittaino" di Assoro (EN), sono state aggiunte delle differenti percentuali d'integrazione (3%, 7%, 10%, 15%) di farina commerciale di lupino bianco (*Lupinus albus*) (FL, proteine 40%) e di concentrato proteico di lupino azzurro (*L. angustifolius*) (CPL, proteine 55,5%). Sui mix di sfarinati e impasti sono state condotte delle valutazioni chimico-fisiche e reologiche e sul pane, eseguite prove tecnologiche, secondo metodologie ufficiali AACC, norme UNI, AOAC.

## Risultati e discussione

I risultati delle prove farinografiche mostrano che all'aumentare della percentuale di farina o concentrato proteico di lupino aumenta la percentuale di assorbimento idrico, con valori di assorbimento di acqua simili alla semola di controllo per gli impasti con CPL, alle diverse percentuali d'integrazione. Invece, gli impasti con FL hanno evidenziato degli assorbimenti idrici maggiori, specialmente alle percentuali più elevate (Tab. 1).

**Tabella 1.** Parametri farinografici e alveografici a diverse percentuali di integrazione di farina di brattee, gambi e del mix gambi-brattee (dati presentati come media  $\pm$  deviazione standard).

CAMPIONE	FARINOGRAMMA			ALVEOGRAMMA		
	Sviluppo (min)	Stabilità (min)	Grado di rammollimento ICC (U.B.)	Ass. Idrico a 500 U.B. (%)	W (J x 10 <sup>-4</sup> )	P/L
<b>CONTROLLO (100% SEMOLA)</b>	1,34 $\pm$ 4,24e	5,27 $\pm$ 4,24b	44,5 $\pm$ 0,71	62,25 $\pm$ 0,35e	225,50 $\pm$ 3,53a	2,40 $\pm$ 0,03bc
<b>CPL 3%</b>	1,70 $\pm$ 0,00b	6,35 $\pm$ 0,00a	60,50 $\pm$ 7,78d	62,05 $\pm$ 0,07e	147,50 $\pm$ 0,71b	2,89 $\pm$ 0,56abc
<b>CPL 7%</b>	1,50 $\pm$ 0,00d	2,65 $\pm$ 0,00d	82,50 $\pm$ 2,12c	63,75 $\pm$ 1,20d	127,00 $\pm$ 2,82c	2,27 $\pm$ 0,15bc
<b>CPL 10%</b>	1,60 $\pm$ 0,00c	3,80 $\pm$ 0,00c	78,00 $\pm$ 7,07cd	63,90 $\pm$ 0,07d	122,50 $\pm$ 0,71cd	2,49 $\pm$ 0,78abc
<b>CPL 15%</b>	3,10 $\pm$ 0,00a	1,75 $\pm$ 0,00e	119,50 $\pm$ 6,36a	64,05 $\pm$ 0,14d	108,50 $\pm$ 3,53de	3,49 $\pm$ 0,08ab
<b>FL 3%</b>	1,60 $\pm$ 0,00c	5,15 $\pm$ 0,00b	61,50 $\pm$ 2,12d	65,45 $\pm$ 0,00c	114,00 $\pm$ 0,00cd	1,77 $\pm$ 0,06c
<b>FL 7%</b>	1,70 $\pm$ 0,00b	4,90 $\pm$ 0,00b	54,00 $\pm$ 2,83e	66,25 $\pm$ 0,14b	96,50 $\pm$ 3,53ef	1,81 $\pm$ 0,13c
<b>FL 10%</b>	1,60 $\pm$ 0,00c	4,80 $\pm$ 0,00b	59,50 $\pm$ 2,12e	66,70 $\pm$ 0,07b	82,00 $\pm$ 1,41fg	2,06 $\pm$ 0,03bc
<b>FL 15%</b>	1,50 $\pm$ 0,00d	1,90 $\pm$ 0,00e	107,50 $\pm$ 3,54ab	69,05 $\pm$ 1,06a	76,00 $\pm$ 1,41g	3,94 $\pm$ 0,06a

Differenti lettere indicano una differenza significativa ( $p \leq 0,001$ ), secondo l'ANOVA, seguita dal test di Tukey.

Per quanto riguarda le proprietà alveografiche (Tab. 1), la forza dell'impasto (W) tende a diminuire per tutte le tesi, all'aumentare dell'integrazione di farina o concentrato proteico di lupino. Invece, per quanto riguarda il rapporto P/L, si registrano due comportamenti diversi. L'aggiunta di concentrato proteico provoca un aumento del suddetto rapporto, a differenza dell'aggiunta di farina di lupino, la quale presenta valori che, seppur più bassi, non differiscono statisticamente dal controllo, ma tendono ad essere più elevati nell'integrazione al 15%. All'aumentare dell'integrazione di farina o concentrato proteico i comportamenti reologici suggeriscono man mano la presenza di impasti più deboli e poco estensibili. I risultati ottenuti dalla prova di baking test con integrazione di sfarinati di lupino hanno mostrato, seppur una diminuzione del volume specifico rispetto al controllo (Tab. 2), un significativo incremento del peso specifico e, quindi, della resa in pane. Riguardo la consistenza esterna dei pani, invece, non sono state registrate differenze significative sia fra le diverse tesi sia rispetto al controllo.

**Tabella 2.** Caratteristiche fisiche dei pani a diverse percentuali di integrazione con sfarinati di lupino (dati presentati come media  $\pm$  deviazione standard).

Campione	Volume specifico (cm <sup>3</sup> /g)	Peso specifico (g/cm <sup>3</sup> )	Firmness esterna (N)	Porosità (1-8)*	Struttura Interna (1-2)**
Controllo (100% semola)	2,85 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,35 $\pm$ 0,07 <sup>f</sup>	16,90 $\pm$ 0,18 <sup>ac</sup>	5	1
CPL 3%	2,16 $\pm$ 0,01 <sup>df</sup>	0,46 $\pm$ 0,07 <sup>ac</sup>	21,30 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>	6	1
CPL 7%	2,24 $\pm$ 0,07 <sup>cf</sup>	0,45 $\pm$ 0,07 <sup>bd</sup>	16,70 $\pm$ 0,02 <sup>ac</sup>	6	2
CPL 10%	2,19 $\pm$ 0,03 <sup>df</sup>	0,46 $\pm$ 0,05 <sup>ad</sup>	18,50 $\pm$ 0,19 <sup>ab</sup>	7	1
CPL 15 %	2,32 $\pm$ 0,01 <sup>be</sup>	0,43 $\pm$ 0,07 <sup>be</sup>	15,80 $\pm$ 0,02 <sup>ae</sup>	7	2
FL 3%	2,14 $\pm$ 0,05 <sup>df</sup>	0,47 $\pm$ 0,19 <sup>ac</sup>	21,20 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup>	6	1
FL 7%	2,21 $\pm$ 0,03 <sup>cf</sup>	0,45 $\pm$ 0,21 <sup>bd</sup>	16,40 $\pm$ 0,03 <sup>ad</sup>	6	1
FL 10%	2,32 $\pm$ 0,03 <sup>be</sup>	0,43 $\pm$ 0,12 <sup>be</sup>	16,80 $\pm$ 0,04 <sup>ac</sup>	6	2
FL 15%	1,93 $\pm$ 0,02 <sup>f</sup>	0,52 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	18,50 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>	8	1

\* Porosità 1 = Molto poroso; 8= Poco poroso.

\*\* Struttura interna 1= regolare; 2= irregolare.

Differenti lettere indicano una differenza significativa ( $p \leq 0,001$ ), secondo l'ANOVA, seguita dal test di Tukey.

I pani mostrano quasi sempre un normale sviluppo della porosità della mollica e soltanto alle percentuali di integrazione più elevate, la dimensione dei pori risulta leggermente ridotta. Inoltre, la struttura interna è apparsa quasi sempre regolare, ad eccezione delle tesi CPL 7%, 15% e FL 10%.

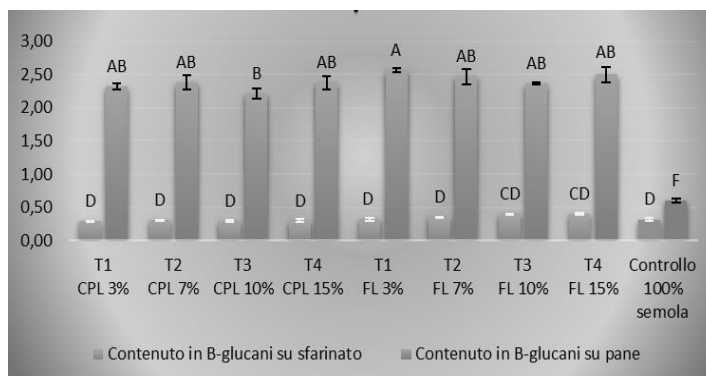
I parametri colorimetrici (Tab. 3) indicano che, all'aumentare della percentuale sia di farina sia di concentrato proteico di lupino aumenta sia l'indice di giallo della mollica sia l'indice di bruno della crosta.

**Tabella 3.** Parametri colorimetrici di crosta e mollica nei pani a diverse percentuali di integrazione con sfarinati di lupino (media  $\pm$  deviazione standard).

Campione	Mollica			Crosta		
	Indice di bruno (100-L)	Indice di rosso (a*)	Indice di giallo (b*)	Indice di bruno (100-L)	Indice di rosso (a*)	Indice di giallo (b*)
Controllo (100% semola)	25,76 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	-2,97 $\pm$ 0,07 <sup>g</sup>	21,82 $\pm$ 0,27 <sup>de</sup>	63,99 $\pm$ 1,23 <sup>a-d</sup>	12,37 $\pm$ 0,05 <sup>b-d</sup>	17,01 $\pm$ 0,59 <sup>cd</sup>
CPL 3%	25,32 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	-2,11 $\pm$ 0,07 <sup>e-g</sup>	22,96 $\pm$ 1,64 <sup>de</sup>	62,78 $\pm$ 2,21 <sup>a-d</sup>	10,44 $\pm$ 0,27 <sup>d-f</sup>	15,29 $\pm$ 1,73 <sup>cd</sup>
CPL 7%	28,86 $\pm$ 0,09 <sup>ab</sup>	-1,50 $\pm$ 0,17 <sup>e</sup>	30,95 $\pm$ 1,68 <sup>b</sup>	66,98 $\pm$ 0,92 <sup>ab</sup>	8,72 $\pm$ 0,02 <sup>ef</sup>	11,15 $\pm$ 0,89 <sup>de</sup>
CLP 10%	28,60 $\pm$ 0,03 <sup>ab</sup>	-1,09 $\pm$ 0,25 <sup>c-e</sup>	31,49 $\pm$ 1,36 <sup>b</sup>	65,83 $\pm$ 0,59 <sup>ac</sup>	10,60 $\pm$ 0,19 <sup>de</sup>	12,96 $\pm$ 0,11 <sup>de</sup>
CPL 15 %	29,85 $\pm$ 0,01 <sup>ab</sup>	-0,10 $\pm$ 0,07 <sup>bc</sup>	32,83 $\pm$ 0,89 <sup>ab</sup>	65,35 $\pm$ 0,82 <sup>a-c</sup>	10,97 $\pm$ 0,02 <sup>c-e</sup>	12,86 $\pm$ 0,44 <sup>de</sup>
FL 3%	27,02 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>	-2,97 $\pm$ 0,09 <sup>g</sup>	26,05 $\pm$ 1,59 <sup>cd</sup>	64,76 $\pm$ 1,25 <sup>a-c</sup>	9,65 $\pm$ 0,37 <sup>d-f</sup>	14,07 $\pm$ 0,08 <sup>de</sup>
FL 7%	25,81 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	-3,05 $\pm$ 0,11 <sup>g</sup>	28,30 $\pm$ 0,82 <sup>bc</sup>	65,70 $\pm$ 0,28 <sup>a-c</sup>	9,69 $\pm$ 0,03 <sup>d-f</sup>	12,98 $\pm$ 0,94 <sup>de</sup>
FL 10%	29,57 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup>	-3,04 $\pm$ 0,12 <sup>g</sup>	32,58 $\pm$ 0,99 <sup>ab</sup>	70,43 $\pm$ 1,36 <sup>a</sup>	7,03 $\pm$ 0,04 <sup>f</sup>	8,11 $\pm$ 0,12 <sup>e</sup>
FL 15%	27,32 $\pm$ 0,01 <sup>ab</sup>	-2,80 $\pm$ 0,15 <sup>g</sup>	36,39 $\pm$ 1,75 <sup>a</sup>	68,47 $\pm$ 0,68 <sup>ab</sup>	8,51 $\pm$ 0,02 <sup>ef</sup>	11,08 $\pm$ 0,37 <sup>de</sup>

Differenti lettere indicano una differenza significativa ( $p \leq 0,001$ ;  $\leq 0,01$  a\* crosta;  $\leq 0,05$  100-L mollica), secondo l'ANOVA, seguita dal test di Tukey.

Molto interessante risulta l'aumento significativo del contenuto in  $\beta$ -glucani nei pani arricchiti, sia confrontato con i vari mix di sfarinati di partenza sia rispetto al pane di controllo (Fig. 1).



**Figura 1.** Contenuto in  $\beta$ -glucani in farine e pani a diverse percentuali di integrazione con sfarinati di lupino (media  $\pm$  deviazione standard).

Differenti lettere indicano una differenza significativa ( $p \leq 0,001$  per sfarinati;  $p \leq 0,01$  per pani), secondo l'ANOVA, seguita dal test di Tukey.

I risultati complessivamente ottenuti indicano che è possibile integrare con successo pane di semola di frumento duro con sfarinati di lupino. L'elevato contenuto in proteine e fibre, associato al significativo aumento del contenuto in  $\beta$ -glucani sui pani, ne suggeriscono un futuro impiego in panificazione e nella produzione di altri "baked goods" e di pasta, alimenti di largo consumo quotidiano, particolarmente indicati per alcune categorie di consumatori (sportivi, vegetariani, vegani, ecc.), i quali potrebbero trarre dei benefici salutistici dai  $\beta$ -glucani contenuti nei prodotti finiti ed avere assicurato un significativo apporto in proteine e fibre per il raggiungimento dei loro fabbisogni giornalieri. Ulteriori studi si rendono necessari in futuro per confermare e approfondire i risultati di questo studio.

## Bibliografia

- Ranalli P., Spina A., Parisi B., Torricelli R. 2018. *Leguminose Minori: Lupino, Cicerchia, Roveja*. Collana Edagricole "Tecnica & Pratica". Edagricole, Bologna. Edizioni Agricole di New Business Media Srl, Milano, Italy, pp. 180.
- Spina A., Cambrea M., Scarangella M. 2010. Prime osservazioni sui caratteri merceologici e sulla composizione chimica di *Lupinus albus* per consumo umano. In: atti del IV Convegno Nazionale Piante Mediterranee "Le potenzialità del territorio e dell'ambiente". Marina di Nova Siri (MT), 07-10 ottobre 2009: 702-706.
- Spina A., Roccasalva D. 2017. Nuovi alimenti a base di legumi: aspetti tecnologici e potenzialità salutistiche. "1° Incontro Nazionale sui Legumi". FAO, Roma 9-10 novembre 2017.
- Spina A. 2020. Prodotti alimentari innovativi a base di farine di legumi per celiaci, vegetariani e vegani. In: *I libri dell'Accademia - I legumi in Italia: attualità e prospettive*. Accademia Nazionale di Agricoltura (ANA). Annali CXXXIX (Anno 2019): 525-540.



## **Qualità nutrizionale di pane funzionale con lenticchie rosse pensato per un consumatore anziano ed effetti del suo consumo sul sistema immunitario murino**

V. Turfani\*, V. Narducci, A. Finamore, M. Roselli, A. Durazzo, M. Carcea

Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (CREA-AN), Via Ardeatina 546, 00178 Roma (RM).

\*E-mail: [valeria.turfani@crea.gov.it](mailto:valeria.turfani@crea.gov.it)

### **Abstract**

A functional bread tailored for the needs of the aging population was baked by substituting 24% of wheat flour with red lentil flour and compared with wheat bread. Its nutritional profile was assessed by analysing proteins, amino acids, lipids, soluble and insoluble dietary fibre, total polyphenols, lignans and the antioxidant capacity (FRAP assay). The wheat–lentil bread had 30% more proteins than wheat bread, a more balanced amino acids composition, an almost double mineral as well as total dietary fibre content, double the amount of polyphenols, higher amounts and variety of lignans, and more than double the antioxidant capacity. The *in vivo* effect of 60 days bread consumption on the immune response was studied by means of a murine model of elderly mice. Serum cytokines and intraepithelial lymphocyte immunophenotype from the mice intestine were analysed as markers of systemic and intestinal inflammatory status, respectively. Analysis of immune parameters in intraepithelial lymphocytes showed significant differences among the two types of bread indicating a positive effect of the wheat–lentil bread on the intestinal immune system, whereas both breads induced a reduction in serum IL-10.

### **Riassunto**

Per andare incontro alle esigenze nutrizionali della popolazione anziana, è stato formulato un pane funzionale contenente il 24% di farina di lenticchie rosse. Il profilo nutrizionale del pane è stato valutato attraverso l'analisi del contenuto in proteine, amminoacidi, lipidi, fibre alimentari solubili e insolubili, polifenoli totali, lignani e della capacità antiossidante. Rispetto al pane di solo frumento, il pane con farina di lenticchie presentava il 30% in più di proteine, una composizione in aminoacidi più equilibrata, un contenuto quasi doppio in minerali, in fibre alimentari e in polifenoli totali, una maggiore quantità e varietà di lignani e più del doppio della capacità antiossidante. Gli effetti del pane contenente lenticchie rosse sono stati valutati *in vivo* in un modello di topi anziani alimentati per 60 giorni con una dieta bilanciata contenente pane funzionale o pane di controllo, oppure alimentati con una dieta standard. Le citochine sieriche e l'immunofenotipo linfocitario intraepiteliale dell'intestino dei topi sono stati usati come marker dello stato infiammatorio rispettivamente sistemico e intestinale. Le differenze immunofenotipiche osservate nei linfociti intraepiteliali tra i due gruppi di topi, suggeriscono un effetto positivo del pane funzionale sulla risposta immunitaria intestinale, mentre è stata osservata una riduzione della IL-10 sierica indotta da entrambe le diete contenenti pane rispetto alla dieta standard.

### **Introduzione**

Secondo recenti statistiche (Eurostat, 2019), in Europa la percentuale della popolazione con più di 65 anni è aumentata costantemente negli ultimi dieci anni. L'invecchiamento è una condizione che porta con sé una serie di fattori che contribuiscono al rischio malnutrizione (Starr *et al.*, 2015). Dati attuali relativi all'assunzione media di nutrienti suggeriscono che, come gruppo, gli anziani corrono il rischio di non soddisfare la dose giornaliera raccomandata (RDA) o i valori di apporto adeguato (AI) di calcio, altri minerali, vitamine, fibre e proteine (Ziylan *et al.*, 2018). Poiché è stato dimostrato che i componenti alimentari bioattivi influiscono sul

sistema immunitario, un adeguato intervento nutrizionale può essere un approccio promettente per contrastare la compromissione delle funzioni del sistema immunitario dovuta all'invecchiamento (Pae *et al.*, 2012). Una possibilità interessante è quella di progettare alimenti su misura per le persone anziane e l'arricchimento di alimenti di base o ampiamente consumati può essere una semplice strategia per aumentare l'assunzione di tali componenti. Il pane è un alimento importante nella dieta quotidiana di molte persone: esso è generalmente prodotto con farina bianca setacciata, povera in composti bioattivi e fibre. Questa carenza può essere facilmente compensata aggiungendo la farina bianca con altri ingredienti per aumentarne il valore nutritivo, senza alterarne la funzionalità tecnologica. Tra questi potenziali ingredienti le lenticchie hanno guadagnato sempre più interesse grazie alle loro proprietà nutritive (Faris *et al.*, 2012). Tra le varietà di lenticchie, quelle rosse si distinguono per essere un'importante fonte di proteine, fibre e in particolare di sostanze bioattive (Durazzo *et al.*, 2013). In base a queste considerazioni e grazie a studi condotti precedentemente nel nostro laboratorio (Turfani *et al.*, 2017), abbiamo prodotto un pane funzionale contenente il 24% di lenticchie rosse sul quale sono stati analizzati una serie di composti di interesse nutrizionale e testati gli effetti del suo consumo su un modello murino di topi anziani.

### **Materiali e metodi**

Sono state prodotte due tipologie di pane, una con il 100% di farina di frumento tenero (P-Std) e una con una miscela di farina di frumento tenero e farina di lenticchie rosse (PLR-24). La farina di frumento Horeca tipo "0" e le lenticchie rosse decorticate Select, sono state acquistate al supermercato. Le lenticchie rosse sono state macinate in un mulino da laboratorio refrigerato al fine di ottenere una farina molto omogenea. Le due farine sono state miscelate per produrre uno sfarinato contenente il 24% di farina di lenticchie rosse e il 76% di farina di frumento tenero. Queste proporzioni sono state scelte in base ai risultati ottenuti in un nostro precedente studio (Turfani *et al.*, 2017) nel quale è stata determinata la quantità massima di farina di lenticchie rosse che si poteva tecnologicamente aggiungere alla farina di frumento senza compromettere il processo di panificazione. La panificazione è stata effettuata seguendo il metodo standard ICC n. 131 (ICC, 2003) con alcune modifiche per ridurre al minimo il contenuto in zucchero ed eliminare l'aggiunta di acido ascorbico. Umidità, proteine, lipidi e le ceneri sono state determinate sul pane con i metodi standard ICC 110/1, 105/2, 136, 104/1, rispettivamente (ICC, 2003). La fibra alimentare è stata determinata secondo Lee *et al.* (1992) utilizzando il kit K-TDFR (Megazyme Int., Wicklow, Irlanda). I carboidrati disponibili sono stati calcolati per differenza. Gli amminoacidi sono stati determinati secondo Spackman *et al.* (1958) utilizzando lo strumento dedicato Beckman System Gold 126 (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA). I polifenoli totali, i lignani e la capacità antiossidante (FRAP) sono stati determinati come riportato in Durazzo *et al.* (2013).

Gli effetti del consumo di pane contenente farina di lenticchie sulla risposta immunitaria sono stati valutati *in vivo* in un modello di topi anziani alimentati per 60 giorni con una dieta bilanciata di controllo (contenente amido di mais), oppure contenente pane di frumento (pane bianco) o pane funzionale con farina di lenticchie rosse. La concentrazione di citochine sieriche (analizzate mediante ELISA) e l'immunofenotipo linfocitario (analizzato mediante citofluorimetria) intraepiteliale dell'intestino (digiuno e colon) dei topi sono stati usati come indicatori dello stato infiammatorio, rispettivamente sistemico e intestinale.

### **Risultati e discussione**

La composizione chimica delle due tipologie di pane è stata esaminata (Tab. 1) ed è emerso che il pane contenente il 24% di lenticchia rossa presentava un contenuto in proteine circa del 30% più alto rispetto al pane di frumento, in particolare 8,3% rispetto al 6,4%. Inoltre, lo stesso pane

presentava anche un contenuto in ceneri (0,63 verso 0,39) e in fibra alimentare (4,6 verso 2,6), specialmente la componente insolubile, quasi doppio di quello del pane di frumento.

**Tabella 1.** Composizione centesimale di pane di frumento e pane con lenticchia rossa (% s.s)\*

	<i>Proteine</i>	<i>Grassi</i>	<i>Ceneri</i>	<i>Fibra insolubile</i>	<i>Fibra solubile</i>	<i>Fibra tot</i>	<i>Carboidrati</i>
<i>P-Std</i>	6.4	1.0	0.39	1.6	1.0	2,6	50.8
<i>PLR-24</i>	8.3	0.9	0.63	3.1	1.5	4,6	45.5

\*P-Std: pane di farina di frumento; PLR-24: pane con lenticchia rossa (24%)

In Tabella 2 viene riportato il contenuto amminoacidico (mg/100 g di proteine) sia del pane di frumento che di quello con lenticchie. Dai dati emerge chiaramente come PLR-24 presenti un profilo amminoacidico più equilibrato rispetto al pane di frumento.

**Tabella 2.** Composizione amminoacidica di pane di frumento e pane con lenticchia rossa\*

	<i>Ac.Aspartico</i>	<i>Treonina</i>	<i>Serina</i>	<i>Ac.Glutam</i>	<i>Prolina</i>	<i>Glicina</i>	<i>Alanina</i>	<i>Cisteina</i>	<i>Valina</i>
<i>P-Std</i>	4.20	2.82	4.98	39.75	9.90	3.67	3.03	1.89	4.53
<i>PLR-24</i>	6.05	3.01	5.04	34.36	8.39	3.79	3.27	1.60	4.84
	<i>Metionina</i>	<i>Isoleucina</i>	<i>Leucina</i>	<i>Tirosina</i>	<i>Fenilalan</i>	<i>Istidina</i>	<i>Lisina</i>	<i>Arginina</i>	<i>NH4</i>
<i>P-Std</i>	1.36	4.07	7.08	2.77	4.88	2.28	2.318	3.89	5.12
<i>PLR-24</i>	1.13	4.27	7.21	2.76	4.92	2.41	3.30	4.91	4.42

\*P-Std: pane di farina di frumento; PLR-24: pane con lenticchia rossa (24%); mg/100g proteine

Il pane di lenticchie era anche più ricco di sostanze fenoliche, in particolare di quelle estraibili con miscela acquoso-organica. I lignani secoisolariciresinolo e isolariciresinolo sono stati trovati in entrambi i pani, tuttavia, il pane di lenticchie non solo ne conteneva quantità maggiori, ma conteneva anche altri lignani, precisamente lariciresinolo e pinoresinolo (Tab. 3).

**Tabella 3.** Contenuto in polifenoli, lignani e FRAP in pane di frumento e pane con lenticchia rossa

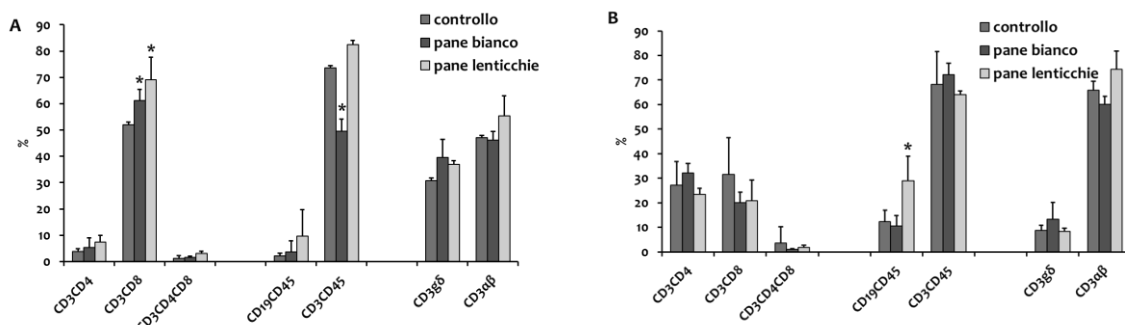
	<i>Polifenoli*</i>		<i>FRAP#(μmol/g s.s)</i>		<i>Lignani (μg/100 g s.s.)</i>			
	<i>estratto acq.- org</i>	<i>residuo idr.</i>	<i>estratto acq.- org</i>	<i>residuo idr.</i>	<i>Isolarici-resinolo</i>	<i>Larici-resinolo</i>	<i>Secoisolarici-resinolo</i>	<i>Pinoresinolo</i>
<i>P-Std</i>	59	412	6.4	21.1	2.4	-	4.5	-
<i>PLR-24</i>	250	689	21.9	49.76	66.5	45.2	7.0	27.3

\*GAE equivalenti Ac. Gallico (mgGAE/100g s.s); # FRAP potere antiossidante

Il potere antiossidante misurato dal FRAP era più alto nel pane di lenticchie, mentre in entrambi i pani il residuo idrolizzabile aveva un FRAP maggiore rispetto all'estratto acquoso-organico (dal 69% al 77%). Come si vede, il valore del FRAP tende ad aumentare con il contenuto di polifenoli. Un pane in cui circa un quarto della farina di frumento è stata sostituita da farina di lenticchie rosse ha una capacità antiossidante più che doppia (Tab. 3).

Si è infine studiato, mediante un modello murino di topi anziani, l'effetto del consumo di pane di frumento e pane con lenticchie rispetto alla dieta di controllo sul sistema immunitario. I diversi trattamenti alimentari non hanno indotto differenze nei pesi corporei e nel consumo di

cibo tra i tre gruppi di animali (Carcea *et al.*, 2019), mentre si osservano alcune modifiche nei parametri immunologici analizzati tra i topi alimentati con i due tipi di pane rispetto al controllo. L'analisi dei linfociti intraepiteliali (Fig. 1A) del digiuno mostra che entrambi i pani inducevano un aumento dei linfociti T citotossici (CD8+), più marcato con il pane di lenticchie rispetto al pane bianco.



**Figura 1.** Sottopopolazioni di linfociti intraepiteliali (IEL) nel digiuno (A) e nel colon (B) di topi alimentati con dieta di controllo, pane di frumento o pane con farina di lenticchie rosse

Inoltre, il pane bianco induceva una riduzione nella percentuale dei linfociti T totali (CD3+CD45+), mentre il pane con lenticchie induceva un aumento rispetto al controllo, indicando una migliore risposta immunitaria. Nel colon (Fig. 1B) si osserva un incremento nella percentuale dei linfociti B (CD19+CD45+) indotto dal consumo di pane con lenticchie rispetto a pane bianco e controllo, suggerendo un'augmentata capacità di rispondere agli agenti tossici e/o patogeni, e una migliore risposta anticorpale.

**Tabella 4.** Concentrazione di citochine sieriche (*pg/mL*) di topi alimentati con dieta di controllo, oppure contenente pane di frumento (P-Std) o pane con farina di lenticchie rosse (P-LR24)

	<i>IL-17</i>	<i>IL-10</i>	<i>GM-CSF</i>
<b>Controllo</b>	25.79 ± 1.28	13.49 ± 7.52	3.02 ± 0.31
<b>P-Std</b>	23.01 ± 2.37	4.81 ± 3.11*	2.50 ± 0.56
<b>P-LR24</b>	23.52 ± 2.35	6.73 ± 1.79*	2.65 ± 0.10

IL: interleuchina; GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

\* I dati rappresentano le medie ± SD di 6 topi per gruppo; \*p < 0.05 rispetto al controllo

Riguardo le citochine, l'IL-10 è risultata ridotta negli animali trattati con pane bianco e lenticchie (Tab. 4). Considerando che l'aumento di IL-10 negli anziani può essere un marker di fragilità, supponiamo che la somministrazione di pane bianco e di lenticchie rosse possa avere un effetto positivo sullo stato immunitario.

## Conclusioni

La popolazione che invecchia ha bisogno di mangiare in modo appropriato per prevenire e ridurre i rischi per la salute in questa fase della vita umana. In altre parole, c'è bisogno di alimenti su misura per le persone anziane. Arricchire alimenti di base o ampiamente consumati può essere una strategia semplice per garantire l'assunzione di nutrienti e sostanze bioattive in grado di avere un effetto benefico sulla salute dell'anziano e contrastare agli aspetti negativi

legati all'invecchiamento come, per esempio, il declino della funzione immunitaria. I risultati ottenuti in questo studio indicano una migliore qualità nutrizionale del pane con lenticchie rosse rispetto al pane bianco e alcuni effetti positivi sul sistema immunitario in un modello murino.

## **Bibliografia**

- Carcea M., Turfani V., Narducci V., Durazzo A., Finamore A., Roselli M., Rami R. 2019. Bread for the aging population: the effect of a functional wheat-lentil bread on the immune function of aged mice. *Foods*, 8: 510-526.
- Durazzo A., Turfani V., Azzini E., Maiani G., Carcea M. 2013. Phenols, lignans and antioxidant properties of legume and sweet chestnut flours. *Food Chemistry*, 140: 666-671.
- EUROSTAT. Your Key to European Statistics. 2019. Available online: <https://ec.europa.eu/eurostat/data/database> (accessed on 25 July 2019).
- Faris M.A.I.E., Takturi H.R., Issa A.Y. 2012. Role of lentils (*Lens culinaris* L.) in human health and nutrition: A review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 6, 3-16.
- International Association for Cereal Science and Technology. 2003. *ICC Standard Methods*. Methods No. 104/1, 105/2, 110/1, 115/1, 131, 136; ICC: Vienna, Austria.
- Lee S.C., Prosky L., DeVries J.W. 1992. Determination of total, soluble and insoluble, dietary fibre in foods, enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: Collaborative study. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 75: 395-416.
- Pae M., Meydani S.N., Wu D. 2012. The Role of nutrition in enhancing immunity in aging. *Aging and Disease*, 3: 91-129.
- Spackman D.K., Stein W.H., Moore S. 1958. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resin: An improved system. *Analytical Chemistry*, 30: 1190-1196.
- Starr K.N.P., Mc Donald S.R., Bales C.W. 2015. Nutritional vulnerability in older adults: a continuum of concerns. *Current Nutrition Reports*, 4: 176-184.
- Turfani V., Narducci V., Durazzo A., Galli V., Carcea M. 2017. Technological, nutritional and functional properties of wheat bread enriched with lentils and carob flours. *LWT-Food Science and Technology*, 78: 361-366.
- Ziylan C., Haveman-Nies A., Kremer S., de Groot L.C. 2016. Protein-enriched bread and readymade meals increase community-dwelling older adults' protein intake in a double-blind randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Directors Association*, 18: 145-151.

## **Influenza degli idrocolloidi sulle qualità fisiche del pane ottenuto con semola di una vecchia varietà di grano duro**

*M. G. Farbo\*, P. Conte, A. Del Caro, C. Fadda, A. Piga*

Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39/A, I-07100 Sassari (SS).

\*E-mail: [mgfarbo@uniss.it](mailto:mgfarbo@uniss.it)

### **Abstract**

The use of durum wheat old varieties as a raw material for bread is recently preferred by consumers who consider the old varieties healthier than modern ones. The beneficial effects have been attributed to phytochemicals, that confer to the wheat antioxidant properties, fibres, vitamins, and phytoestrogens with protective function for health, complementing those present in the human diet. The objective of this study was to assess the behaviour of an old wheat cultivar, *Russello*, during the bread making and to investigate the role of the addition of different hydrocolloids, namely methylcellulose, guar, psyllium, xanthan and tara, used at two different percentages (0.5 and 1%), on bread quality. Specific volume, moisture and color evaluation were detected on hydrocolloid supplemented breads and computerized image analysis was carried out to measure crumb grain structure and crumb uniformity.

### **Riassunto**

Recentemente l'uso delle varietà antiche di grano duro come materia prima per il pane è prediletto dai consumatori, che considerano le varietà antiche più sane di quelle moderne. Gli effetti benefici sono stati attribuiti alla presenza di antiossidanti, fibre, vitamine, e fitoestrogeni con funzione protettiva per la salute, complementari a quelli presenti nella dieta umana. L'obiettivo di questo studio è stato quello di osservare il comportamento di un'antica cultivar di frumento, *Russello* durante la panificazione, e di valutare il ruolo dell'aggiunta di diversi idrocolloidi (metilcellulosa, guar, psyllium, xantano e tara) in due percentuali (0,5 e 1%) sulla qualità del pane. Il volume specifico, l'umidità ed il colore sono stati rilevati sui pani prodotti ed è stata eseguita un'analisi d'immagine per la struttura alveolare della mollica.

### **Introduzione**

Nonostante le vecchie varietà di grano abbiano scarse proprietà reologiche e necessitino di interventi supplementari, oggi il consumatore li sceglie e li predilige per il loro valore tradizionale e nutrizionale. Esse contengono sostanze con proprietà antiossidanti, come composti fenolici, fibre, vitamine del gruppo B, vitamina E, zinco, magnesio, potassio, ferro e fitoestrogeni (Boukid *et al.*, 2019).

Negli ultimi anni sono stati ampiamente promossi i pani di semola di grano duro ottenuta da vecchie varietà, per l'intrinseco valore culturale e storico. Queste varietà sono sempre più richieste da consumatori, nutrizionisti e tecnologi. Inoltre, le vecchie varietà di grano sono più adattabili ad ambienti avversi, rappresentando un nuovo modo per proteggere e valorizzare la biodiversità e la coltivazione in zone meno favorevoli (Dinelli *et al.*, 2011; Migliorini *et al.*, 2016). Purtroppo, tali varietà non sono adatte alla lavorazione industriale e mostrano scarse prestazioni tecnologiche. Gli attuali processi e macchinari industriali sono più atti all'impiego di varietà moderne e non di semole di vecchie varietà, a causa delle scarse proprietà tecnologiche che però possono essere compensate dall'aggiunta di agenti miglioratori di diversa natura (Parenti *et al.*, 2020). Un particolare ruolo migliorativo è svolto dagli idrocolloidi, che inducono un cambiamento nel comportamento meccanico (forza e stabilità) e nelle prestazioni di cottura dell'impasto. Hanno una forte capacità di legame con l'acqua che influenza

l'idratazione e lo sviluppo della rete del glutine con implicazioni nello sviluppo dell'impasto e del pane (Sun *et al.*, 2022). Nel presente lavoro sono stati esaminati gli effetti dell'uso degli idrocolloidi con due livelli di addizione su struttura e qualità del pane a base di semola di vecchia varietà *Russello* per identificare possibili interazioni positive.

## **Materiali e metodi**

### ***Materie prime e preparazione dei pani***

È stata impiegata una vecchia cultivar di grano duro *Russello* (Molini del Ponte, Castelvetro, Italia), lievito compresso fresco e sale. Sono stati impiegati cinque idrocolloidi: metilcellulosa (MC), gomma di guar (GG), psyllium (PG), xantano (XG) e tara (TG).

È stato preparato un pane di controllo, utilizzando il 50,5% di acqua, il 2% di lievito, il 2% di sale. Le cinque formulazioni a base di semola e idrocolloidi sono state preparate con 2 diversi livelli (0,5% e 1% su base semola), così da ottenere 10 diverse miscele secche, a cui sono stati aggiunti acqua e lievito, precedentemente sospeso in acqua a temperatura ambiente. Le formulazioni risultanti sono state impastate a temperatura ambiente in un mixer (KitchenAid, Artisan, 5KSM150, USA) per 10 min a velocità 2 e l'impasto ottenuto è stato trasferito in cella di lievitazione, per 30 min a 30°C e 85% umidità. Gli impasti fermentati sono stati divisi in pani da 600 g, modellati a mano, riposti in teglie fino al triplicare del loro volume. I pani sono stati cotti in forno elettrico (Europa, Molina di Malo, VI, Italia) per 40 min a 200 °C. La qualità del pane è stata valutata dopo raffreddamento a temperatura ambiente per 2 ore.

### ***Volume specifico e umidità***

Il volume dei campioni è stato determinato mediante il metodo AACC 10–05.01 (AACC, 2005) e il volume specifico (mL/g) è stato calcolato come volume del pane/peso del pane. L'umidità è stata determinata per ciascun campione di pane con il metodo ICC (ICC, 1994).

### ***Analisi di colore di crosta e mollica del pane***

La determinazione strumentale del colore è stata eseguita per la crosta e per la mollica utilizzando un colorimetro Minolta (Minolta CR-300, Konica Minolta Sensing, Osaka, Giappone) con illuminante D65. È stato considerato lo spazio colore di Hunter Lab e i valori delle coordinate colorimetriche sono stati:  $L^*$  = luminosità (da nero 0 a bianco 100);  $a^*$  = componente rosso-verde e  $b^*$  = componente giallo-blu. Le misurazioni del colore della crosta sono state effettuate su 6 pani in tre punti (centrale e due distali); il colore della mollica è stato rilevato centralmente da tre fette di ciascun campione.

### ***Texture profile analysis***

La determinazione delle proprietà meccaniche delle fette di pane risultate da ciascun campione è stata effettuata utilizzando TA-XT2 plus (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, Regno Unito) equipaggiato con sonda cilindrica (25 mm di diametro) e cella di carico di 30 kg. Il test, del tipo Texture Profile Analysis (TPA) è stato condotto ad una velocità di 1 mm/s, applicando al campione una deformazione del 50%. Il tempo di attesa tra i due cicli di compressioni (*bite*) è stato di 30 secondi. Tutte le acquisizioni sono avvenute con il software Texture Exponent TEE32, versione 6,1,10,0 (Stable Micro System, Surrey, Regno Unito). La curva forza-tempo caratteristica della TPA è formata da due gaussiane la cui analisi ha consentito di ricavare i parametri (Friedman *et al.* 1963) durezza, coesività, gommosità, masticabilità, elasticità e resilienza. L'analisi è stata condotta su quattro fette centrali di ogni campione.

### ***Analisi d'immagine***

Le immagini di 4 fette di pane per ciascun campione sono state acquisite utilizzando uno scanner Epson Perfection - V500 Photo (Epson, Suwa, Giappone). L'analisi è stata eseguita su 60×60 mm presi dal centro delle immagini (n=3) e i dati sono stati elaborati utilizzando il programma Imagine J (NIH, USA). L'alveolatura della mollica è stata descritta dal numero di alveoli, rapporto alveoli/area totale, rapporto parete/area totale, cellule/cm<sup>2</sup>. La distribuzione dell'area alveolare e la distribuzione del numero di alveoli sono state suddivise in classe 1 (< 0,1 mm<sup>2</sup>), classe 2 (0,1-0,99 mm<sup>2</sup>), classe 3 (1-9,99 mm<sup>2</sup>), classe 4 (10-60 mm<sup>2</sup>).

### **Analisi statistica**

Software Minitab® 17.1.0 (Minitab, Inc.), analisi della varianza (ANOVA), con procedura LSD di test Fisher, test *t* (p < 0.05).

## **Risultati e discussione**

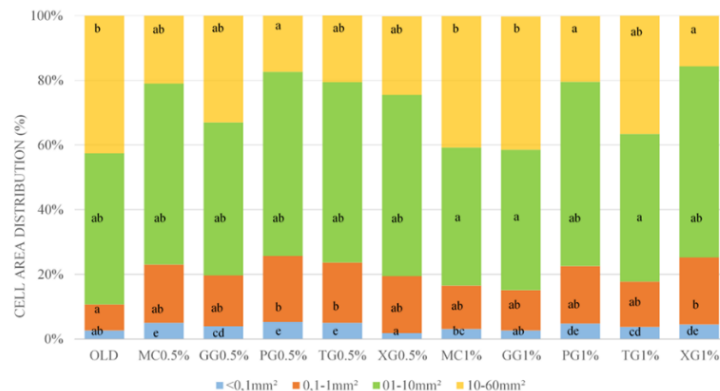
### ***Volume specifico, umidità e colore***

L'impiego degli idrocolloidi metilcellulosa e guar entrambi all'1% ha mostrato un incremento di volume rispetto ai pani a base di sola semola *Russello*, comportamento giustificato dalla struttura anionica degli idrocolloidi interessati. Non è stato rilevato un aumento significativo di volume con l'impiego di guar e psyllium, comportando un'assenza di variazioni rispetto al controllo (Tab. 1). È stata rilevato un aumento significativo di umidità nei pani supplementati con gli idrocolloidi rispetto al pane controllo, eccetto per guar (0,5%), metilcellulosa e psyllium (1%). Gli idrocolloidi hanno implementato la capacità di ritenzione idrica della semola *Russello*, grazie ai gruppi ossidrilici, capaci di formare legami idrogeno con l'acqua, limitandone così la dispersione della stessa. L'interazione tra idrocolloidi e amilasi ha influenzato significativamente il colore della crosta del pane; non sono state rilevate variazioni significative per la luminosità (L\*) della mollica dei campioni rispetto al controllo (Tab. 1).

### ***Profilo di texture e alveolatura della mollica***

I campioni fortificati hanno mostrato valori di hardness significativamente maggiori rispetto al pane controllo *Russello*. Generalmente gli idrocolloidi hanno mostrato avere un effetto sulla struttura dell'amido, di conseguenza sulla ritenzione e distribuzione dell'acqua, influenzando sulla morbidezza della mollica (Tab. 2). La gumminess e la chewiness dei campioni fortificati con idrocolloidi sono dipesi principalmente dalla durezza piuttosto che dalla coesione o dall'elasticità (Tab. 2).

Gli idrocolloidi hanno influenzato uniformità e distribuzione degli alveoli riducendone la tessitura, ad eccezione di metilcellulosa e guar all'1% (Fig. 1).



**Figura 1.** Distribuzione degli alveoli dei campioni di pane suddivisi in 4 Classi per area: 1 (< 0.1 mm<sup>2</sup>), 2 (0.1-0.9 mm<sup>2</sup>), 3 (1-9.9 mm<sup>2</sup>), 4 (10-60 mm<sup>2</sup>), (p < 0.05).



**Tabella 1.** Caratteristiche fisiche dei campioni e colore di crosta e mollica dei pani a base Russello e arricchiti con diversi idrocolloidi. A lettere diverse all'interno di ogni colonna corrispondono medie statisticamente significative per  $p < 0.05$  secondo procedura LSD di Fisher.

Campioni	Caratteristiche							
	Volume e Umidità		Colore crosta			Colore mollica		
	SV (mL/g)	Umidità (%)	L*	a*	b*	L*	a*	b*
Russello	2.77±0.03 <sup>de</sup>	37.21±0.21 <sup>ab</sup>	66.70±0.89 <sup>bc</sup>	8.14±0.62 <sup>de</sup>	32.67±0.83 <sup>cd</sup>	71.06±0.33 <sup>a</sup>	-1.69±0.03 <sup>cd</sup>	16.92±0.75 <sup>a</sup>
<b>0.5%</b>								
MC	2.89±0.03 <sup>f</sup>	38.27±0.05 <sup>de</sup>	69.61±0.66 <sup>de</sup>	6.25±0.59 <sup>bc</sup>	29.53±0.75 <sup>b</sup>	73.29±0.14 <sup>a</sup>	-2.08±0.05 <sup>b</sup>	17.75±0.38 <sup>ab</sup>
GG	2.83±0.05 <sup>ef</sup>	37.12±0.18 <sup>a</sup>	65.70±1.58 <sup>b</sup>	9.09±0.78 <sup>c</sup>	33.41±0.72 <sup>d</sup>	74.91±1.32 <sup>a</sup>	-1.83±0.00 <sup>c</sup>	17.98±1.01 <sup>a</sup>
PG	2.72±0.06 <sup>d</sup>	37.99±0.19 <sup>cd</sup>	63.91±0.82 <sup>a</sup>	9.03±0.45 <sup>e</sup>	31.32±0.45 <sup>bc</sup>	72.20±0.55 <sup>a</sup>	-0.9±0.12 <sup>f</sup>	16.35±0.69 <sup>a</sup>
TG	2.70±0.08 <sup>d</sup>	38.52±0.15 <sup>de</sup>	69.47±1.49 <sup>de</sup>	6.24±0.50 <sup>bc</sup>	29.43±0.47 <sup>b</sup>	72.92±0.01 <sup>a</sup>	-1.71±0.2 <sup>cd</sup>	17.61±0.12 <sup>ab</sup>
XG	2.29±0.04 <sup>b</sup>	38.98±0.06 <sup>ef</sup>	73.10±1.13 <sup>f</sup>	4.50±0.55 <sup>a</sup>	26.37±0.78 <sup>a</sup>	72.83±0.92 <sup>a</sup>	-1.28±0.1 <sup>ef</sup>	18.45±0.25 <sup>ab</sup>
<b>1%</b>								
MC	2.87±0.04 <sup>ef</sup>	37.64±0.07 <sup>bc</sup>	70.98±2.61 <sup>e</sup>	5.40±1.51 <sup>ab</sup>	30.04±2.28 <sup>b</sup>	73.39±1.09 <sup>a</sup>	-2.24±0.09 <sup>b</sup>	16.50±0.10 <sup>a</sup>
GG	2.82±0.10 <sup>ef</sup>	37.93±0.15 <sup>cd</sup>	65.23±2.96 <sup>b</sup>	8.60±1.47 <sup>de</sup>	34.40±1.65 <sup>d</sup>	71.26±0.54 <sup>a</sup>	-2.09±0.12 <sup>b</sup>	17.03±0.74 <sup>a</sup>
PG	2.74±0.05 <sup>de</sup>	37.22±0.03 <sup>ab</sup>	63.85±0.78 <sup>a</sup>	9.12±0.34 <sup>e</sup>	31.16±0.39 <sup>bc</sup>	70.59±0.65 <sup>a</sup>	-0.08±0.03 <sup>e</sup>	16.25±0.08 <sup>a</sup>
TG	2.47±0.09 <sup>c</sup>	38.36±0.08 <sup>de</sup>	66.89±1.09 <sup>bc</sup>	7.06±0.53 <sup>cd</sup>	29.97±0.68 <sup>b</sup>	71.21±1.69 <sup>a</sup>	-1.66±0.1 <sup>cd</sup>	17.62±0.48 <sup>ab</sup>
XG	1.99±0.04 <sup>a</sup>	39.11±0.05 <sup>f</sup>	68.10±1.29 <sup>d</sup>	4.59±0.71 <sup>a</sup>	29.47±1.04 <sup>b</sup>	71.27±0.71 <sup>a</sup>	-1.44±0.1 <sup>de</sup>	17.61±0.12 <sup>b</sup>

**Tabella 2.** Texture Profile Analysis (TPA) dei pani a base Russello e arricchiti con diversi idrocolloidi. A lettere diverse all'interno di ogni colonna corrispondono medie statisticamente significative per  $p < 0.05$  secondo procedura LSD di Fisher.

	Hardness (N)	Springiness (N)	Cohesiveness	Gumminess	Chewiness (N)	Resilience
<b>Russello</b>	5.96±0.75 <sup>a</sup>	5.96±0.75 <sup>a</sup>	5.96±0.75 <sup>a</sup>	5.96±0.75 <sup>a</sup>	5.96±0.75 <sup>a</sup>	5.96±0.75 <sup>a</sup>
<b>0.5%</b>						
MC	6.52±0.45 <sup>ab</sup>	6.52±0.45 <sup>ab</sup>	6.52±0.45 <sup>ab</sup>	6.52±0.45 <sup>ab</sup>	6.52±0.45 <sup>ab</sup>	6.52±0.45 <sup>ab</sup>
GG	7.04±0.12 <sup>bc</sup>	7.04±0.12 <sup>bc</sup>	7.04±0.12 <sup>bc</sup>	7.04±0.12 <sup>bc</sup>	7.04±0.12 <sup>bc</sup>	7.04±0.12 <sup>bc</sup>
PG	8.29±0.37 <sup>c</sup>	8.29±0.37 <sup>c</sup>	8.29±0.37 <sup>c</sup>	8.29±0.37 <sup>c</sup>	8.29±0.37 <sup>c</sup>	8.29±0.37 <sup>c</sup>
TG	7.49±0.17 <sup>bc</sup>	7.49±0.17 <sup>bc</sup>	7.49±0.17 <sup>bc</sup>	7.49±0.17 <sup>bc</sup>	7.49±0.17 <sup>bc</sup>	7.49±0.17 <sup>bc</sup>
XG	10.57±0.99 <sup>d</sup>	10.57±0.99 <sup>d</sup>	10.57±0.99 <sup>d</sup>	10.57±0.99 <sup>d</sup>	10.57±0.99 <sup>d</sup>	10.57±0.99 <sup>d</sup>
<b>1%</b>						
MC	7.57±0.48 <sup>bc</sup>	7.57±0.48 <sup>bc</sup>	7.57±0.48 <sup>bc</sup>	7.57±0.48 <sup>bc</sup>	7.57±0.48 <sup>bc</sup>	7.57±0.48 <sup>bc</sup>
GG	5.16±0.54 <sup>a</sup>	5.16±0.54 <sup>a</sup>	5.16±0.54 <sup>a</sup>	5.16±0.54 <sup>a</sup>	5.16±0.54 <sup>a</sup>	5.16±0.54 <sup>a</sup>
PG	7.60±0.30 <sup>bc</sup>	7.60±0.30 <sup>bc</sup>	7.60±0.30 <sup>bc</sup>	7.60±0.30 <sup>bc</sup>	7.60±0.30 <sup>bc</sup>	7.60±0.30 <sup>bc</sup>
TG	8.17±0.53 <sup>c</sup>	8.17±0.53 <sup>c</sup>	8.17±0.53 <sup>c</sup>	8.17±0.53 <sup>c</sup>	8.17±0.53 <sup>c</sup>	8.17±0.53 <sup>c</sup>
XG	16.36±1.28 <sup>e</sup>	16.36±1.28 <sup>e</sup>	16.36±1.28 <sup>e</sup>	16.36±1.28 <sup>e</sup>	16.36±1.28 <sup>e</sup>	16.36±1.28 <sup>e</sup>

## Ringraziamenti

Questo lavoro è stato possibile grazie al contributo Regione Autonoma della Sardegna FESR 2014/2020 – ASSE PRIORITARIO I “RICERCA SCIENTIFICA, SVILUPPO TECNOLOGICO E INNOVAZIONE”. Azione 1.1.4 Sostegno alle attività collaborative di R&S per lo sviluppo di nuove tecnologie sostenibili, di nuovi prodotti e servizi, progetto “AVIPROFO”.

## **Bibliografia**

- AACC 2005. *American Association of Cereal Chemists, Approved Methods*, 10<sup>th</sup> ed. St. Paul, MN.
- Boukid F., Dall'Asta M., Bresciani L., Mena P., Del Rio D., Calani L., Sayar R., Seo Y.W., Yacoubi I., Mejri M. 2019. Phenolic profile and antioxidant capacity of landraces, old and modern Tunisian durum wheat. *European Food Research and Technology*, 245(1): 73-82.
- Dinelli G., Segura-Carretero A., di Silvestro R., Marotti I., Arráez-Román D., Benedettelli S., Ghiselli L., Fernandez-Gutierrez A. 2011. Profiles of phenolic compounds in modern and old common wheat varieties determined by liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(42): 7670-7681.
- Friedman H.H., Szczeniak A. S., Whitney A. S. 1963. The texturometer: a new instrument for objective texture measurement. *Journal of Food Science*, 28: 390-396.
- ICC 1994. *American Association of Cereal Chemists, Approved Methods*. Method 109/1-110/1. Vienna.
- Migliorini P., Spagnolo S., Torri L., Arnoulet M., Lazzerini G., Ceccarelli S. 2016. Agronomic and quality characteristics of old, modern and mixture wheat varieties and landraces for organic bread chain in diverse environments of northern Italy. *European Journal of Agronomy*, 79: 131-141.
- Parenti O., Guerrini L., Cavallini B., Baldi F., Zanoni, B. 2020. Breadmaking with an old wholewheat flour: Optimization of ingredients to improve bread quality. *LWT – Food Science and Technology*, 121(December 2019): 108980.
- Sun X., Pei F., Fang Y. 2022. The effects of hydrocolloids on the thermomechanical, viscoelastic and microstructural properties of whole wheat flour dough. *Food Chemistry*, 370.

## Utilizzo di idrocolloidi per l'ottimizzazione di impasti a base di una vecchia varietà di grano duro

M. G. Farbo<sup>1\*</sup>, C. Fadda<sup>1</sup>, S. Marceddu<sup>2</sup>, P. Conte<sup>1</sup>, A. Del Caro<sup>1</sup>, A. Piga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39/A, I-07100 Sassari (SS).

<sup>2</sup>Istituto CNR di Scienze delle Produzioni Alimentari - UOS Sassari - Traversa La Crucca 3, I-07100 Sassari (SS).

\*E-mail: [mgfarbo@uniss.it](mailto:mgfarbo@uniss.it)

### Abstract

In the last few decades, there has been an interest and an increase in the use of old varieties of durum wheat, due to the content of bioactive compounds that could be useful in producing health-promoting functional foods. At the same time, these old varieties show poor technological aptitudes compared to modern varieties. The aim of this study was to assess the influence of some hydrocolloids at different concentrations to define new rheological, pasting, fermentation and microstructural properties of the flour-based doughs of an old variety of Italian durum wheat, called *Russello*. The results were encouraging and showed a homogeneous structure of the dough, with a compact appearance and a fortification of the gluten network. The use of scanning electron microscopy (SEM), which was essential for the investigation of the resulting synergy in the dough obtained using semolina from *Russello* and hydrocolloids, was of paramount importance.

### Riassunto

Negli ultimi decenni è stato registrato un interesse e un incremento nell'impiego di vecchie varietà di grano duro, per il contenuto di composti bioattivi con effetto benefico sul consumatore. Al contempo tali vecchie varietà di grano mostrano scarse attitudini tecnologiche rispetto alle moderne varietà. Questo studio ha voluto sperimentare l'aggiunta di alcuni idrocolloidi a differenti concentrazioni, al fine di definire nuove proprietà reologiche, di pasting, fermentative e microstrutturali degli impasti a base di sfarinati di una vecchia varietà di grano duro italiano, denominata *Russello*. I risultati si sono rivelati incoraggianti e hanno mostrato una struttura omogenea dell'impasto, con aspetto compatto e una fortificazione della maglia glutinica. Tutto questo è stato possibile osservarlo grazie anche all'ausilio della microscopia elettronica a scansione (SEM), sostanziale per l'indagine sulla sinergia creatasi nell'impasto a base di semola di vecchia varietà *Russello* ed idrocolloidi.

### Introduzione

Tassello fondamentale per un pane è il profilo reologico dello sfarinato, dato dalla qualità e quantità delle proteine del glutine. In tutto il mondo la farina per la panificazione si ottiene dalla macinazione del *Triticum aestivum*, ad eccezione dei Paesi del Medio Oriente e dell'area del Mediterraneo, che negli ultimi anni sono stati caratterizzati da un rinnovato interesse per le vecchie varietà di grano duro (Fadda *et al.*, 20010a; Fadda *et al.*, 2010b). Tali varietà sono oggetto di attenzione anche a causa del contenuto elevato di composti bioattivi, utili nella produzione di alimenti funzionali (Shewry 2009; 2018). È stato osservato che le vecchie varietà di grano differiscono dalle varietà moderne per il contenuto superiore di alcuni componenti, come per esempio le fibre alimentari e i composti fitochimici (carotenoidi, luteina, folati, vitamine del gruppo B, tocoli, terpenoidi, steroli, acidi fenolici, lipidi resorcinolici) (Shewry 2013; 2018).

Tuttavia, le scarse proprietà tecnologiche di queste varietà, rispetto alle moderne, hanno mostrato complicazioni nei moderni impianti di lavorazione, a causa della debolezza della rete glutinica. La preparazione dell'impasto è la fase più critica per la creazione di una maglia con legami idrogeno, di tipo ionico e legami idrofobici, in grado di incorporare granuli di amido e altri componenti dell'impasto (Cappelli *et al.*, 2018). La debolezza della maglia glutinica in un impasto a base di vecchie varietà di grano duro deve essere supportata mediante l'introduzione di sostanze additive, in grado di colmare tale mancanza. Una classe di tali composti è rappresentata dagli idrocolloidi, in grado di migliorare la reologia e la qualità degli impasti (Collar *et al.*, 2015; Jafari *et al.*, 2018; Kohajdová *et al.*, 2009; Rosell *et al.*, 2001). In tale ottica l'obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare gli effetti di cinque idrocolloidi a due concentrazioni differenti nella preparazione di impasti a base di semola *Russello*, vecchia cultivar italiana di grano duro, caratterizzata da un glutine debole e viscoso.

## **Materiali e metodi**

### ***Materie prime e preparazione impasti***

Sono state impiegate due semole con caratteristiche chimico fisiche diverse: una moderna cultivar (MOD) costituita da una miscela di semola italiana (80%) e sarda (20%) (Molino Riu, Alghero, Italia); una vecchia cultivar di grano duro *Russello* (Molini del Ponte, Castelvetro, Italia). Sono stati impiegati cinque diversi idrocolloidi: metilcellulosa (MC), Gomma di Guar (GG), Psyllium (PG), Xantano (XG) e Tara (TG) e a differenti percentuali: 0% per il controllo, 1% e 5%. Il contenuto dell'umidità di entrambe le semole è stato determinato mediante il metodo ICC 1976-1996. I parametri relativi all'assorbimento dell'acqua, allo sviluppo dell'impasto espresso in minuti (DDT) e alla stabilità sono stati determinati mediante farinografo (Brabender, modello 810104, Duisburg, Germania). I campioni sono stati ottenuti mediante miscelazione di acqua e semola per 10 minuti a velocità 2 in un'apposita impastatrice (KitchenAid, Artisan, 5KSM150, USA), conservati a temperatura ambiente, poi suddivisi in panetti da 100 g per le analisi reologiche.

### ***Proprietà reologiche***

Il grado di stickiness degli impasti è stato valutato a temperatura ambiente mediante TA-XT2 plus Texture Analyser (Stable Micro System Ltd., Godalming, UK) con sonda cilindrica (P/25P).

Con lo stesso strumento, ma sonda differente (SMS/Kieffer Dough and Gluten Extensibility Rig), è stata valutata l'estensibilità dei campioni. Il picco massimo raggiunto dal campione, sottoposto a trazione (resistenza all'estensione) e la distanza dal punto di rottura (estensibilità) sono stati determinati per 10 campioni di strisce d'impasto per ciascuna tesi.

Il test oscillatorio attraverso l'uso di un reometro (Anton Paar MCR 92, GmbH, Inc., Graz, Austria), con una sonda piatta (P50/P2), ha evidenziato il comportamento reologico dei campioni. Gli impasti (2 g) lasciati a temperatura ambiente per 10 minuti, sono stati posizionati tra il piatto e la sonda dello strumento. L'amplitude test (0.01-10%) è stato allestito a 20 °C e 1 Hz di frequenza. Le determinazioni del frequency sweep (0.1-10 Hz) sono state definite ad una tensione costante di  $\gamma$  0.1% della regione viscoelastica lineare. Sono stati determinati storage modulus ( $G'$ ) e loss modulus ( $G''$ ).

### ***Proprietà viscosimetriche***

Le proprietà di pasting sono state determinate mediante Rapid Visco Analyser (RV-4, Newport Scientific, Warriewood, Australia) con metodo AACC, 76-21 (AACC, 2000). Ogni misurazione su ciascun campione è stata eseguita in triplicato.

### ***Proprietà fermentative***

Ciascun campione (315 g) è stato analizzato mediante reofermentometro (Chopin, Paris, France) e sono stati rilevati i seguenti parametri: altezza massima dell'impasto (Hm, mm) e tempo al quale si sviluppa (T1); tempo massimo richiesto allo sviluppo di gas (T1); tempo in cui la maglia glutinica non trattiene i gas (Tx) e il volume di gas trattenuto a fine analisi (%). Ogni analisi è stata duplicata.

### ***Analisi microscopica degli impasti***

La microstruttura dei campioni è stata osservata a 20 kV Zeiss DSM 962, un microscopio elettronico a trasmissione (Oberkochen, Germany). Tutti i campioni sono stati precedentemente fissati in glutaraldeide al 2.5% tutta la notte, lavati con 0.1M Buffer fosfato (pH 7.4) e poi fissati con OsO<sub>4</sub> per un'ora e lavati con acqua distillata, deidratati con alcol etilico e ricoperti con uno strato d'oro, prima di essere completamente asciugati.

### ***Analisi statistica***

Software Minitab® 17.1.0 (Minitab, Inc.), analisi della varianza (ANOVA), con procedura LSD di test Fisher, test *t* ( $p < 0.05$ ).

## **Risultati e discussione**

### ***Adesività, elasticità e viscoelasticità degli impasti***

È stato osservato come TG e GG (0,5%) hanno indebolito l'estensibilità, al contrario di PG e XG (1%) che l'hanno migliorata. La viscosità è stata incrementata da tutti gli idrocolloidi, metilcellulosa e tara (0,5%) hanno mostrato valori superiori al controllo MOD (Tab. 1). Il comportamento elastico dell'impasto ha presentato un miglioramento alla presenza di idrocolloidi ad entrambe le percentuali (0.5% e 1%), eccetto per la MC (1%), con probabile effetto negativo sulla maglia glutinica (Fig. 1).

**Tabella 1.** Stickiness e Kieffer degli impasti.

\*I risultati sono espressi come la forza (N) media  $\pm$  dev standard ( $n = 6$ ). Nell'ultima colonna la resistenza all'estensione degli impasti (N) rappresentata come Kieffer media  $\pm$  dev. standard ( $n = 6$ ). A lettere diverse all'interno della stessa colonna corrispondono valori statisticamente differenti per  $p < 0.05$ .

<b>Sample</b>	<b>Hydrocolloid (%)</b>	<b>Stickiness (N)*</b>	<b>Resistance to extension (N)</b>
MOD	0.0	0.40 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.23 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
OLD	0.0	0.28 $\pm$ 0.01 <sup>f</sup>	0.12 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>
MC	0.5	0.58 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.10 $\pm$ 0.03 <sup>e</sup>
MC	1	0.37 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	0.12 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>
GG	0.5	0.36 $\pm$ 0.02 <sup>de</sup>	0.12 $\pm$ 0.04 <sup>cd</sup>
GG	1	0.29 $\pm$ 0.01 <sup>f</sup>	0.13 $\pm$ 0.01 <sup>cd</sup>
PG	0.5	0.29 $\pm$ 0.01 <sup>f</sup>	0.16 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
PG	1	0.36 $\pm$ 0.01 <sup>e</sup>	0.17 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
TG	0.5	0.46 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.09 $\pm$ 0.01 <sup>e</sup>
TG	1	0.40 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.09 $\pm$ 0.01 <sup>e</sup>
XG	0.5	0.35 $\pm$ 0.01 <sup>e</sup>	0.09 $\pm$ 0.00 <sup>e</sup>
XG	1	0.35 $\pm$ 0.02 <sup>e</sup>	0.14 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>

### ***Profilo di pasting***

L'aggiunta di idrocolloidi ha mostrato un aumento della viscosità. Il profilo di pasting del controllo OLD ha rivelato valori inferiori rispetto al campione controllo MOD. Tutti gli

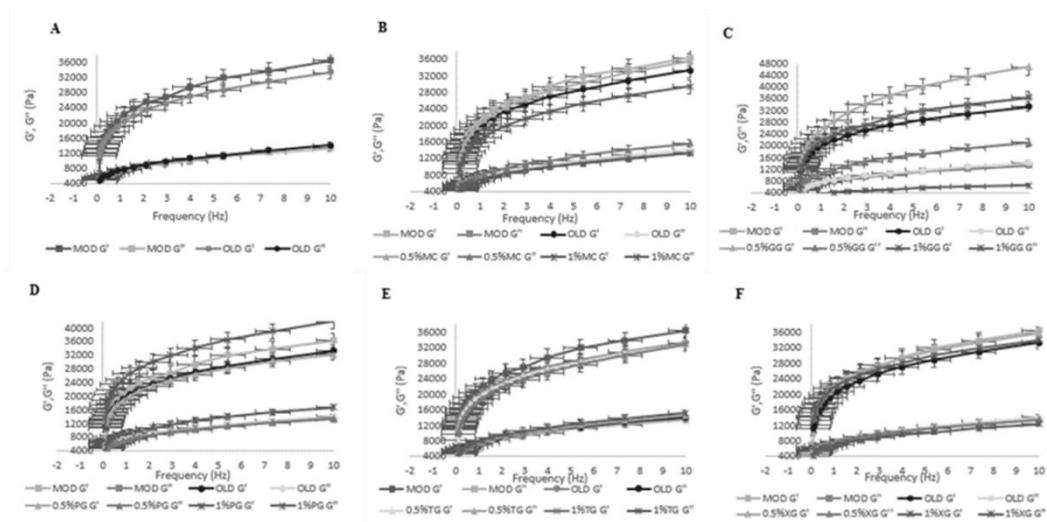
idrocolloidi, ad eccezione della metilcellulosa (0.5%), hanno implementato il profilo di pasting della miscela acqua e semola *Russello*, in particolare XG e GG all'1% (Fig. 2).

### Comportamento degli impasti durante il processo fermentativo

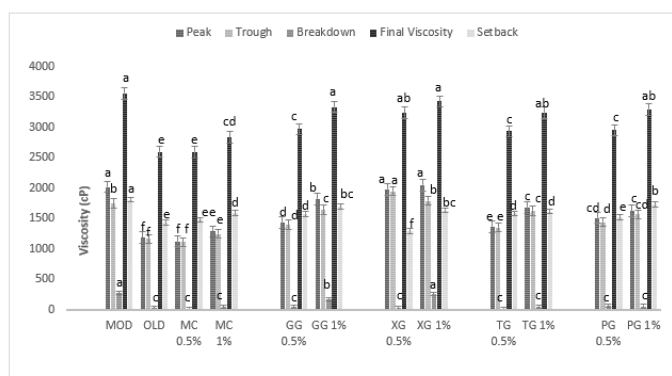
Tutti gli idrocolloidi ad eccezione della MC (0.5%) hanno mostrato un'attività di supporto per lo sviluppo della maglia glutinica in fase di lievitazione e hanno migliorato la capacità di ritenzione dei gas liberati durante la lievitazione in modo significativo.

### Caratteristiche microstrutturali degli impasti

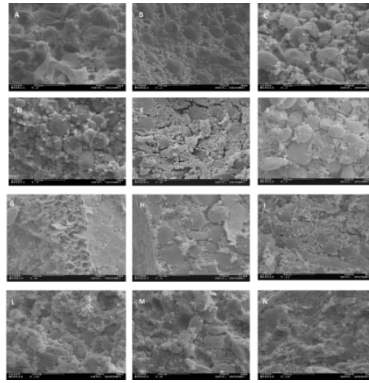
L'impiego di XG (Figura 3M e N) hanno migliorato la struttura glutinica nell'impasto *Russello*. Tutti gli idrocolloidi, eccetto MC, hanno mostrato una forte capacità legante, con ripercussioni sulle proprietà dell'amido sottoposto a rialzo di temperatura.



**Figura 1.** Parametri reologici ( $G'$  and  $G''$ ) degli impasti e frequency per i controlli MOD e OLD (A) e con idrocolloidi: MC (B); GG(C); PG(D); TG (E); XG (F).



**Figura 2.** Proprietà di pasting: picco di viscosità (peak); viscosità ad alte temperature (trough); differenza tra i due parametri precedenti (breakdown); viscosità finale e differenza tra viscosità finale e trough (setback). A lettere diverse all'interno dello stesso gruppo di barre corrispondono valori statisticamente differenti ( $p < 0.05$ ).



**Figura 3.** A) Controllo Moderna varietà; B) Controllo Russello; C - D) MC 0.5% e 1%; E - F) GG 0.5% e 1%; G - H) PG 0.5% e 1%; I - L) TG 0.5% e 1%; M - N) XG 0.5% e XG 1%.

### Ringraziamenti

*Questo lavoro è stato possibile grazie al contributo della Regione Autonoma della Sardegna FESR 2014/2020 – ASSE PRIORITARIO I “RICERCA SCIENTIFICA, SVILUPPO TECNOLOGICO E INNOVAZIONE”. Azione 1.1.4 Sostegno alle attività collaborative di R&S per lo sviluppo di nuove tecnologie sostenibili, di nuovi prodotti e servizi, progetto “AVIPROFO”.*

### Bibliografia

- AACC 2000. *American Association of Cereal Chemists, Approved Methods*, 11<sup>th</sup> ed. Method 76-21. St. Paul, MN.
- Cappelli A., Cini E., Guerrini L., Masella, P., Angeloni G., Parenti A. 2018. Predictive models of the rheological properties and optimal water content in doughs: An application to ancient grain flours with different degrees of refining. *Journal of Cereal Science*, 83: 229-235.
- Collar C., Conte P., Fadda C., Piga A. 2015. Gluten-free dough-making of specialty breads: Significance of blended starches, flours and additives on dough behaviour. *Food Science and Technology International*, 21(7): 523-536.
- Fadda C., Angioloni A., Piga A., Collar C. 2010a. Impact of sourdough, yeast and gluten on small and large deformation rheological profiles of durum wheat bread doughs. *European Food Research and Technology*, 231(3): 431-440.
- Fadda C., Santos E.M., Piga A., Collar C. 2010b. Innovative traditional Italian durum wheat breads: Influence of yeast and gluten on performance of sourdough Moddizzosu breads. *Cereal Chemistry*, 87(3): 204-213.
- ICC 1976-1996. *American Association of Cereal Chemists, Approved Methods*. Method 104-1, 105-2, 110-1, 115-1. Vienna: The Association, 136, 162, 166.
- Jafari M., Koocheki A., Milani E. 2018. Functional effects of xanthan gum on quality attributes and microstructure of extruded sorghum-wheat composite dough and bread. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 89:551-558.
- Kohajdová Z., Karovičová J. 2009. Application of hydrocolloids as baking improvers. *Chemical Papers*, 63(1): 26-38.
- Rosell C.M., Rojas J.A., De Barber C.B. 2001. Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality. *Food Hydrocolloids*, 15(1): 75-81.
- Shewry, P. R. 2018. Do ancient types of wheat have health benefits compared with modern bread wheat? *Journal of Cereal Science*, 79, 469-476.
- Shewry P.R., Hawkesford M.J., Piironen V., Lampi A.M., Gebruers K., Boros D., et al. 2013. Natural variation in grain composition of wheat and related cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(35): 8295-8303.
- Shewry P.R. 2009. Wheat. *Journal of Experimental Botany*, 60(6): 1537-1553.

## Effetto della temperatura sul tempo di cottura ottimale di spaghetti

M. Cibelli<sup>1</sup>, A. Cimini<sup>1</sup>, A. R. Taddei<sup>2</sup>, M. Moresi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento per l'Innovazione nei sistemi Biologici, Agroalimentari e Forestali, Università della Tuscia, Via San Camillo de Lellis, 01100 Viterbo (VT).

<sup>2</sup>Centro Grandi Attrezzature - Microscopia elettronica, Università della Tuscia, Via San Camillo de Lellis, 01100 Viterbo (VT).

\*E-mail: [mmoresi@unitus.it](mailto:mmoresi@unitus.it)

### Abstract

This study was aimed at assessing the cooking quality and carbon footprint of spaghetti cooked in a novel home eco-sustainable pasta cooker by varying the cooking water-to-pasta ratio and temperature from 10 to 2.7 L/kg and from 98 to 85 °C, respectively. The water uptake, cooking loss, textural properties, and thickness of the central nerve (as observed with a scanning electronic microscope) of cooked pasta were found to be practically constant. By operating the eco-sustainable pasta cooker at 2.7 L/kg and 85 °C, the energy consumption reduced to ~0.4 kWh kg<sup>-1</sup> and GHG emissions to 0.13 kg CO<sub>2</sub>/kg, about one sixth of those averagely emitted by the European home appliances.

### Riassunto

In questo studio si è valutata la qualità e l'impronta di carbonio di spaghetti cotti in un nuovo cuoci-pasta casalingo ecosostenibile, variando rispettivamente il rapporto acqua/pasta da 10 a 2,7 L/kg e la temperatura di cottura da 98 a 85 °C. La pasta così cotta presentava in pratica le stesse proprietà (assorbimento d'acqua, *cooking loss*, consistenza e spessore del nervo centrale come osservato con un microscopio elettronico a scansione). La cottura con 2,7 L di acqua/kg a 85 °C con detto cuoci-pasta ha ridotto il consumo di energia a 0,40 kWh/kg e le emissioni di gas-serra a 0,13 kg CO<sub>2</sub>/kg, pari a circa un sesto di quelle emesse dai fornelli mediamente utilizzati nella Comunità Europea.

### Introduzione

La cottura della pasta è un processo ad alta intensità energetica, in quanto per cuocere 1 kg di pasta secca sono necessari circa 10 L di acqua e 1,8 kWh per far bollire l'acqua più 0,05 kWh per ogni minuto di cottura (UNAFPA, 2018). Generalmente, la pasta viene cotta in acqua che bolle alla pressione atmosferica locale in una pentola senza coperchio per poterla rimescolare più volte sì da favorirne una cottura uniforme senza agglomerati o zone parzialmente cotte.

L'impronta di carbonio della pasta secca dalla culla ai centri di distribuzione ammonta a circa 1,33 kg CO<sub>2</sub>/kg (Barilla, 2017), mentre quella della cottura casalinga della pasta (CF<sub>PC</sub>) a 0,79 kg CO<sub>2</sub>/kg secondo lo scenario europeo medio (UNAFPA, 2018). Le emissioni di gas serra (GHG) associate a quest'ultima fase sono spesso ritenute superiori a quelle relative alla coltivazione del grano duro (Barilla, 2017), il che giustifica l'interesse a minimizzare l'impatto ambientale della cottura della pasta.

Avendo in precedenza valutato l'effetto del rapporto acqua/pasta sulla qualità di cottura della pasta sia lunga (Cimini *et al.*, 2019ac) che corta (Cimini *et al.*, 2019b) e sviluppato un nuovo cuoci-pasta eco-sostenibile, gestito da una piattaforma *open source* (Arduino<sup>®</sup>) a basso costo (Cimini *et al.*, 2020) tramite cellulare e tale da regolare la temperatura di cottura della pasta con una precisione di ±0,5 °C, in questo lavoro si è utilizzato detto cuoci-pasta per rilevare il consumo di energia e l'impronta di carbonio a temperature di cottura inferiori al punto di ebollizione dell'acqua.



## Materiali e metodi

Si è utilizzata una pasta lunga (*spaghetti*) a base di semola di grano duro *Armando*, gentilmente fornita da De Matteis Agroalimentare Spa (Flumeri, AV), avente umidità e tenore proteico (Nx6,25) pari, rispettivamente, a 125 e 135 g kg<sup>-1</sup>. Per la cottura si è utilizzato il prototipo illustrato in Fig. 1a,b, realizzato assemblando (1) un fornello ad induzione Melchioni Indu; (2) un agitatore azionato da un motoriduttore (Mod. 4632-370) fissato al coperchio della pentola ed alimentato dal fornello a 12 V; (3) un microprocessore Arduino®; (4) un termometro digitale 1-WIRE-DS18B20, alloggiato entro un pozzetto in acciaio inox saldato al coperchio e profondo fino a circa 5 mm dal fondo della pentola; (5) un sensore di intensità di corrente SCT 013-020 per stimare la potenza erogata dal fornello. Un'applicazione *open source* utilizzabile su qualsiasi smartphone (Fig. 1c) con sistema Android tramite piattaforma HMI consentiva la gestione del processo di cottura; l'accensione/spengimento del fornello; l'impostazione del tempo di cottura della pasta e dei tempi di funzionamento dell'agitatore; il monitoraggio e la registrazione della temperatura dell'acqua di cottura [in °C], del consumo energetico [in Wh], della potenza istantaneamente assorbita [in W], della corrente erogata [in A] e della quantità di CO<sub>2</sub> equivalente emessa [in g CO<sub>2e</sub>] (Fig. 1c). La comunicazione tra smartphone e la piastra ad induzione avveniva tramite Bluetooth con modulo HC-05. Il rapporto acqua di cottura/pasta (WPR) è stato variato fra il valore convenzionale (10 L/kg) e quello minimo (2,7 L/kg) stimato come indicato da Cimini *et al.* (2019b).

La qualità della pasta cotta è stata determinata, valutando: il tempo di cottura ottimale (OCT), ossia il tempo a cui è ancora visibile una linea bianca centrale tratteggiata (ISO, 2016); l'acqua assorbita dalla pasta cotta (WU) e la quantità di solidi dispersi nell'acqua di cottura (*cooking loss*, CL: D'Egidio *et al.*, 1990) per unità di pasta secca; la consistenza della pasta cotta sottoposta a 2 cicli consecutivi di compressione al 30 ed al 90% dello spessore medio del campione tramite l'Universal Testing Machine UTM mod. 3342 (Instron Int. Ltd., High Wycombe, UK), come descritto da Cimini *et al.* (2019abc).

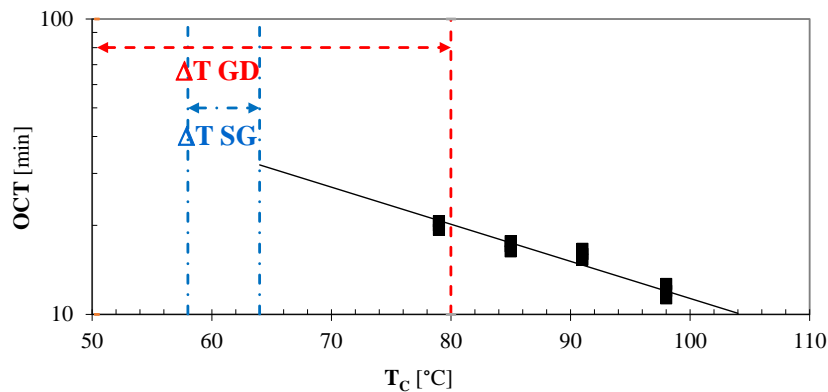


**Figura 1.** Immagini del cuocitore ecosostenibile all'inizio (a) ed alla fine (b) della fase di cottura della pasta con il coperchio della pentola chiuso e aperto, insieme all'applicazione installata su smartphone con i tasti funzione che monitorano la cottura della pasta (c).

## Risultati e discussione

### *Effetto della temperatura di cottura sul tempo ottimale di cottura*

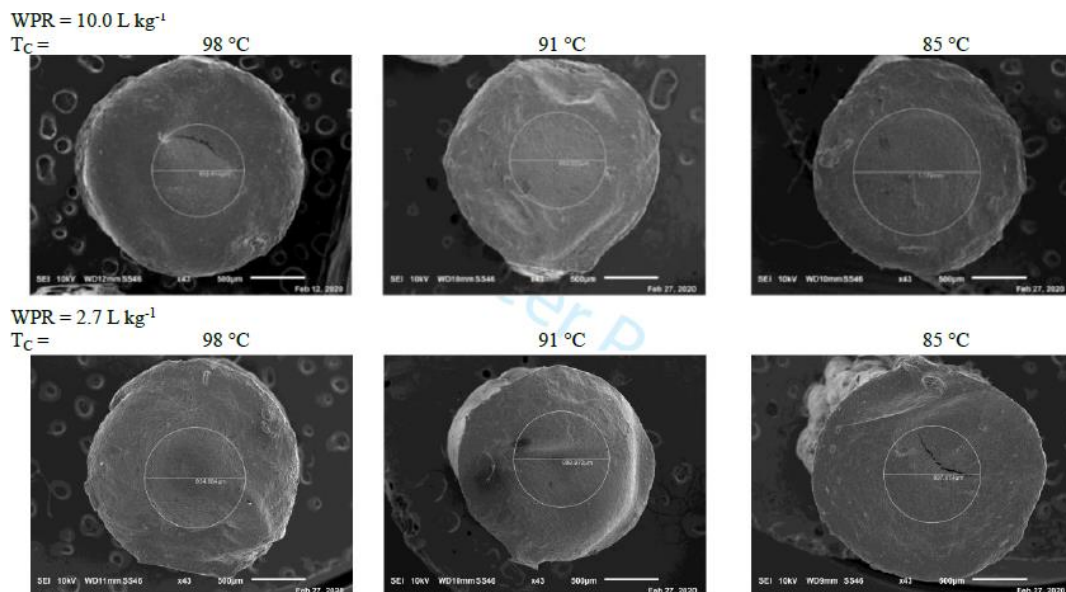
Per entrambi i rapporti acqua/pasta, al ridursi di  $T_C$  da 98 a 79 °C il tempo ottimale di cottura (OCT) degli spaghetti aumentava da 12 a 20 min (Fig. 2). Detto tempo è stato ricostruito con il modello di Bigelow *et al.* (1920), ricavando che l'incremento di temperatura ( $z$ ) necessario per ridurre l'OCT di un fattore 10 rispetto a quello della temperatura di riferimento era pari a  $80 \pm 4$  °C ( $r^2 = 0,96$ ).



**Figura 2.** Effetto della temperatura di cottura ( $T_C$ ) sul tempo di cottura ottimale (OCT) di spaghetti (■). La linea continua è stata calcolata con l'equazione di Bigelow, mentre le linee tratteggiate verticali indicano le temperature iniziali e finali della gelatinizzazione dell'amido di frumento (SG) e della denaturazione del glutine (GD).

### *Struttura SEM degli spaghetti cotti*

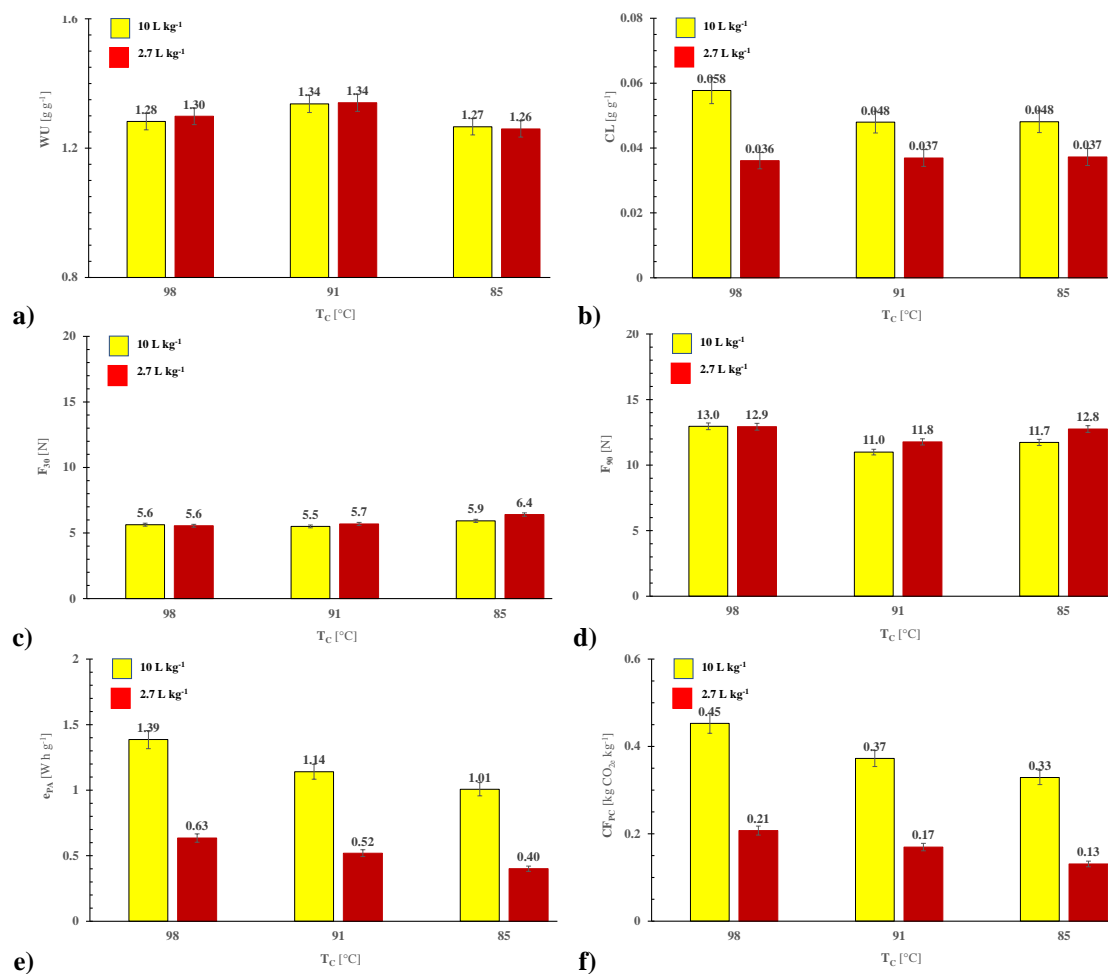
In Figura 3 si mostrano le immagini ottenute con il microscopio elettronico a scansione (SEM) di sezioni trasversali di spaghetti cotti, ove lo spessore del nervo centrale è evidenziato da linee continue. Il diametro del nervo centrale degli spaghetti cotti a 98, 91 o 85 °C con WPR pari a 10 o 2,7 L/kg presentava in pratica lo stesso valore medio ( $884 \pm 27$  μm contro  $920 \pm 34$  μm) indipendentemente dal valore di  $T_C$ .



**Figura 3.** Micrografie SEM di sezioni trasversali di spaghetti cotti a diversi valori di WPR e  $T_C$  per i tempi di cottura ottimali (OCT) riportati in Fig. 2, dove lo spessore del nervo centrale è stato approssimativamente evidenziato da linee continue.

### Qualità della pasta cotta

In Figura 4 si riporta l'effetto della temperatura di cottura e del rapporto WPR sui principali parametri caratteristici della qualità della pasta cotta. In particolare, l'assorbimento specifico di acqua WU risultava indipendente da WPR e da  $T_C$  al livello di confidenza del 95 % (Fig. 4a) ed era in linea con i valori tipici della pasta di buona qualità (Pasqualone *et al.*, 2016). Al contrario, il *cooking loss* (CL) si riduceva al diminuire soprattutto di WPR e poi di  $T_C$  (Fig. 4b). Non si sono riscontrate differenze statisticamente significative nella consistenza della pasta cotta durante sia il primo ciclo (Fig. 4c) che il secondo ciclo (Fig. 4d) di compressione.



**Figura 4.** Effetto di WPR e  $T_C$  sui parametri caratteristici della qualità della pasta cotta: a) assorbimento d'acqua, WU; b) *cooking loss*, CL; consistenza della pasta cotta ad una compressione del 30 ( $F_{30}$ : c) e del 90 ( $F_{90}$ : d) %; e) consumo specifico di energia ( $e_{PA}$ ); (f) impronta del carbonio ( $CF_{PC}$ ).

Al ridursi di WPR da 10 a 2,7 L/kg, il consumo specifico di energia ( $e_{PA}$ ) a 98 °C diminuiva del 54% circa, ossia da 1,39 a 0,63 Wh/g (Fig. 4e). Abbassando  $T_C$  da 98 a 85 °C, l'energia consumata si contraeva ulteriormente del 27% nella condizione standard (WPR=10 L/kg) e del 17% per WPR=2,7 L/kg. I risparmi energetici derivanti dalla riduzione di WPR erano molto più rilevanti di quelli derivanti dall'abbassamento di  $T_C$ . Infine, l'impronta del carbonio relativa alla cottura di 1 kg di pasta ( $CF_{PC}$ ) è stata stimata come specificato dalle *Category Rules* per la pasta secca (UNAFPA, 2018), moltiplicando il consumo di energia per il potenziale di riscaldamento globale a 100 anni riferito alla produzione termo-elettrica italiana da risorse rinnovabili e non (0,3077 kg CO<sub>2e</sub>/kWh) ed alle perdite medie (5,8%) della rete nel 2017 (ISPRA, 2019). Al ridursi di WPR da 10 a 2,7 L/kg,  $CF_{PC}$  diminuiva da 0,45 a 0,21 kg CO<sub>2e</sub>/kg

(Fig. 4f). Effettuando la cottura della pasta a 85 °C, è stato possibile ridurre ulteriormente le emissioni di GHG a 0,13 kg CO<sub>2e</sub>/kg. In tal modo, si potrebbero risparmiare 0,66 kg di CO<sub>2e</sub> rispetto al carbon footprint medio europeo (0,79 kg CO<sub>2e</sub> kg<sup>-1</sup>) della cottura domestica della pasta.

### Conclusioni

Per minimizzare l'impatto ambientale della cottura casalinga della pasta occorrerebbe sostituire i sistemi di cottura a gas od elettrici di uso corrente con sistemi a maggiore efficienza energetica, come il cuoci-pasta ecosostenibile qui utilizzato, in grado di controllare in modo preciso il processo e la temperatura di cottura, minimizzare i consumi di acqua e di energia e, soprattutto, garantire la stessa qualità chimico-fisica della pasta cotta in condizioni convenzionali.

Analogamente a quanto già attuato dall'industria del caffè, anche l'industria della pasta dovrebbe iniziare a commercializzare la pasta secca insieme al proprio sistema di cottura *smart*, onde garantirne la cottura in modo molto riproducibile e rapido, anche se utilizzato da cuochi improvvisati. Effettuando la cottura con 2,7 L di acqua per kg di pasta a 85 °C, è stato possibile ridurre il consumo specifico di energia dal valore tipico di 2,8 kWh/kg a circa 0,4 kWh/kg e le emissioni complessive di GHG da circa 0,79 kg CO<sub>2e</sub>/kg tipiche dei fornelli mediamente in uso nella Comunità Europea a 0,13 kg CO<sub>2e</sub>/kg con un tempo complessivo di cottura leggermente ridotto da 21,5 a 20,5 min.

### Ringraziamenti

Questo lavoro è stato effettuato nell'ambito del progetto di ricerca PRIN 2015 - prot. 2015MFP4RC\_002.

### Bibliografia

- Barilla 2017. *EPD217 Barilla durum wheat semolina pasta in paperboard box*. <<https://edgeenvironment.com/wp-content/uploads/2016/11/epd217-Durum-wheat-semoline-dried-pasta.pdf>>.
- Bigelow W.D., Bohart G.S., Richardson A.C., Ball C.O. 1920. Heat penetration in processing canned foods. *Bulletin no. 16L*. National Canners Association, Research Laboratories, Washington, D.C.
- Cimini A., Cibelli M., Messia M.C., Marconi E., Moresi M. 2019a. Cooking quality of commercial spaghetti: Effect of the water-to-dried pasta ratio. *European Food Research and Technology*, 245(5): 1037-1045.
- Cimini A., Cibelli M., Messia M.C., Moresi M. 2019b. Commercial short-cut extruded pasta: Cooking quality and carbon footprint vs. water-to-pasta ratio. *Food and Bioproducts Processing*, 116: 150-159.
- Cimini A., Cibelli M., Moresi M. 2019c. Reducing the cooking water-to-dried pasta ratio and environmental impact of pasta cooking. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99: 1258-1266.
- Cimini A., Cibelli M., Moresi M. 2020. Development and assessment of a home eco-sustainable pasta cooker. *Food and Bioproducts Processing*, 122: 291-302.
- Cimini A., Cibelli M., Moresi M. 2021. Effect of cooking temperature on cooked pasta quality and sustainability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101: 4946-4958.
- D'Egidio M.G., Mariani B.M., Nardi S., Novaro P., Cubadda R. 1990. Chemical and technological variables and their relationships: a predictive equation for pasta cooking quality. *Cereal Chemistry*, 67: 275-281.
- ISO 2016. *Durum wheat semolina and alimentary pasta - Estimation of cooking quality of alimentary pasta by sensory analysis - Part 1: Reference method. ISO n. 7304-1*. Vernier, Geneva, CH: International Organization for Standardization.
- ISPRA 2019. *Italian greenhouse gas inventory 1990-2017: National Inventory Report 2019*. ISPRA Rapporti 307, Rome, Italy. <[http://www.sinanet.isprambiente.it/it/sia-ispra/serie-storiche-emissioni/national-inventory-report/at\\_download/file](http://www.sinanet.isprambiente.it/it/sia-ispra/serie-storiche-emissioni/national-inventory-report/at_download/file)>.
- Pasqualone A., Gambacorta G., Summo C., Caponio F., Di Miceli G., Flagella Z., Marrese P.P., Piro G., Perrotta C., De Bellis L., Lenucci M.S. 2016. Functional, textural and sensory properties of dry pasta supplemented with lyophilized tomato matrix or with durum wheat bran extracts produced by supercritical carbon dioxide or ultrasound. *Food Chemistry*, 213, 545-553.
- UNAFPA (Unions de Associations de Fabricants de Pâtes Alimentaires) 2018. *Product Environmental Footprint category rules (PEFCR) for dry pasta*. Vers. 3. <[http://ec.europa.eu/environment/eussd/smgp/pdf/Dry%20pasta%20PEFCR\\_final.pdf](http://ec.europa.eu/environment/eussd/smgp/pdf/Dry%20pasta%20PEFCR_final.pdf)>.

## Profilo ambientale della pasta di semola di grano duro convenzionale e biologico

M. Cibelli, A. Cimini, M. Moresi\*

DIBAF, Università della Tuscia, Via San Camillo de Lellis, 01100 Viterbo (VT).

\*E-mail: [mmoresi@unitus.it](mailto:mmoresi@unitus.it)

### Abstract

In this work, the cradle-to-grave environmental profiles of organic and conventional durum wheat semolina pasta were compared using the well-known life-cycle assessment SimaPro 9.0.0.41 software in compliance with the *Product Environmental Footprint* (PEF) standard method. Both products were produced from Italian durum wheat semolina in medium-sized pasta factories and packaged in 0.5 kg polypropylene bags. Due to the lower yield of organic wheat per hectare, the environmental profile of organic pasta was characterized by a weighted eco-indicator (EIP) equal to 195  $\mu\text{Pt}/\text{kg}$ , 39% more than that of conventional pasta ( $\sim 141 \mu\text{Pt}/\text{kg}$ ). Both EIP values were influenced first by the field phase (57% vs. 45%) and then by the pasta cooking one (23% vs. 30%). Only by cultivating organic durum wheat in specific areas of Northern Italy with yields around 7.5 Mg/ha, the environmental profile of organic pasta would approximate that of conventional pasta and EIP would reduce to  $\sim 140 \mu\text{Pt}/\text{kg}$ .

### Riassunto

In questo studio, si sono confrontati i profili ambientali, dalla culla alla tomba, della pasta di semola di grano duro nazionale biologico o convenzionale, utilizzando il ben noto software SimaPro 9.0.0.41 in conformità con la metodologia *Product Environmental Footprint* (PEF). Entrambe le paste erano prodotte in pastifici di medie dimensioni e confezionati in sacchetti di polipropilene da 0,5 kg. Per la minore resa in grano biologico per ettaro, l'eco-indicatore ponderato (EIP) della pasta biologica era pari a 195  $\mu\text{Pt}$ , il 39% in più rispetto a quello della pasta convenzionale ( $\sim 141 \mu\text{Pt}$ ). Per entrambi gli indicatori era preponderante l'impatto della fase campo (57% vs. 45%) seguito da quello della fase di cottura (23% vs. 30%). Solo coltivando il grano duro biologico in specifiche aree del Nord Italia con rese intorno a 7,5 Mg/ha, il profilo ambientale della pasta biologica approssimerebbe quello della pasta convenzionale con un EIP pari a  $\sim 140 \mu\text{Pt}/\text{kg}$ .

### Introduzione

Il ciclo di vita, dal campo ai centri di distribuzione, della pasta di semola di grano duro di diversi produttori nazionali (Barilla, De Cecco, etc.) è stato oggetto di numerose Dichiarazioni Ambientali di Prodotto (EPD<sup>®</sup>), ove le categorie di impatto ambientale inerenti al riscaldamento globale, all'acidificazione, all'eutrofizzazione ed alla formazione di smog fotochimico presentano ampi intervalli di variazione, rispettivamente da 0,57 a 1,72 kg CO<sub>2e</sub>, da 4,4 a 31,3 g SO<sub>2e</sub>, da 2,2 a 9,4 g PO<sub>4e</sub><sup>3-</sup>, e da 0,1 a 0,9 g C<sub>2</sub>H<sub>2e</sub> per kg di pasta secca, probabilmente per le diverse banche dati, tecniche agronomiche, condizioni di lavorazione e/o logistiche di distribuzione (Cimini *et al.*, 2021).

L'impatto ambientale dalla culla alla tomba di 1 kg di pasta secca di semola di grano duro convenzionale, prodotta in un pastificio di medie dimensioni del Veneto e confezionata in sacchetti di polipropilene (PP) da 0,5 kg, è stato studiato utilizzando un noto software di valutazione del ciclo di vita (LCA) in conformità con i principali metodi standard in uso (Cimini *et al.*, 2021). Precedentemente, per una pasta secca di semola di grano duro biologico prodotta in un pastificio di medie dimensioni della Campania e parimenti confezionata si erano studiati sia l'impronta del carbonio (Cimini *et al.*, 2019) che il profilo ambientale (Cibelli, 2019), dalla

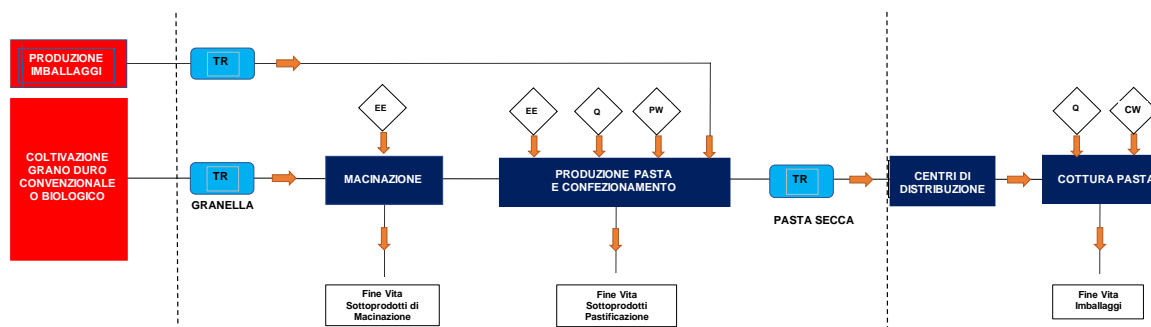


culla alla tomba, in conformità rispettivamente con le metodologie PAS 2050 (BSI, 2008) ed IMPACT 2002<sup>+</sup> (Jolliet *et al.*, 2003). Recchia *et al.* (2019) hanno confrontato la sostenibilità ambientale di filiere di produzione di pasta sia locale che globale e hanno riscontrato che la filiera della pasta convenzionale prevaleva per uno sfruttamento più efficiente del suolo e delle risorse idriche. Infine, Zingale *et al.* (2022) hanno studiato l’impatto dal campo ai centri di distribuzione di una pasta di semola integrale di grano duro biologico siciliano con il metodo EPD<sup>®</sup> (2018), la cui resa in granella era intorno a 2 Mg/ha.

In questo lavoro si è confrontato il profilo ambientale della pasta di semola di grano duro convenzionale o biologico con riferimento al nuovo metodo standard della Comunità Europea (*Product Environmental Footprint*, PEF: EC, 2018) ed alle relative *category rules* per la pasta secca (UNAFPA, 2018) al fine di evidenziare le fasi del ciclo vita più impattanti e suggerire alcune potenziali azioni di mitigazione.

## Metodologia

Per valutare l’impatto ambientale dalla culla alla tomba della pasta secca si è eseguito uno studio del tipo *business-to-consumer* in conformità con le norme ISO 14040 (ISO, 2006a) e 14044 (ISO, 2006b), includendo le seguenti fasi (Fig. 1): coltivazione del grano duro (FP), produzione dei materiali di imballaggio (PPM) e della semola di grano duro (MI), pastificazione (PPR), confezionamento della pasta secca (PPACK); smaltimento dei rifiuti e dei sottoprodotti di macinazione e pastificazione; trasporto fino ai centri di distribuzione; fase d’uso (PC) e fase di smaltimento dei residui post-consumo (EoLPM).



**Figura 1.** Diagramma di flusso del ciclo di vita business-to-consumer di pasta di semola di grano duro convenzionale o biologico: EE, energia elettrica; PW, acqua di processo; Q, energia termica; TR, trasporto.

L’unità funzionale era rappresentata da 1 kg di pasta di semola di grano duro (convenzionale o biologico) in sacchetti da 0,5 kg in PP. I dati primari (consumi di grano duro, energia elettrica e termica e materiali di imballaggio; logistica di approvvigionamento dei materiali in ingresso e distribuzione del prodotto finito) sono stati desunti da Sgambaro (2014) per il grano duro convenzionale o da Cimini *et al.* (2019) per quello biologico. I solidi scartati durante il processo di produzione sono stati separati e riciclati. I dati secondari sono stati estratti da banche dati (Agri-footprint v. 4.0, Ecoinvent v. 3.5) incorporate nel software LCA SimaPro 9.0.0.41 (PRé Consultants, Amersfoort, NL). La superficie coltivata a grano duro convenzionale era utilizzata al 100%, mentre per il grano biologico se ne utilizzava a rotazione il 70%, in quanto il restante 30% era concimato con pollina disidratata e coltivato a leguminose, che venivano trinciate ed interrate per restituire azoto al terreno. Le emissioni dai suoli fertilizzati sono state calcolate secondo EPD<sup>®</sup> (2013) e IPCC (2006), mentre i fattori di allocazione per la granella, la paglia e le radici, la semola e i sottoprodotti di molitura e la pasta secca e cotta scartata sono stati stimati in accordo con UNAFPA (2018). Dalla macinazione di 1 kg di grano biologico o convenzionale sono stati recuperati 0,71 o 0,73 kg di semola. I confezionamenti primario, secondario e

terziario della pasta secca erano costituiti in sequenza da sacchetti in PP, da cartoni etichettati e da pallet in legno EPAL serrati con film termo-retraibile in polietilene. Il fabbisogno energetico e idrico per la cottura della pasta è stato assunto pari a 2,3 kWh e 10 L per kg di pasta (UNAFPA, 2018). I rifiuti post-consumo sono stati smaltiti secondo gli scenari di gestione dei rifiuti italiani (Cimini *et al.*, 2019).

L'impatto ambientale è stato valutato in conformità con il metodo PEF (EC, 2018), che descrive il profilo ambientale del prodotto in base a 16 categorie di impatto, le cui entità sono state poi normalizzate rispetto ai loro impatti globali (Sala *et al.*, 2017) ed infine ponderate (Sala *et al.*, 2018) per pervenire ad un eco-indicatore complessivo pesato (EIP), nel quale si è trascurato il contributo delle categorie di impatto relative alla tossicità per l'essere umano e gli ecosistemi per la scarsa robustezza dei relativi modelli di valutazione (UNAFPA, 2018).

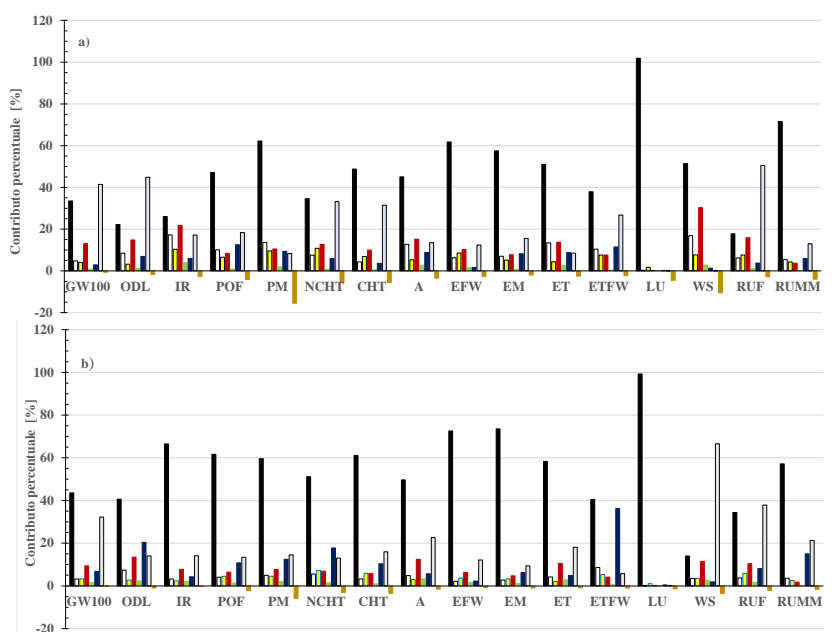
**Tabella 1.** Caratterizzazione del profilo ambientale PEF di un'unità funzionale (1 kg) di pasta di semola di grano duro convenzionale (PAC: Cimini *et al.*, 2021) e biologico coltivato in rotazione colturale in Italia meridionale (PAB-M) o settentrionale (PAB-S): valore delle categorie di impatto intermedio con relativo acronimo ed eco-indicatore ponderato (EIP).

<b>Categoria di impatto</b>		<b>PAC</b>	<b>PAB-M</b>	<b>PAB-S</b>	<b>UdM</b>
Riscaldamento globale	GW <sub>100</sub>	1,88	2,05	1,63	kg CO <sub>2e</sub>
Assottigliamento strato ozono stratosferico	ODL	1,74x10 <sup>-7</sup>	1,58x10 <sup>-7</sup>	1,26x10 <sup>-7</sup>	kg CFC-11 <sub>e</sub>
Radiazione ionizzante- salute umana	IR	7,05x10 <sup>-2</sup>	2,51x10 <sup>-1</sup>	1,68x10 <sup>-1</sup>	kBq <sup>235</sup> U <sub>e</sub>
Formazione smog fotochimico- salute umana	POF	4,07 x10 <sup>-3</sup>	5,26x10 <sup>-3</sup>	3,64 x10 <sup>-3</sup>	kg NMVOC <sub>e</sub>
Particolato	PM	5,00 x10 <sup>-8</sup>	8,59x10 <sup>-8</sup>	6,03 x10 <sup>-8</sup>	disease inc.
Tossicità umana - non cancerogena	NCHT	1,16x10 <sup>-7</sup>	1,27x10 <sup>-7</sup>	0,94x10 <sup>-7</sup>	CTU <sub>h</sub>
Tossicità umana - cancerogena	CHT	1,08x10 <sup>-8</sup>	1,12x10 <sup>-8</sup>	0,78x10 <sup>-8</sup>	CTU <sub>h</sub>
Acidificazione	A	6,64x10 <sup>-3</sup>	1,02x10 <sup>-2</sup>	7,64x10 <sup>-3</sup>	mol H <sup>+</sup> <sub>e</sub>
Eutrofizzazione acqua dolce	EFW	3,01x10 <sup>-4</sup>	5,51x10 <sup>-4</sup>	3,51x10 <sup>-4</sup>	kg P <sub>e</sub>
Eutrofizzazione marina	EM	2,08x10 <sup>-3</sup>	2,62x10 <sup>-3</sup>	1,66x10 <sup>-3</sup>	kg N <sub>e</sub>
Eutrofizzazione terrestre.	ET	2,16x10 <sup>-2</sup>	3,68x10 <sup>-2</sup>	2,61x10 <sup>-2</sup>	mol N <sub>e</sub>
Ecotossicità acqua dolce	ETFW	9,26x10 <sup>-1</sup>	1,04	8,30x10 <sup>-1</sup>	CTU <sub>e</sub>
Uso del suolo	LU	296	619	312	Pt
Scarsità d'acqua	WS	4,23x10 <sup>-1</sup>	8,32x10 <sup>-1</sup>	7,74x10 <sup>-1</sup>	m <sup>3</sup> depriv.
Uso delle risorse fossili	RUF	21,9	26,7	22,1	MJ
Uso delle risorse minerali e metalli	RUMM	2,16x10 <sup>-6</sup>	2,99 x10 <sup>-6</sup>	2,13x10 <sup>-6</sup>	kg Sb <sub>e</sub>
<i>Eco-indicatore PEF</i>	<i>EIP</i>	<i>141</i>	<i>195</i>	<i>140</i>	<i>μPt</i>

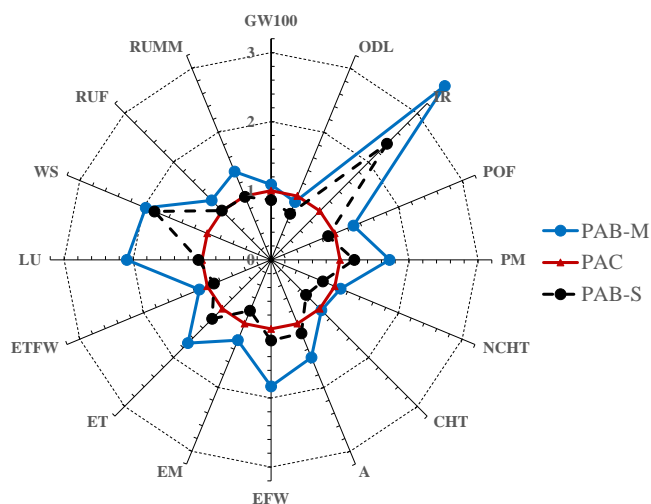
## Risultati

In Tabella 1 sono riportate le categorie di impatto intermedio per un'unità funzionale di pasta convenzionale (PAC: Cimini *et al.*, 2021) o biologica (PAB-M). In particolare, il carbon footprint (2,05 kg CO<sub>2e</sub>), l'uso del suolo (619 Pt), di combustibili fossili (26,7 MJ) e di minerali e metalli (~3 mg Sb<sub>e</sub>) di un kg di pasta biologica erano maggiori dei corrispondenti della pasta convenzionale (1,88 kg CO<sub>2e</sub>, 296 Pt, 21,9 MJ e 2,2 mg Sb<sub>e</sub>).

In Figura 2 si raffrontano i contributi percentuali delle diverse fasi del ciclo di vita della pasta di semola di grano duro convenzionale e biologico per le 16 categorie di impatto del metodo standard PEF. Per la fase campo prevalgono gli impatti dovuti all'uso del suolo, all'eutrofizzazione (marina, d'acqua dolce e terrestre) ed al particolato, mentre per la fase d'uso predominano il consumo di risorse fossili ed il cambiamento climatico. Dall'aggregazione delle 16 categorie d'impatto intermedio si ricava l'eco-indicatore ponderato (EIP) riportato in Tabella 1, che per la pasta biologica ammonta a 195 μPt, il 39% in più rispetto all'EIP della pasta convenzionale (~141 μPt). Anche detti EIP sono influenzati *in primis* dalla fase agricola (57% contro 45%) e *in secundis* dalla cottura della pasta (23% contro 30%). Pertanto, qualsiasi opzione di mitigazione dovrebbe mirare a ridurre il contributo della fase campo e poi quello della fase d'uso.



**Figura 2.** Contributi percentuali delle diverse fasi (FP, ■; MI, □; PMP, □; PPR, ■; PPACK, ■; PDISTR, ■; PC, ■; EoLPM, ■) del ciclo di vita della pasta di semola di grano duro convenzionale (a) o biologica (b) sulle categorie di impatto (v. acronimi in Tabella 1) del metodo standard PEF.



**Figura 3.** Diagramma radar del profilo ambientale business-to-consumer di pasta di semola di grano duro biologico coltivato nel Sud (PAB-M) o Nord (PAB-S) Italia riferito a quello della pasta di semola convenzionale (PAC). Per gli acronimi delle 16 categorie di impatto si rinvia alla Tabella 1.

## Discussione dei risultati e conclusioni

Diversi studi hanno dimostrato che la coltivazione biologica del grano duro provoca minori emissioni di gas serra per ettaro della coltivazione convenzionale. Purtroppo, la minore produttività richiede un maggior uso di terreno agrario. È noto che l'impronta di carbonio del grano duro varia significativamente con il sistema di rotazione culturale utilizzato (Gan *et al.*, 2011), come peraltro riscontrato da Ruini *et al.* (2013) in esperimenti culturali a rotazione con foraggiere, con rese in granella dell'ordine di 7,5 Mg/ha nel Nord Italia e di 4,2-5,0 Mg/ha nel



Sud Italia e con l'uso di 1 ha ogni due anni. Per contro, la coltivazione biologica qui considerata occupava 1,4 ha ogni biennio ed era quindi più produttiva di quella già citata nel Sud Italia. Per mitigarne ulteriormente l'impatto ambientale si potrebbe ipotizzare di effettuare la coltivazione biologica del grano duro nelle stesse aree del Nord Italia saggiate da Ruini *et al.* (2013) sì da incrementarne la resa da ~3,75 a 7,5 Mg/ha. In queste condizioni, il profilo ambientale della pasta biologica approssimerebbe quello della pasta convenzionale (Fig. 3) con un eco-indicatore ponderatore pari a 140  $\mu$ Pt/kg (Tabella 1). Infine, l'impatto ambientale della fase d'uso di entrambi i prodotti potrebbe essere nettamente ridotto ricorrendo, ad es., al nuovo cuoci-pasta ecosostenibile controllato da un microprocessore Arduino® in modo da ridurre il rapporto acqua/pasta a 3 $\pm$ 1 L/kg ed il consumo di elettricità a 0,6 $\pm$ 0,1 kWh/kg (Cimini *et al.* 2020).

## Ringraziamenti

Lavoro eseguito con contributo MIUR (Progetto PRIN 2015 - prot. 2015MFP4RC\_002).

## Bibliografia

- BSI 2011. *PAS 2050: 2011. Specification for the assessment of the life cycle greenhouse gas emissions of goods and services*, British Standards Institution, London, UK.
- Cibelli M. 2019. *Cradle-to-grave environmental profile of organic dry pasta: Assessment and mitigation measures*. PhD thesis, University of Tuscia, Viterbo, Italy.
- Cimini A., Cibelli M., Moresi M. 2019. Cradle-to-grave carbon footprint of dried organic pasta: assessment and potential mitigation measures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99: 5303-5318.
- Cimini A., Cibelli M., Moresi M. 2020. Development and assessment of a home eco-sustainable pasta cooker. *Food and Bioproducts Processing*, 122: 291-302.
- Cimini A., Cibelli M., Moresi M. 2021. Environmental impact of pasta. In Galanakis C. (Ed.) *Environmental Impact of Agro-Food Industry and Food Consumption*. Chp. 5. Academic Press, London, pp. 101-127.
- EC 2018. *Product Environmental Footprint category rules guidance*, Vers. 6.3.
- EPD® 2013. *Arable crops*, Product category classification: UN CPC 011, 014, 017, 019, Vers. 2.0.
- EPD® 2018. *Impact Indicators*. <<https://www.environdec.com/resources/indicators>>.
- Gan Y., Liang C., Wang X., McConkey B. 2011. Lowering carbon footprint of durum wheat by diversifying cropping systems. *Field Crops Research*, 122: 199-206.
- IPCC 2006. N<sub>2</sub>O emissions from managed soils, and CO<sub>2</sub> emissions from lime and urea application, Chp. 11. In Eggleston H.S., Buendia L., Miwa K., Ngara T., Tanabe K. (Ed.s), *2006 IPCC guidelines for national greenhouse gas inventories*, Vol. 4. *Agriculture, Forestry and Other Land Use*. IGES, Kanagawa Japan.
- ISO 2006a. *14040-Environmental Management - Life Cycle Assessment - Principles and Framework*. International Organization for Standardization, Genève, CH.
- ISO 2006b. *14044-Environmental Management - Life Cycle Assessment - Requirements and Guidelines*. International Organization for Standardization, Genève, CH.
- Jolliet O., Margni M., Charles R., Humbert S., Payet J., Rebitzer G., Rosenbaum R. 2003. IMPACT 2002+: a new life cycle impact assessment methodology. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 8: 324-330.
- Recchia L., Cappelli A., Cini E., Garbati Pegna F, Boncinelli P. 2019. Environmental sustainability of pasta production chains: An integrated approach for comparing local and global chains. *Resources*, 8, 56: 2-16.
- Ruini L., Ferrari E., Meriggi P., Marino M., Sessa F. 2013. Increasing the sustainability of pasta production through a life cycle assessment approach. Paper presented at the 4th Int. Workshop Advances in Cleaner Production. São Paulo, Brazil.
- Sala S., Cerutti A.K., Pant R. 2018. *Development of a weighting approach for the Environmental Footprint*. Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- Sala S., Crenna E., Secchi M., Pant R. 2017. *Global normalisation factors for the Environmental Footprint and Life Cycle Assessment*. JRC Scientific Report, Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- Sgambaro 2014. *Calcolo della Carbon Footprint della Pasta Jolly, della Pasta Sgambaro Etichetta Gialla e della Semola Jolly*. Rev. 00 20 May 2014.
- UNAFPA (Unions de Associations de Fabricants de Pâtes Alimentaires) 2018. *Product Environmental Footprint category rules (PEFCR) for dry pasta*. Vers. 3.
- Zingale S., Guarnaccia P., Timpanaro G., Scuderi A., Matarazzo A., Bacenetti J., Ingrao C. 2022. Environmental life cycle assessment for improved management of agri-food companies: the case of organic whole-grain durum wheat pasta in Sicily. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 27: 205-226.

## **Valorizzazione della Manioca (*Manihot esculenta*, Crantz) attraverso la produzione di paste con aumentato valore nutrizionale**

F. Taddei\*, P. Kouagang Tchakoutio, L. Gazza, F. Nocente, E. Galassi, R. Mortaro, A. Arcangeli, C. Natale, E. Gosparini

Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari (CREA-IT), Via Manziana 30, 00189 Roma (RM).

\*E-mail: [federica.taddei@crea.gov.it](mailto:federica.taddei@crea.gov.it)

### **Abstract**

In many developing countries, food safety is not guaranteed due to several reasons including inadequate management of agricultural practices and to food conservation techniques. Good food conservation techniques are necessary to avoid the fast deterioration of some crops. Cassava is one of the most consumed foods and a source of energy for millions of Africans, being rich in carbohydrates in the root (the main edible part of the plant). A negative aspect related to its consumption and limited diffusion is its easy perishable nature. In this work, cassava was used to produce pasta, a highly conservable food product, also combined with sorghum flour, widespread and mostly consumed in Africa, to improve the nutritional potential of products based on cassava and sorghum. The nutritional characterization of the obtained pasta samples showed an increase in protein and fiber content in the cassava:sorghum 50:50 pasta sample. Although the obtained pasta samples were interesting from a nutritional point of view, further refinements are required in the pasta making phase to ameliorate the sensory judgment of the cooked pasta, caused by the excessive stickiness observed by the panel test.

### **Riassunto**

In molti paesi in via di sviluppo la sicurezza alimentare non è garantita anche a seguito dell'inadeguata gestione delle pratiche agricole e delle tecniche di conservazione degli alimenti necessarie per evitare il deperimento rapido di alcune colture. La manioca è un alimento base e fonte di energia per milioni di africani per l'elevato contenuto di carboidrati nella radice (la principale parte edibile della pianta). Un aspetto negativo relativo a questo alimento è la facile deperibilità che ne limita la diffusione. In questo lavoro, la manioca è stata utilizzata per la produzione di un alimento altamente conservabile, la pasta, anche miscelata con sfarinato integrale di sorgo, uno dei cereali più diffusi in Africa, allo scopo di migliorare il potenziale nutrizionale dei prodotti a base di sfarinati di manioca e di sorgo. La caratterizzazione nutrizionale delle paste ottenute ha messo in evidenza un aumento in proteine e fibre nelle paste di manioca addizionate con sorgo. Le paste ottenute, sebbene siano risultate interessanti dal punto di vista nutrizionale, necessitano di ulteriori migliorie in fase di pastificazione al fine di migliorare il giudizio sensoriale delle paste cotte, giudicate dal panel test, eccessivamente collose.

### **Introduzione**

L'aumento dei flussi migratori provenienti dal continente africano verso l'Italia ed in generale verso l'Europa, rende sempre più necessario andare incontro alle tradizioni e gusti di queste popolazioni, aumentando l'inclusività e al contempo la *food diversity* e la *food fusion*.

La manioca (*Manihot esculenta*, Crantz) è molto diffusa in Africa, grazie alla sua capacità di poter crescere in terreni poveri e siccitosi. È un alimento largamente consumato dalle popolazioni locali. La principale problematica che ne contrasta una sua più ampia diffusione è la ridotta conservabilità (Rickard e Coursey, 1981).

Il sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), cereale senza glutine, viene principalmente consumato in Asia e Africa ed è il quinto cereale più importante nella produzione mondiale totale (Serna-Saldivar and Espinosa-Ramírez, 2019). È una coltura estremamente rustica che si adatta anche a terreni marginali e resiste bene a prolungati periodi di siccità.

Dal punto di vista nutrizionale, la manioca presenta uno scarso tenore proteico, un elevato contenuto in amido ed un contenuto medio in fibre del 4%, suggerendo l'esigenza di un suo consumo associato ad altri alimenti più ricchi in proteine, al fine di raggiungere un apporto nutrizionale bilanciato. Il sorgo presenta un contenuto in proteine e in fibre più elevato rispetto alla manioca, rappresentando un possibile candidato per essere addizionato alla manioca al fine di valorizzare i prodotti di entrambe le specie. In questo lavoro, la manioca ed il sorgo sono stati utilizzati per la produzione di pasta allo scopo sia di valorizzare queste due colture poco conosciute a livello nazionale sia di migliorare il potenziale nutrizionale dei loro prodotti di trasformazione con l'obiettivo, anche sociale, di aumentare l'inclusività tra popolazioni che hanno differenti tradizioni e abitudini alimentari. La pasta di sola semola è stata utilizzata come controllo.

### Materiali and metodi

Per questo lavoro sono stati utilizzati una farina di manioca disponibile in commercio, la granella di un ibrido di sorgo per alimentazione umana, linea AG4E44 (Padana Sementi Elette', Tombolo, PD) e coltivato a Roma, presso l'Azienda sperimentale "L'Inviolatella" del CREA-IT nel 2018 e la granella di un insieme di 30 varietà di frumento duro coltivate nelle aziende sperimentali del CREA in Sicilia nel 2016. La granella di sorgo è stata micronizzata utilizzando l'apparato Pulverisette (Fritch, Germania), con un vaglio a 0,7 mm, per ottenere uno sfarinato integrale di sorgo con una granulometria idonea per essere successivamente utilizzata nel processo di pastificazione. Anche lo sfarinato grezzo di manioca commerciale è stato micronizzato al fine di ottenere una granulometria più omogenea rispetto a quella di partenza. Le cariossidi di frumento duro sono state macinate in un impianto pilota (Buhler MLU 202, Uzwil, Svizzera) per ottenere la semola. Gli sfarinati di sorgo e di manioca micronizzati e la semola di frumento duro sono stati miscelati e sottoposti al processo di pastificazione ed essiccazione negli impianti pilota del CREA-IT (rispettivamente NAMAD, Roma, Italia e AFREM, Lione, Francia). Sono stati ottenuti cinque campioni di pasta le cui formulazioni sono riportate in Tabella 1.

**Tabella 1.** Composizione percentuale dei campioni di pasta ottenuti

Campioni di pasta	Sfarinato micronizzato di Manioca	Sfarinato integrale micronizzato di Sorgo	Semola di frumento duro
Pasta di manioca	100%		
Pasta di manioca + sorgo	50%	50%	
Pasta di sorgo + semola		50%	50%
Pasta di manioca + semola	40%		60%
Pasta di semola			100%

I campioni di pasta sono stati poi caratterizzati sia dal punto di vista nutrizionale che sensoriale seguendo le metodiche riportate in Tabella 2. I dati riguardanti la caratterizzazione nutrizionale sono stati corretti per il valore dell'umidità.

**Tabella 2.** Metodi analitici utilizzati per la caratterizzazione nutrizionale e sensoriale dei campioni di pasta.

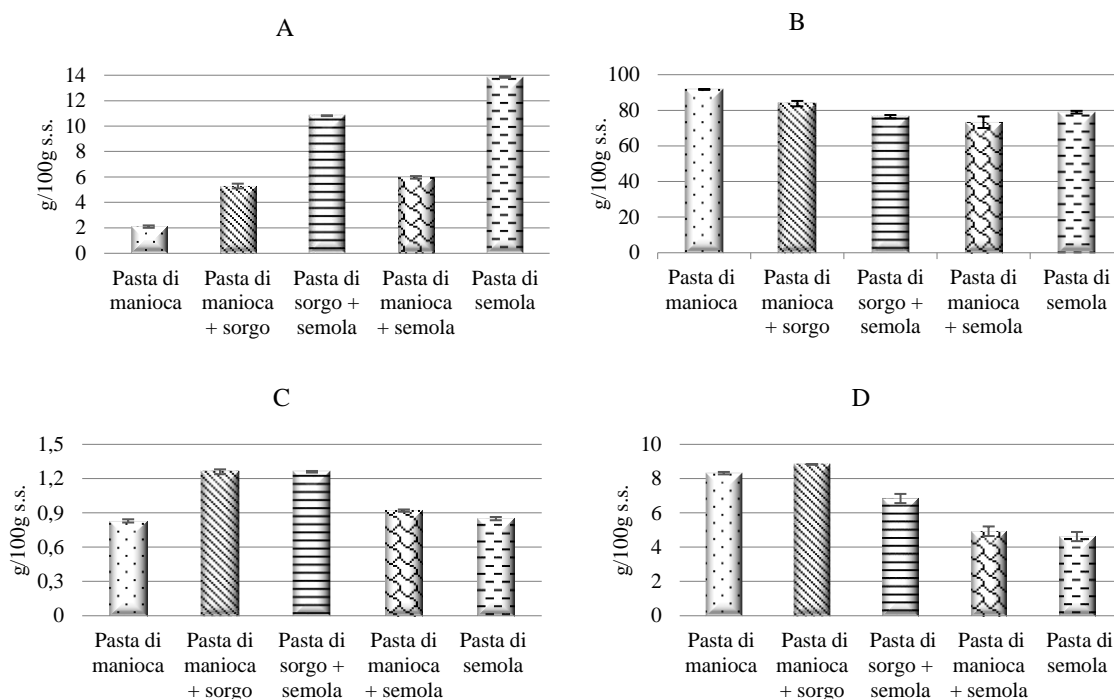
<b>Analisi</b>	<b>Riferimento del metodo</b>
<b>Proteine totali</b>	ICC standard n °105
<b>Amido totale</b>	AOAC 996.11
<b>Fibra alimentare totale</b>	AOAC 985.29
<b>Ceneri</b>	AACC 08-01.01
<b>Tempo di cottura ottimale</b>	AACC 66-50.01
<b>Assorbimento di acqua</b>	AACC 66-50.01
<b>Giudizio sensoriale</b>	D'Egidio et al 1990

### **Risultati e discussione**

Dalla caratterizzazione nutrizionale risulta che la pasta di manioca e sorgo presenta un contenuto proteico superiore rispetto alla pasta di sola manioca, con valori pari rispettivamente al 5,29 g/100g e 2,10 g/100g (Fig. 1A), suggerendo, al fine di migliorare e valorizzare il potenziale nutrizionale della manioca, il suo arricchimento con matrici vegetali con più alto contenuto proteico come il sorgo. Questi valori sono comunque inferiori rispetto a quelli riscontrati nei campioni di pasta contenenti semola. Il contenuto in amido totale varia dal 92% nella pasta di sola manioca a circa il 73% nella pasta di manioca + semola (Fig. 1B), mentre le ceneri variano dall'1.26% allo 0.83% con le paste di manioca+ sorgo e sorgo + semola che presentano i valori più alti (Fig. 1C), principalmente dovuti alla presenza dello sfarinato integrale micronizzato di sorgo. I restanti campioni di pasta mostrano valori che rientrano nel limite massimo di 0,9% previsto per la semola di frumento duro (DPR n. 187 del 9 febbraio 2001), indicando un minore contenuto in sostanze minerali rispetto alle paste formulate con l'aggiunta di sfarinato integrale di sorgo. La pasta di manioca + sorgo presenta il contenuto in fibra più alto (circa 9 %), valore che attribuisce a questa pasta il claim 'fonte di fibre', seguito rispettivamente dalla pasta di manioca, sorgo + semola, manioca + semola e semola (Fig. 1D). Anche in questo caso si conferma la pasta di manioca + sorgo un possibile compromesso al fine di aumentare il potenziale nutrizionale-salutistico dei prodotti a base di manioca, rappresentando al contempo una valida alternativa alimentare ai prodotti gluten free che generalmente presentano un basso contenuto in fibre.

I tempi di cottura dei campioni di pasta ottenuti sono risultati più elevati nella pasta di semola seguita da quella di manioca + sorgo, manioca, manioca+ semola e sorgo+semola mentre le paste contenenti manioca hanno presentato valori di assorbimento di acqua inferiori rispetto ai campioni contenenti semola (Tab. 3). Tali risultati potrebbero essere dovuti sia alle caratteristiche degli sfarinati di partenza, sia alla risultanza degli effetti dovuti al mescolamento di due differenti sfarinati di partenza.

Il giudizio sensoriale, infine, ha messo in evidenza la scarsa qualità delle paste di manioca e di manioca + sorgo (Tab. 3), dovuta principalmente alla elevata collosità ed ammassamento causato dalla presenza di amido di manioca, ed alla totale assenza della maglia glutinica. Come atteso, il giudizio sensoriale migliora nelle paste contenenti semola e quindi glutine.



**Figura 1.** Caratterizzazione nutrizionale dei campioni di pasta: proteine totali (A), amido totale (B), fibra alimentare totale (C), ceneri (D)

In conclusione, questo studio preliminare ha messo in evidenza che è possibile utilizzare materie prime, il cui consumo attualmente è principalmente limitato alle popolazioni africane, al fine di ottenere un prodotto conservabile e facilmente trasportabile, come la pasta, che potrebbe andare incontro ai gusti e tradizioni sia di queste popolazioni migrate in Italia sia degli italiani stessi, aumentando l'inclusività e la diversità alimentare. Le paste ottenute, sebbene siano risultate interessanti dal punto di vista nutrizionale, necessitano di ulteriori migliorie in fase di pastificazione al fine di migliorare il giudizio sensoriale delle paste cotte ottenute, giudicate dal panel test eccessivamente collose.

**Tabella 3.** Caratterizzazione ed analisi sensoriale dei campioni di pasta ottenuti

Campioni	Tempo di cottura (min)	Assorbimento di acqua (g)	Collosità		Nervo		Ammassamento		Giudizio globale
			Valore	Giudizio	Valore	Giudizio	Valore	Giudizio	
Pasta di manioca	6'40''	94,3	0	Molto elevata	0	Molto scarso	0	Completo	0
Pasta di manioca + sorgo	9'00''	88,6	0	Molto elevata	0	Molto scarso	0	Completo	0
Pasta di sorgo + semola	5'00''	140,4	60	Media	45	Scarso	60	Quasi assente	55
Pasta di manioca + semola	5'40''	110,7	30	Elevata	45	Scarso	60	Quasi assente	45
Pasta di semola	9'20''	144,5	60	media	75	Buono	55	Medio-quasi assente	63

## **Bibliografia**

- AACC 2000. *American Association of Cereal Chemists, Approved Methods*, Method 66-50.01; St. Paul, MN.
- AACC 2013. *American Association of Cereal Chemists, Approved Methods*, 08-01.01 Ash; St. Paul, MN.
- AOAC 1995. *Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis* 985.29, 996.11, 16th ed.; Cunniff, P., Ed.; AOAC: Gaithersburg, MD, USA.
- D'Egidio M.G., Mariani B.M., Nardi S., Novaro P., Cubadda R. 1990. Chemical and technological variables and their relationships: A predictive equation for pasta cooking quality. *Cereal Chemistry*, 67: 275-281.
- ICC 2003. *International Association for Cereal Science and Technology, Standard Methods* No. 105/2; ICC: Vienna, Austria.
- Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali. (2001). Decreto del Presidente della Repubblica 9 febbraio 2001, n. 187. Regolamento per la revisione delle normative sulla produzione e commercializzazione degli sfarinati e paste alimentari, a norma dell'articolo 50 della legge 22 febbraio 1994, n. 146.
- Rickard J. E., Coursey D.G. 1981. *Cassava storage. Part 1: Storage of fresh cassava roots*.
- Serna-Saldivar S. O., Espinosa-Ramírez J. 2019. In *Sorghum and Millets. Grain structure and grain chemical composition*. AACC International Press. pp. 85-129.

## **Studio di tracciabilità *infotracing* nella filiera grano duro-pasta**

C. Cecchini<sup>1\*</sup>, C. Costa<sup>2</sup>, S. Figorilli<sup>2</sup>, F. Pallottino<sup>2</sup>, P. Menesatti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari (CREA-IT), Via Manziana 30, 00189 Roma (RM).

<sup>2</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari (CREA-IT), Via della Pascolare 16, 00015 Monterotondo (RM).

\*E-mail: [crisrina.cecchini@crea.gov.it](mailto:crisrina.cecchini@crea.gov.it)

### **Abstract**

Digital technologies, for the automatic identification and registration of information, are now widely used support tools in food traceability. In order to evaluate the applicability of new technologies in the durum wheat-pasta supply chain, considering its complexity, a simplified flow was simulated at the CREA-IT in Rome by digitally recording the information from sowing to packaging through an electronic traceability system (*infotracing*). The database was then implemented with software that can be easily integrated with blockchain technology to guarantee the inviolability and immutability of the information.

### **Riassunto**

Le tecnologie, in particolare quelle digitali per l'identificazione e la registrazione automatica delle informazioni, sono diventate ormai strumenti di supporto largamente utilizzati nella tracciabilità alimentare. Al fine di poter valutare a livello sperimentale la fattibilità applicativa delle nuove tecnologie nella filiera frumento duro-pasta, e considerando la complessità della filiera, è stato simulato un flusso semplificato presso il CREA-IT di Roma a cui è stato associato un sistema di tracciabilità elettronica e informatica (*infotracing*), che ha registrato digitalmente il flusso di informazioni dalla semina al packaging. Il database del sistema è stato poi implementato con un software che può essere facilmente integrato con la tecnologia blockchain che permette di garantire l'invulnerabilità e l'immutabilità delle informazioni.

### **Introduzione**

L'*infotracing*, attraverso un approccio globale della gestione informatica e informativa della filiera, permette di integrare le informazioni legate alla qualità del prodotto con quelle legate alla tracciabilità all'interno di un sistema digitale fino all'integrazione con le blockchain (Costa *et al.*, 2013). In tale contesto un rilevante supporto è offerto dallo sviluppo tecnologico attraverso l'uso combinato di sensori IoT che diventano degli strumenti concreti per migliorare la tracciabilità fornendo informazioni ai diversi livelli.

In questo studio sono stati uniti i benefici delle tecnologie Radio Frequency Identification (RFID), QR code e blockchain, nonché dei sistemi di monitoraggio delle aree produttive attraverso droni, per sviluppare un sistema di controllo qualitativo di tracciabilità all'interno di una filiera semplificata simulata presso il CREA-IT di Roma.

### **Materiali e metodi**

La simulazione è stata effettuata su 3 campioni di frumento duro (Iride, Marco Aurelio e Monastir) coltivati presso l'azienda sperimentale di Montelibretti del CREA-IT di Roma all'interno della prova Rete di confronto varietale del frumento duro a.a. 2018/2019.

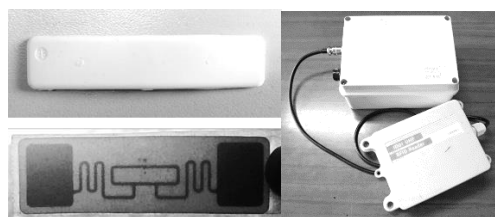
I sistemi di tracciabilità *infotracing* utilizzati sono riportati nello schema in Figura 1 integrati con le fasi di flusso della filiera simulata.



**Figura 1.** Schema di filiera semplificata integrata con il sistema di tracciabilità informatica *infotracing*

Produzione: la scansione del campo coltivato è stata ottenuta mediante il volo di un drone leggero a basso costo DJI™ SPARK™. Il drone ha sorvolato il campo sperimentale utilizzando una missione waypoint pianificata con il software open source Mission Planner (Licenza GPLv3). Dopo l'acquisizione, le immagini raccolte sono state analizzate per ricostruire le ortoimmagini con il software “3DF Zephyr” (Zephyr 3DFLow 2018, Verona, Italia) (Pallottino *et al.*, 2021).

Raccolta, stoccaggio e prima trasformazione: Tag RFID UHF a 860 MHz a fascia flessibile e tondi sono stati associati al grano in fase di raccolta e di stoccaggio e alla semola ottenuta dalla macinazione. Attraverso le antenne RFID i tag sono stati letti nelle varie fasi mediante un lettore portatile personalizzato. Il lettore, realizzato dal CREA-IT di Monterotondo, è stato sviluppato utilizzando tecnologie open source consistenti in una Micro Controller Unit (MCU) ARDUINO® con Bluetooth integrato (Bluno Mega 2560) e un'antenna RFID interfacciata tramite comunicazione seriale (Figorilli *et al.*, 2018) (Fig. 2).



**Figura 2.** Tag RFID chip (sinistra); lettore portatile personalizzato (destra)

Seconda trasformazione e consumatore: Sulla confezione di pasta prodotta è stato stampato un QRcode, a cui sono state associate le informazioni relative alla fase di seconda trasformazione, e con il quale il consumatore è in grado di visualizzare tutte le informazioni inserite nelle diverse fasi della filiera.

Per la raccolta dei dati di tracciabilità è stata sviluppata un'App (Fig. 3) utilizzando il dispositivo Bluetooth dello smartphone come collegamento con il lettore RFID portatile personalizzato. Le informazioni registrate tramite l'app vengono archiviate su un database interno e successivamente sincronizzate su un server remoto. Il database e l'architettura del



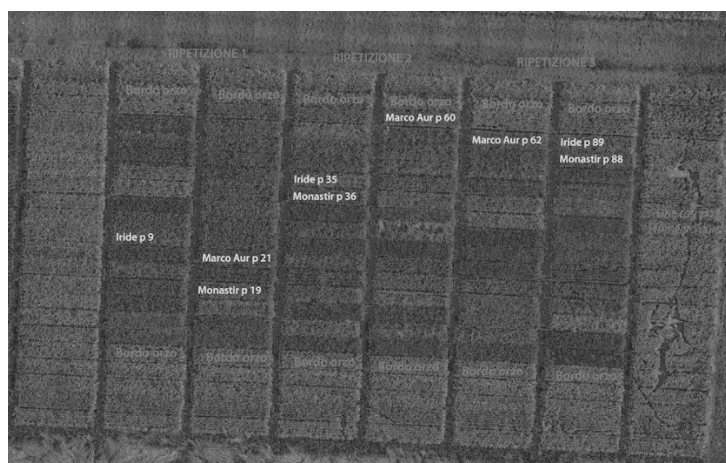
software sono stati sviluppati con sistemi di compatibilità per una implementazione in blockchain ed integrati con una sezione di connessione all'API del servizio Gateway (interfaccia di programmazione dell'applicazione) per comunicare con la blockchain.



**Figura 3.** App per la tracciabilità della filiera frumento duro-pasta: A) Home page; B) fase di produzione; C) fase di stoccaggio; D) fase di prima trasformazione (molino); E) fase di seconda trasformazione (pastificio).

## Risultati e discussione

Nella Figura 4 è riportata una orto-immagine dei lotti di grano ottenuta dal volo del drone sul campo coltivato a frumento duro presso l'azienda agricola "Riserva La Castellaccia" Montelibretti (Roma) del CREA-IT (42 ° 07'47.71 "N 12 ° 38'31.01" E, Roma, Italia) da cui provengono i campioni utilizzati per la simulazione di tracciabilità.



**Figura 4.** Orto-immagine dal drone del campo di frumento duro presso l'azienda agricola "Riserva La Castellaccia" Montelibretti (Roma) del CREA-IT

L'immagine mostra le prove di grano duro con le piante disposte in un disegno a blocchi randomizzati di 10 m<sup>2</sup> di parcelle (densità di semina di 350 semi/m<sup>2</sup>), seguendo un disegno di misurazione ripetuta multifattoriale con 3 repliche.

La scansione del terreno con il drone oltre a fornire una esatta geolocalizzazione può fornire ulteriori informazioni che possono essere utili per orientare la produzione agricola verso livelli ottimali. In questo studio sono state misurate le variazioni di colore delle piante in diversi momenti della maturazione (immagini non riportate).

Il grano, raccolto in sacchi di polipropilene mediante una mietitrebbia parcellare, è stato campionato come singole parcelle. In ogni sacco è stato inserito il tag RFID a forma di fascia flessibile il cui codice univoco identificava la singola parcella di ogni varietà. Tramite il pulsante “scan” dell’App si è effettuata la connessione Bluetooth dello smartphone al lettore RFID portatile personalizzato. Quando il lettore ha ricevuto il codice RFID l’App ha verificato la presenza del codice, in caso di codice esistente avrebbe visualizzati i dati corrispondenti ma essendo un nuovo codice ha attivato i campi per l’inserimento delle informazioni. In ogni tag RFID1 sono state registrate tutte le informazioni relative alla produzione visibili sull’app (Fig. 3B).

Dopo la raccolta il grano è stato trasportato alla sede del CREA-IT di Roma per essere stoccato in ambiente con controllo della temperatura. I campioni di grano sono arrivati alla fase di stoccaggio come singole parcelle. I tag delle singole parcelle sono stati letti e associati al tag RFID2 del campione composito di ciascuna varietà a cui sono state associate tutte le informazioni relative al sito e alle condizioni di stoccaggio nonché le caratteristiche qualitative del grano (Fig. 3C).

Dopo un periodo di stoccaggio il grano è stato inviato al molino sperimentale del CREA-IT per la produzione di semola. I tag di ciascun campione sono stati correttamente letti dall’App dedicata e si sono quindi dimostrati funzionali, registrando tutte le informazioni necessarie. Il sistema *infotracing* di ciascuna varietà è stato integrato con le informazioni della fase di macinazione e successivamente con i dati della caratterizzazione qualitativa della semola. L’RFID 3 identificativo della semola ottenuta nel molino presenta l’associazione con l’RFID 1 e 2 identificativi delle fasi di produzione e stoccaggio (Fig. 3D).

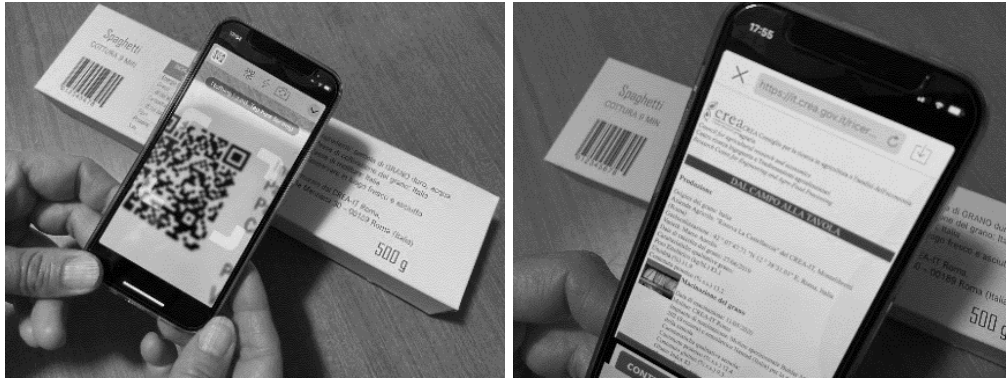
La semola ottenuta è stata utilizzata per la produzione di pasta formato spaghetti (diametro 1,7 mm) nell’impianto sperimentale del CREA-IT. La fase di essiccazione è stata realizzata con un ciclo a bassa temperatura che permette di esaltare la qualità della materia prima mantenendo intatte le caratteristiche e le proprietà nutrizionali (De Noni, Pagani 2010). Per ciascun lotto di pasta sono state inserite nel database le informazioni relative al processo di pastificazione (Fig. 3E). La pasta prodotta è stata sottoposta alle prove di cottura per fornire attraverso l’App anche un giudizio di qualità sul prodotto.

Gli spaghetti prodotti sono stati confezionati in un astuccio di cartone su cui è stato stampato un QRcode (Fig. 5) attraverso il quale il consumatore potrà accedere alle informazioni riguardanti l’intera filiera di produzione, completando in tale modo tutto il processo di tracciabilità informativa (*infotracing*).



**Figura 5.** Confezione di spaghetti e QRcode

La scansione del QRcode presente sul pacco di pasta permette di visualizzare la pagina web con tutte le informazioni delle fasi della filiera produttiva (Fig. 6).



**Figura 6.** Scansione del QRcode e visualizzazione della pagina web con le informazioni per il consumatore

La piattaforma *infotracing* è stata inoltre predisposta per essere implementata con il sistema blockchain in grado di garantire al consumatore che le informazioni immesse lungo l'intera catena di approvvigionamento siano a prova di manomissione.

### Conclusioni

Lo studio di fattibilità sull'applicazione delle nuove tecnologie per l'identificazione e la registrazione automatica delle informazioni nel controllo qualitativo della filiera frumento duro-pasta ha mostrato la possibilità di implementazione del sistema di tracciabilità. La tecnologia Radio Frequency Identification (RFID) può rappresentare un valido supporto consentendo operazioni di scrittura/lettura multiple in diverse fasi della filiera. Il QR code, già largamente utilizzato come integrazione all'etichetta, è di facile utilizzo e risulta un utile strumento di comunicazione tra produttore e consumatore per promuovere le informazioni relative al prodotto. L'utilizzo della tecnologia blockchain può essere invece un'ottima soluzione per garantire affidabilità, trasparenza e sicurezza. Un altro aspetto interessante è legato ai sistemi di monitoraggio delle aree produttive utilizzando sensori remoti e droni che potrebbero essere integrati in un sistema di tracciabilità.

Nel complesso, per una filiera frumento duro-pasta non particolarmente complessa, l'applicazione di un sistema di *infotracing* fornisce una soluzione efficace di comunicazione trasparente per il trasferimento delle informazioni contribuendo alla salvaguardia e alla valorizzazione qualitativa della filiera ed in particolare del prodotto finale.

### Bibliografia

- Costa C., Antonucci F., Pallottino F., Aguzzi J., Sarrià D., Menesatti P. 2013. A review on agri-food supply chain traceability by means of RFID technology. *Food and Bioprocess Technology*, 6: 353-366.
- De Noni I., Pagani M.A. 2010. Cooking Properties and Heat Damage of Dried Pasta as Influenced by Raw Material Characteristics and Processing Conditions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50: 465-472
- Figorilli S., Antonucci F., Costa C., Pallottino F., Raso L., Castiglione M., Pinci E., Del Vecchio D., Colle G., Proto A.R. 2018. Blockchain implementation prototype for the electronic open source traceability of wood along the whole supply chain. *Sensors*, 18: 3133.
- Pallottino F., Figorilli S., Cecchini C., Costa C. 2021. Light Drones for Basic In-Field Phenotyping and Precision Farming Applications: RGB Tools Based on Image Analysis. In: *Methods Molecular Biology*, Vol. 2264, Pasquale Tripodi (Eds): Crop Breeding, Humana press, pp268-278 (Chapter 18). ISBN: 978-1071612002.

## Valorizzazione di sottoprodotti dell'industria olearia attraverso la formulazione di prodotti da forno funzionali

P. Dahdah<sup>\*</sup>, R. Cabizza<sup>1</sup>, A. Piga<sup>1</sup>, M. G. Farbo<sup>1</sup>, G. Hassoun<sup>2</sup>, C. Fadda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Agraria, Sezione STAA, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39, 07100 Sassari (SS).

<sup>2</sup>Faculty of Agronomy, Department of Environment, Lebanese University, University Street, 1100, Beirut, Lebanon.

\*E-mail: [pdahdah@uniss.it](mailto:pdahdah@uniss.it)

### Abstract

In the recent years, the consumer is becoming more aware of functional products and their specific health claims, and, as attention has been drawn to the benefits of by-products, the trend is shifting towards their reuse as functional ingredients in order to create formulations with better nutritional profiles. Olive oil extraction results in several by-products such as leaves, vegetation waters and pomace, also known as *paté*. *Paté* can have negative impacts whether economically, or environmentally. In fact, it represents a risk because, if managed badly, it could lead to the pollution of groundwater and soil. At the same time, the *paté* has registered considerable interest, as it is rich in polyphenols, unsaturated fats, fibers and other functional elements. The incorporation of the *paté* as a new ingredient in the formulations of baked goods is one of the possible approaches for its use. The aim is to ameliorate the nutritional value, and to contribute to the improvement of the health and well-being of the consumer. The purpose of the following work is to study the effects of olive pomace of typical Sardinian cultivars (Bosana and Semidana), collected during the 2021-2022 oil year, into bakery products, and to analyze their physicochemical and rheological characteristics.

### Riassunto

Negli ultimi anni l'interesse verso i sottoprodotti e il loro riutilizzo come ingredienti funzionali è aumentato, con lo scopo di creare formulazioni dall'alto profilo nutrizionale. Inoltre, è aumentata l'attenzione e la consapevolezza da parte dei consumatori sui prodotti funzionali con specifici *claim* salutistici. L'estrazione dell'olio d'oliva produce alcuni sottoprodotti quali foglie, acque di vegetazione e sansa, nota anche come *paté*. Il *paté* può avere impatti negativi sia dal punto di vista economico che ambientale. Rappresenta infatti un rischio, perché, se mal gestito, potrebbe portare ad un inquinamento delle falde acquifere e del suolo. Allo stesso tempo, il *paté* ha registrato un notevole interesse, poiché è ricco in polifenoli, grassi insaturi, fibre e altri elementi funzionali. L'impiego come nuovo ingrediente nelle formulazioni di prodotti da forno è uno dei possibili approcci sull'utilizzo del *paté*. L'obiettivo è migliorare il valore nutrizionale e contribuire al miglioramento della salute e del benessere del consumatore.

Lo scopo del seguente lavoro è quello di studiare l'effetto del *paté* di olive di cultivar tipiche sarde (Bosana e Semidana), raccolte durante l'annata olearia 2021-2022, nei prodotti da forno, e rilevare le caratteristiche fisico-chimiche e reologiche.

### Introduzione

L'estrazione dell'olio d'oliva comporta la produzione di diversi sottoprodotti, costituiti dalle foglie e dai rami di olivo, dalle acque reflue di frantoio (OMWW), dall'acqua di vegetazione e da un prodotto solido noto come sansa di oliva o denominato *paté* (Alu'datt *et al.*, 2010). Ogni anno in tutto il mondo vengono generate 2.881.500 t di sansa di oliva, rendendola il più importante sottoprodotto di scarto (Lammi *et al.*, 2018). La composizione totale della sansa di oliva consta in una combinazione di circa il 20% di buccia e polpa di oliva, 15% di nocciolo

d'oliva frantumato e acque reflue del frantoio, con un contenuto di umidità di circa il 65% (Chebaibi *et al.*, 2019). Questi elementi sono caratterizzati da un alto contenuto di fibre indigeribili, principalmente cellulosa, emicellulosa e lignina. Inoltre, sono presenti polifenoli, tra i quali si annoverano il tirosolo, idrossitirosolo, decarbossimetil oleuropeina aglicone, luteolina e tannini noti come composti antinutritivi. Si riscontra la presenza di acido oleico, il principale tra gli acidi grassi presenti e proteine (Dal Bosco *et al.*, 2012). Due ragioni principali sono alla base dell'urgenza di scoprire usi alternativi della sansa di oliva piuttosto che smaltirla. La prima è costituita dall'impatto negativo del paté sull'ambiente. Quest'ultimo è considerato il principale inquinante della regione mediterranea, a causa del suo lungo periodo di degradazione, dell'alto contenuto di acidi organici e lipidi, dell'elevata salinità e pH acido, con ripercussione sulle caratteristiche delle acque sotterranee e sulla qualità del suolo (Dal Bosco *et al.*, 2007; Lammi *et al.*, 2019). Ulteriormente si vuole dare un riscontro sui benefici salutistici e nutrizionali che la sansa di oliva apporta all'alimentazione umana. In particolare, essa è una delle principali fonti di polifenoli e altri elementi funzionali, che aiutano nella prevenzione e trattamento di alcune patologie cognitive, cardiovascolari, tumorali, diabete, malattie autoimmuni e dislipidemie (Cioffi *et al.*, 2010; Palmieri *et al.*, 2012). La sansa di oliva ad oggi è una matrice alimentare sottovalutata, ed essendo ancora inesplorato il campo di applicazione e i suoi potenziali effetti benefici, questo lavoro ha previsto come obiettivo quello di caratterizzare il profilo chimico-fisico della sansa ottenuta dalla molitura di diverse cultivar di olivo coltivate in Sardegna. Per ampliare il panorama sono state determinate la macro e micro-composizione di olive e olio di oliva. Un ulteriore obiettivo è stato quello di valutare gli effetti dei paté di olive a varie concentrazioni nella preparazione di impasti a base di farina e verificare la loro influenza sulla fortificazione degli impasti.

## **Materiali e metodi**

### ***Campionamento***

Campioni di olio d'oliva e sansa di due cultivar tipiche sarde Bosana e Semidana sono stati raccolti presso l'Accademia Olearia (Alghero, Italia) durante la stagione olearia 2021-2022. Le olive sono state molite attraverso un estrattore centrifugo bifase (Leopard DMF, Peralisi), in grado di produrre una sansa composta da polpa umida priva di noccioli. I campioni di sansa di oliva sono stati immediatamente conservati a -20°C fino all'esecuzione delle analisi.

### ***Caratterizzazione del paté di oliva***

Il contenuto di sostanza secca è stato misurato dopo l'essiccazione del paté di oliva in un forno a 105°C fino a peso costante (ISO 662:1998). Il contenuto di grasso è stato analizzato per via gravimetrica mediante il metodo AOAC 2003:06 utilizzando un estrattore (Mod. SER158, Solvent AutoExtractor, Velp Scientific, Usmate, Italia). L'azoto totale è stato determinato utilizzando il metodo Kjeldahl e applicando un fattore di conversione di 6,25 per determinare il contenuto proteico (AOAC 960,52). Il contenuto di ceneri è stato stimato con metodo AOAC 923.03. Le fibre alimentari totali sono state determinate secondo il metodo AACC 32-05.01 e AOAC 985.29. Un'aliquota di ciascun campione è stata liofilizzata (liof.) (FreeZone serie 8L - 50°C, Labconco, Kansas City). L'analisi di macro e microelementi è stata effettuata attraverso la spettrometria di massa al plasma ad accoppiamento induttivo (ICP-MS).

### ***Analisi di colore del paté di olive***

La determinazione del colore è stata eseguita per ogni campione in polvere con un colorimetro (Minolta CR-300, Konica Minolta Sensing, Osaka, Giappone) con illuminante D65. È stato considerato lo spazio colore di Hunter Lab e i valori delle coordinate colorimetriche sono stati:

L\* = luminosità (da nero 0 a bianco 100); a \* = componente rosso-verde e b\*= componente giallo-blu. Tutte le misurazioni sono state eseguite in triplicato.

### **Preparazione degli impasti**

Per la preparazione degli impasti è stata usata una farina commerciale di tipo 00 (SIMEC Spa, Santa Giusta, OR, Italia). Sono stati impiegati paté di due varietà di olivo, Bosana e Semidana a differenti percentuali: 0% per il controllo, 1%, 2%, 3% e 5%. Il contenuto dell'umidità della farina (14%) è stato determinato mediante il metodo ICC 1976-1996.

I parametri relativi all'assorbimento dell'acqua, allo sviluppo dell'impasto espresso in minuti, DDT e la stabilità sono stati determinati mediante farinografo (Brabender, modello 810104, Duisburg, Germania). I campioni sono stati ottenuti mediante miscelazione di acqua e farina per 8 minuti a velocità 3 in un'apposita impastatrice (KitchenAid, Artisan, 5KSM150, USA), e conservati a temperatura ambiente. Per l'analisi reofermentometrica sono stati impiegati inoltre 2% (p/p) di lievito, 1,8% (p/p) di sale per ciascun campione.

### **Proprietà fermentative**

Ciascun campione (315 g) è stato analizzato mediante reofermentometro (Chopin, Parigi, Francia) e sono stati rilevati i seguenti parametri: altezza massima dell'impasto (Hm, mm) e tempo al quale si sviluppa (T1); tempo massimo richiesto allo sviluppo di gas (T1) e il volume di gas trattenuto a fine analisi (%). Ogni analisi è stata duplicata.

### **Analisi statistica**

Per l'analisi dei dati derivanti dalla caratterizzazione chimico fisica dei paté è stato impiegato il Software Statgraphics Centurion 18 (Statgraphics Technologies, Inc.), t-test, ( $p < 0.05$ ). È stato impiegato il Software Minitab® 17.1.0 (Minitab, Inc.), analisi della varianza (ANOVA), con procedura LSD di test Fisher, ( $p < 0.05$ ) per l'elaborazione dei dati derivanti dalle analisi reologiche.

## **Risultati e discussione**

### **Caratterizzazione del paté di oliva e colore**

La macro-composizione del paté di oliva fresco ha mostrato differenze significative tra le due cultivar per tutti i parametri analizzati (Tab. 1). I campioni di Bosana hanno mostrato un contenuto di sostanza secca (25,36%), grasso (17,57%) e cenere (5,29%) significativamente più elevati rispetto ai valori registrati per la cultivar Semidana. Il contenuto proteico del paté di cultivar Semidana si è rivelato significativamente maggiore rispetto a quello della cultivar Bosana.

**Tabella 1.** Macrocomposizione di paté fresco di olive di cultivar Bosana e Semidana.

Paté varietà	SS%	Grassi/SS%	Proteine/SS%	Ceneri/SS%	SS%	Fibra alimentare totale/SS%
	Paté fresco				Paté liof.	
<b>Bosana</b>	25,36 ± 0,22 <sup>a*</sup>	17,57 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,80 ± 0,40 <sup>b</sup>	5,29 ± 1,05 <sup>a</sup>	98,49 ± 0,07	61,1 ± 0,99 <sup>b</sup>
<b>Semidana</b>	19,67 ± 1,30 <sup>b</sup>	12,50 ± 1,22 <sup>b</sup>	4,24 ± 0,06 <sup>a</sup>	4,29 ± 0,33 <sup>b</sup>	98,31 ± 0,46	66,7 ± 0,52 <sup>a</sup>

\*Lettere diverse all'interno di ciascuna colonna indicano differenze significative in base al t test ( $p < 0,05$ ).

La composizione e i valori delle coordinate del colore della sansa di oliva delle due cultivar Bosana e Semidana sono riportati nella Tabella 2, mentre la microcomposizione è riportata in Tabella 3.

Per quanto riguarda il paté di oliva liofilizzato, differenze significative sono state osservate solo nella fibra alimentare totale, significativamente maggiore nei campioni di Semidana. Inoltre, quest'ultima cultivar ha mostrato un contenuto di azoto e proteine maggiore (0,98% per N e 6,14% proteine) rispetto al paté liofilizzato della cultivar Semidana. Differenze significative tra le due varietà sono state osservate anche per gli elementi magnesio (Mg) e potassio (K). Queste differenze possono essere dovute alla cultivar stessa o al periodo di raccolta e alla resa relativa. I valori di sostanza secca e il contenuto proteico del paté liofilizzato si sono rivelati essere concordanti con quelli rilevati da Caponio *et al.* (2022). I valori della fibra alimentare (61,1% per il paté Bosana; 66,7% per il paté Semidana) hanno mostrato differenze notevoli rispetto a quelle riscontrate nello studio di Caponio *et al.* (2022), attestandosi intorno al 20,1%. Non sono state riscontrate differenze significative per la luminosità (L\*) e per la coordinata a\*, mentre la coordinata b\* ha registrato valori significativamente diversi tra la sansa liofilizzata delle due cultivar.

**Tabella 2.** Macrocomposizione e analisi cromatiche di paté di olive liofilizzate (liof.) di cultivar Bosana e Semidana.

Paté varietà	H/SS % Paté liof.	N/SS % Paté liof.	Proteine/SS% Paté liof.	L*	a*	b*
Bosana	7,68 ± 0,21*	0,98 ± 0,02 <sup>a</sup>	6,14 ± 0,11 <sup>a</sup>	98,17 ± 0,92	0,33 ± 0,19	-2,45 ± 1,46 <sup>b</sup>
Semidana	7,19 ± 0,07	0,85 ± 0,01 <sup>b</sup>	5,29 ± 0,09 <sup>b</sup>	98,68 ± 5,46	-0,11 ± 1,19	1,88 ± 2,38 <sup>a</sup>

\*Lettere diverse all'interno di ciascuna colonna indicano differenze significative in base al t test (p < 0,05).

**Tabella 3.** Micro-composizione di paté di olive liofilizzate (liof.) di cultivar Bosana e Semidana.

Paté varietà	C/SS % Paté liof.	Ca/SS mg/kg Paté liof.	Mg/SS mg/kg Paté liof.	Na/SS mg/kg Paté liof.	K/SS mg/kg Paté liof.	Ph/SS mg/kg Paté liof.
Bosana	56,33 ± 1,59*	830,8 ± 34,27	601,5 ± 2,13 <sup>a</sup>	458,6 ± 9,01	13269,9 ± 431,46 <sup>a</sup>	1353,3 ± 48,37
Semidana	54,41 ± 0,35	759,4 ± 8,07	526,3 ± 5,60 <sup>b</sup>	432,4 ± 20,55	11577,9 ± 195,89 <sup>b</sup>	1466,0 ± 37,58

\*Lettere diverse all'interno di ciascuna colonna indicano differenze significative in base al t test (p < 0,05).

### ***Effetto del paté di oliva sul profilo farinografico degli impasti***

L'uso delle diverse percentuali di paté liofilizzato di entrambe le cultivar ha portato a differenze nel comportamento degli impasti, ripercuotendosi sulla capacità di assorbimento dell'acqua. Il Controllo (0%) e Bosana 1% hanno riportato un assorbimento del 54% (p/p), 2% (53,5%), 3% (53%) e 5% (51,8%). Nel caso della Semidana la percentuale di assorbimento nella tesi all'1% si è attestata al 54,5%, 2% al 54,2%, 3% al 53,5% e 5% al 53%.

### ***Comportamento degli impasti durante la lievitazione***

Le proprietà di fermentazione dell'impasto misurate dal reofermentometro sono mostrate nella Tabella 4. Durante la fermentazione il lievito produce gas che si diffonde nell'impasto e aumenta l'alveolatura della struttura. Il gas trattenuto nell'impasto è il rapporto tra produzione e la ritenzione di gas. Un minore valore (Hm-h)/Hm è indice di una maggiore stabilità dell'impasto, perciò una maggiore capacità di ritenzione dei gas (Farbo *et al.*, 2020). L'aumento delle percentuali di sansa ha influito in modo sfavorevole sulla lievitazione dell'impasto. Infatti, l'altezza (Hm) di tutti i campioni fortificati con entrambe le cultivar di paté a tutte le percentuali di utilizzo (1%, 2%, 3% e 5%) è diminuita significativamente rispetto al controllo. Il coefficiente di ritenzione è associato alla capacità estensiva dell'impasto e alla qualità della rete proteica del glutine (Farbo *et al.*, 2020). La ritenzione di gas (Vr/Vt), invece, è stata significativamente implementata con l'aggiunta del paté a tutte le percentuali d'impiego di entrambe le cultivar rispetto al controllo (p < 0,05).

**Tabella 4.** Effetto delle percentuali di paté di oliva (1%, 2%, 3%, 5%) di Bosana e Semidana sulle proprietà fermentative dell'impasto.

Campione	Sviluppo dell'impasto				Rilascio del gas			
	Hm (mm)		(Hm-h)/Hm (%)		T1(h)	T'1 (h)	(CR) Vr/Vt: (%)	
<b>0%</b>	51,10	± 0,85 <sup>a*</sup>	5,50	± 2,69 <sup>bc</sup>	01:47:15	01:54:45	90,90	± 0,71 <sup>c</sup>
<b>Bosana</b>								
<b>1%</b>	31,95	± 0,07 <sup>c</sup>	1,00	± 0,14 <sup>d</sup>	02:35:15	02:16:30	95,90	± 3,25 <sup>b</sup>
<b>2%</b>	23,75	± 0,35 <sup>d</sup>	3,65	± 0,07 <sup>c</sup>	02:39:00	02:27:45	98,80	± 0,00 <sup>a</sup>
<b>3%</b>	13,00	± 3,96 <sup>e</sup>	8,40	± 0,42 <sup>a</sup>	02:24:00	02:26:15	99,10	± 0,14 <sup>a</sup>
<b>5%</b>	12,55	± 0,07 <sup>e</sup>	6,05	± 1,34 <sup>b</sup>	01:46:30	02:30:45	99,20	± 0,14 <sup>a</sup>
<b>Semidana</b>								
<b>1%</b>	41,40	± 0,57 <sup>b</sup>	0,65	± 0,92 <sup>d</sup>	02:48:00	02:23:00	98,85	± 0,07 <sup>a</sup>
<b>2%</b>	32,10	± 1,13 <sup>c</sup>	0,30	± 0,28 <sup>d</sup>	02:57:45	02:30:45	98,95	± 0,21 <sup>a</sup>
<b>3%</b>	25,10	± 6,90 <sup>d</sup>	0,50	± 0,25 <sup>d</sup>	02:53:00	02:35:30	99,16	± 0,21 <sup>a</sup>
<b>5%</b>	19,50	± 0,28 <sup>de</sup>	0,80	± 0,85 <sup>d</sup>	02:51:45	02:38:15	99,20	± 0,14 <sup>a</sup>

\*Lettere diverse all'interno di ciascuna colonna indicano differenze significative secondo ANOVA unidirezionale e Duncan MRT (valore p <0,05).

## Bibliografia

- Alu'datt M.H., Alli I., Ereifej K., Alhamad M., Al-Tawaha A.R., Rababah T. 2010. Optimisation, characterisation and quantification of phenolic compounds in olive cake. *Food Chemistry*, 123(1): 117-122.
- Caponio G.R., Difonzo G., de Gennaro G., Calasso M., De Angelis M., Pasqualone A. 2022. Nutritional Improvement of Gluten-Free Breadsticks by Olive Cake Addition and Sourdough Fermentation: How Texture, Sensory, and Aromatic Profile Were Affected? *Frontiers in nutrition*, pp. 9.
- Chebaibi S., Grandchamp M.L., Burgé G., Clément T., Allais F., Laziri F., 2019. Improvement of protein content and decrease of anti-nutritional factors in olive cake by solid-state fermentation: A way to valorize this industrial by-product in animal feed. *Journal of bioscience and bioengineering*, 128(3): 384-390.
- Cioffi G., Pesca M.S., De Caprariis P., Braca A., Severino L., De Tommasi N. 2010. Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 121(1): 105-111.
- Dal Bosco A., Castellini C., Cardinali R., Mourvaki E., Moscati L., Battistacci L., Servili M., Taticchi A. 2007. Olive cake dietary supplementation in rabbit: immune and oxidative status. *Italian Journal of Animal Science*, 6(sup1): 713-715
- Dal Bosco A., Mourvaki E., Cardinali R., Servili M., Sebastiani B., Ruggeri S., Mattioli S., Taticchi A., Esposito S., Castellini C. 2012. Effect of dietary supplementation with olive pomaces on the performance and meat quality of growing rabbits. *Meat science*, 92(4): 783-788.
- Farbo, M.G., Fadda, C., Marceddu, S., Conte, P., Del Caro, A., Piga, A., 2020. Improving the quality of dough obtained with old durum wheat using hydrocolloids. *Food Hydrocolloids*, 101: 105467.
- Lammi S., Barakat A., Mayer-Laigle C., Djenane D., Gontard N., Angellier-Coussy H. 2018. Dry fractionation of olive pomace as a sustainable process to produce fillers for biocomposites. *Powder Technology*, 326: 44-53.
- Lammi S., Gastaldi E., Gaubiac F., Angellier-Coussy H. 2019. How olive pomace can be valorized as fillers to tune the biodegradation of PHBV based composites. *Polymer Degradation and Stability*, 166: 325-333.
- Palmieri D., Aliakbarian B., Casazza A.A., Ferrari N., Spinella G., Pane B., Cafueri G., Perego P., Palombo D. 2012. Effects of polyphenol extract from olive pomace on anoxia-induced endothelial dysfunction. *Microvascular Research*, 83(3): 281-289.



## **Attitudine alla maltazione di cereali minori per la produzione di bevande fermentate**

*E. Galassi\*, F. Nocente, A. Murru, C. Natale, F. Taddei, L. Gazza*

Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari (CREA-IT), Via Manziana 30, 00189 Roma (RM).

\*E-mail: [elena.galassi@crea.gov.it](mailto:elena.galassi@crea.gov.it)

### **Abstract**

Recently, “minor” cereals are gaining interest due to their particularities not only in nutritional terms but also in rusticity, a characteristic that makes them suitable for cultivation in marginal environments. To date, the use of some of these cereals for the production, both at an artisanal and industrial level, of foods such as pasta and bakery products is already well established, their use for the production of malt and beer is more limited. In this work the aptitude for malting of tritordeum, monococcum wheat, sorghum, teff and triticale was evaluated. The parameters that most influence the processes of malting and transformation into alcoholic beverages were evaluated, such as 1000 seeds weight, test weight, protein content, total starch, falling number, germination capacity, germination energy and amylase activity. Grain analyses showed on average satisfactory values for beer production in all species, while the amylase activity of the malts produced was lower than that normally present in malting barley. Fermented drinks derived from these minor cereals, therefore, could be interesting for the light beer market, and those derived from gluten-free cereals, suitable for the gluten-free market.

### **Riassunto**

Recentemente, l'interesse verso i cereali cosiddetti “minori” è cresciuto notevolmente a seguito delle loro peculiarità non solo in termini nutrizionali ma anche di rusticità, caratteristica che li rende idonei alla coltivazione in ambienti marginali. Ad oggi, l'utilizzo di alcuni di questi cereali per la produzione, sia a livello artigianale che industriale, di alimenti come pasta e prodotti da forno è già ben consolidato, mentre risulta più limitato il loro utilizzo per la produzione di malto e birra. In questo lavoro è stata valutata l'attitudine alla maltazione di tritordeum, grano monococco, sorgo, teff e triticale. Sono stati valutati i parametri che maggiormente influenzano i processi di maltazione e di trasformazione in bevande alcoliche quali peso 1000 semi, peso ettolitrico, contenuto proteico, amido totale, falling number, capacità germinativa, energia germinativa e attività amilasica. Le analisi della granella hanno mostrato valori mediamente soddisfacenti per la produzione di birra in tutte le specie, mentre l'attività amilasica dei malti prodotti è risultata inferiore a quella normalmente presente nel malto dell'orzo da birra. Le bevande fermentate derivate da questi cereali minori, quindi, potrebbero risultare interessanti per il mercato delle birre *light*, e quelle derivate da cereali *gluten-free*, come sorgo e teff, adatte al mercato del senza glutine.

### **Introduzione**

Oggi il settore alimentare attraversa una nuova fase, contraddistinta dalla sfida di conciliare innovazione e tradizione, favorendo la biodiversità vegetale e alimentare e offrendo opportunità di sviluppo ai produttori locali. Nel corso degli ultimi anni si è assistito ad una notevole diffusione della cultura della birra accompagnata da una crescente offerta di birre “artigianali” e alla nascita di numerosi microbirrifici, *brew pub* e *beer firm*. Alla luce di questo, una forte spinta al settore birrario potrebbe derivare dalla coltivazione di cereali non convenzionali da utilizzare in alternativa o in miscela con il malto d'orzo, al fine di realizzare tipologie di birre

innovative. Inoltre, in considerazione della notevole crescita dei casi di intolleranza permanente al glutine (celiachia) e di sensibilità al glutine, le specie cerealicole prive di glutine o caratterizzate da un glutine meno strutturato e maggiormente digeribile, potrebbero essere adatte alla produzione di bevande fermentate a ridotto o a nullo contenuto di glutine (Gebremariam *et al.*, 2012). In questo contesto, una serie di cosiddetti “cereali minori” caratterizzati da buona capacità antiossidante, alto contenuto di vitamine e minerali, basso o nullo indice di glutine come il frumento monococco (*Triticum monococcum* spp. *monococcum*), il tritordeum, il triticale, il sorgo *food grade* (*Sorghum bicolor*) ed il teff (*Eragrostis tef*), possono rappresentare una materia prima idonea per la produzione di birre non convenzionali in previsione dell’espansione del mercato delle birre artigianali (Taylor *et al.*, 2006; Owuama, 1999).

### Materiali e metodi

In questo lavoro è stata utilizzata la granella di sei diversi cereali: una varietà commerciale di orzo, cv Tea, due varietà di grano monococco, cvs Norberto e Hammurabi, una linea di tritordeum, una varietà commerciale di sorgo, due varietà commerciali di teff, a granella marrone e bianca, e una cultivar di triticale, cv Quirinale. Tutte le specie, ad eccezione del teff e del sorgo, sono state coltivate presso i campi sperimentali del CREA-Centro di Ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari, situati a Montelibretti (RM) nell’annata agraria 2017-18. La granella è stata caratterizzata per il peso 1000 semi (ISO 520:2010) e il peso ettolitrico (ISO 7971-1:2009), e ne sono state valutate la capacità germinativa (CG) e l’energia germinativa (EG) secondo le seguenti formule:

$$CG = \frac{n}{N} * 100$$

dove:

N= numero di semi del campione analizzato

n= numero di semi germinati dopo 72 ore

$$EG = \frac{100N}{\sum(n1 * t1) + (n2 * t2) + (ni * ti)}$$

dove:

N= numero di semi del campione analizzato

n= numero di semi germinati nei diversi intervalli di tempo

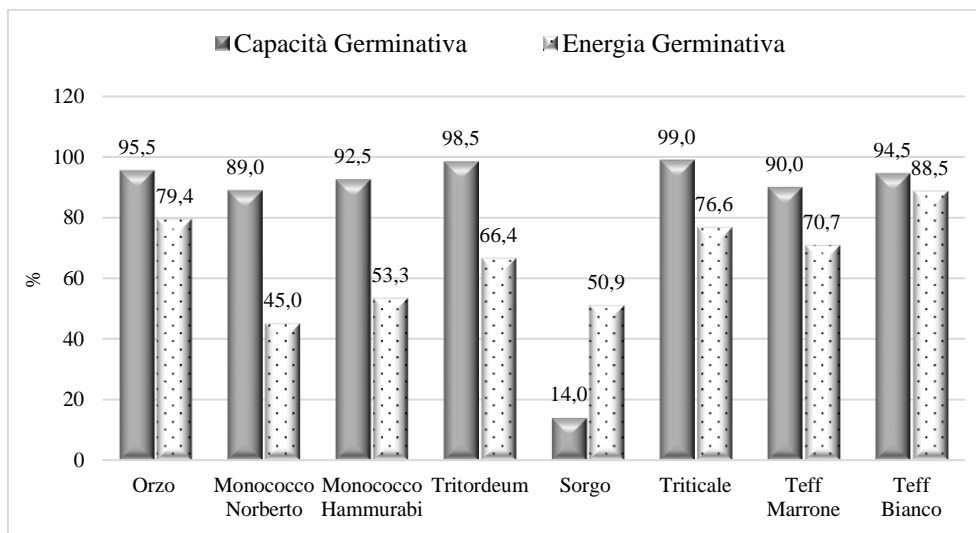
t= tempo in cui i semi sono germinati

In seguito, la granella di tutti i genotipi è stata macinata con il Cyclotech (mod. 1093-Tecator FOSS) e sullo sfarinato integrale sono stati analizzati il contenuto in proteine totali (ICC 105/2, N x 6,25), in amido totale (McCleary *et al.*, 1997) ed il falling number (AACC 56-81b). Infine, è stata determinata l’attività amilasica (betamyl-3® and ceralpha® methods Megazyme) dei malti ottenuti dalle varie specie cerealicole. I dati riguardanti la caratterizzazione nutrizionale e l’attività amilasica sono stati corretti per il valore dell’umidità.

### Risultati e discussione

La capacità germinativa è una misura della capacità della cariosside di germinare ed è considerata un indice di vitalità del seme. Solitamente valori maggiori o uguali al 96% indicano una germinabilità eccellente. Nelle prove di germinabilità (Fig. 1) tutti i campioni hanno mostrato una buona capacità germinativa (89-99%) ad eccezione del sorgo che ha presentato

un valore del 14%. L'energia germinativa è un parametro che esprime la rapidità con la quale il seme germina e, di conseguenza, la capacità della cariosside di superare la fase di dormienza. Un seme con una buona energia germinativa generalmente mostra una nascita omogenea, fondamentale nel processo di maltazione. L'energia germinativa più alta è stata ottenuta nei campioni di teff bianco (88,4%) ed orzo (79,6%), mentre il grano monococco cv Norberto ha mostrato il dato minore (45%) tra tutti i cereali analizzati (Fig. 1).



**Figura 1.** Capacità germinativa ed energia germinativa di orzo, grano monococco cv Norberto, grano monococco cv Hammurabi, tritordeum, sorgo, triticale, teff marrone e teff bianco.

Considerando che i valori ottenuti sono strettamente legati alle condizioni sperimentali della prova, si può ipotizzare che modificando i parametri che influenzano maggiormente la germinazione (temperatura, umidità etc.) sia possibile ottenere valori di energia germinativa migliori e creare un protocollo di maltazione specifico per ogni cereale.

Il peso dei mille semi è una misura che fornisce una indicazione sulle dimensioni delle cariossidi, prerequisito importante della qualità della maltazione e birrificazione. Questo parametro è influenzato significativamente dal fattore varietale e dalle condizioni ambientali. I valori di peso 1000 semi del tritordeum (33,5 g), del grano monococco cv Hammurabi (33,4 g) e del triticale (42,6 g) sono risultati più alti rispetto a quelli ottenuti per l'orzo (26,0 g), utilizzato come riferimento (Tab. 1). Le due varietà di teff, come atteso per via delle dimensioni, hanno mostrato i valori più bassi (0,3 g). Il peso ettolitrico è un parametro di qualità merceologica globale che indica il grado di riempimento della cariosside. Il peso ettolitrico più elevato è stato riscontrato nei campioni di teff bianco e marrone (rispettivamente 89 e 87 kg/hl) mentre il sorgo ha mostrato il valore più basso (72,6 kg/hl) tra tutti i campioni analizzati (Tab. 1).

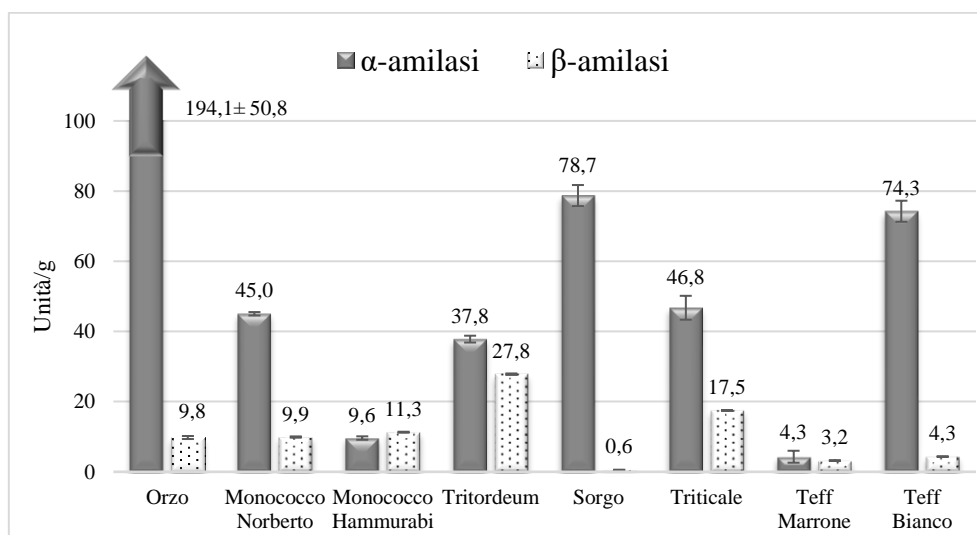
Un elevato contenuto in amido è una prerogativa importante per la produzione di malto in quanto correlato con la quantità di zuccheri fermentescibili che saranno utilizzati dal lievito durante la fermentazione, nonché con il grado alcolico della bevanda risultante. Come riportato in Tabella 1, il sorgo e il teff sono i cereali che hanno mostrato un contenuto in amido più elevato, rispettivamente 79,4% e 78,5%. Relativamente al contenuto proteico, i risultati (Tab. 1) hanno evidenziato valori molto alti nelle due varietà di monococco, Hammurabi (19,3%) e Norberto (19,9%), mentre i cereali che hanno mostrato i valori più bassi sono risultati il sorgo (10,5%) ed il teff bianco (11%), caratteristica che li rende maggiormente idonei per la produzione della birra, in quanto un contenuto proteico eccessivo rischia di influenzare

negativamente la stabilità chimico-fisica del prodotto finale. Infine, i valori di falling number dei cereali analizzati sono risultati tutti superiori ai 300 secondi (Tab. 1), indice di bassa attività enzimatica.

**Tabella 1.** Parametri merceologici e nutrizionali di orzo, grano monococco, tritordeum, sorgo, triticale e genotipi di teff a granella bianca e marrone.

	Peso 1000 semi g	Peso ettolitrico Kg/hL	Amido totale % s.s.	Contenuto proteico % s.s.	Falling Number sec
<b>Orzo</b>	26,0±0,1	73,5±0,4	64,4±0,1	11,3±0,1	303±7
<b><i>T. monococcum</i> cv Hammurabi</b>	33,4±0,4	79,4±0,3	54,9±0,2	19,0±0,1	414±2
<b><i>T. monococcum</i> cv Norberto</b>	23,8±0,7	80,1±1,4	51,9±0,2	19,9±0,2	356±14
<b>Tritordeum</b>	33,5±0,9	82,7±0,7	61,9±0,7	17,5±0,1	383±6
<b>Sorgo</b>	24,2±0,4	72,6±0,6	79,5±0,9	10,5±0,3	473±11
<b>Triticale</b>	42,6±1,2	76,4±0,2	63,3±0,3	15,2±0,1	305±3
<b>Teff bianco</b>	0,27±0,01	88,9±0,2	78,5±1,3	11,0±0,1	623±15
<b>Teff marrone</b>	0,26±0,02	86,9±0,3	77,3±0,4	11,6±0,1	431±1

L'attività amilasica è fondamentale per la degradazione dell'amido in zuccheri fermentescibili, i quali saranno utilizzati dal lievito durante la fermentazione per la produzione di alcol etilico e CO<sub>2</sub>. I malti di sorgo e teff bianco hanno evidenziato l'attività α-amilasica più elevata (78,7 74,3 CU/g), anche se pari a meno della metà di quella dell'orzo di riferimento, mentre l'attività β-amilasica ha registrato i valori più alti nel tritordeum (27,8 B3U/g) e nel triticale (17,5 B3U/g).



**Figura 2.** Attività amilasica dei malti di orzo, grano monococco cv Norberto, grano monococco cv Hammurabi, tritordeum, sorgo, triticale, teff marrone e teff bianco.

I risultati ottenuti indicano che i malti analizzati non hanno un'attività amilasica paragonabile a quella riscontrata nei malti di orzo da birra; pertanto, l'attività è risultata insufficiente per garantire una quantità idonea di zuccheri fermentescibili, tuttavia, essendo il mercato delle birre

light un mercato in espansione, questo tipo di bevande potrebbe comunque risultare interessante per questo settore. Diversamente, i malti prodotti potrebbero essere utilizzati in combinazione con altri malti per la produzione di birre non convenzionali non ancora presenti sul mercato, oppure, nel caso di sorgo e teff, per la produzione di birre *gluten-free*.

In conclusione, la coltivazione di cereali minori insieme ad un loro utilizzo per la produzione di birra, può rappresentare un interessante sviluppo futuro per la creazione di micro-filiere di produzione birraria strettamente legate al territorio di origine delle materie prime agricole.

### **Bibliografia**

AACC 2010. *American Association of Cereal Chemists, Approved Methods of Analysis*, 11<sup>th</sup> ed. 56-81B Determination of falling number. St. Paul, MN, USA.

Gebremariam, M.M., Zarnkow, M., Becker, T. 2012. Teff (*Eragrostis tef*) as a raw material for malting, brewing and manufacturing of gluten-free foods and beverages. *The Journal of Food Science and Technology*, 51: 1-15.

ICC 2003. *International Association for Cereal Science and Technology, Standard Methods* No. 105/2; ICC: Vienna, Austria.

ISO 2009. *International Organization for Standardization. Determination of Bulk Density, Called Mass per Hectolitre-Part 1: Reference Method; Method 7971-1:2009*; ISO: Geneva, Switzerland.

ISO 2010. *International Organization for Standardization. Cereals and Pulses-Determination of the Mass of 1000 Grains; Method 520:2010*; ISO: Geneva, Switzerland.

McCleary, B.V.; Gibson, T. S.; Lugford, D.C. 1997. Measurement of total starch in cereal products by amyloglucosidase- $\alpha$ -amylase method: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 80: 571-579.

Owuama C. I. 1999. Brewing beer with sorghum. *Journal Institute of Brewing*, 105: 23-34.

Taylor J.R.N., Schober T.J., Bean S.R. 2006. Novel food and non-food uses for sorghum and millets. *Journal of Cereal Science*, 44: 252-271.

## Valutazione dell'uso di triticale (*Triticosecale spp. W*) per la produzione della birra

O. Marconi<sup>1,2</sup>, G. De Francesco<sup>1</sup>, E. Bravi<sup>1\*</sup>, F. Nocente<sup>3</sup>, C. Cantale<sup>4</sup>, L. Gazza<sup>3</sup>, A. Latini<sup>4</sup>, P. Galeffi<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Università di Perugia, Centro di Ricerca per l'eccellenza della Birra, Via San Costanzo, 06126 Perugia (PG).

<sup>2</sup>Università di Perugia, Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Borgo XX Giugno, 06121 Perugia (PG).

<sup>3</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari (CREA-IT), Via Manziana 30, 00189 Roma (RM).

<sup>4</sup>ENEA, Cr Casaccia, Via Anguillarese 301, 00123 Roma (RM).

\*E-mail: [e\\_bravi@yahoo.it](mailto:e_bravi@yahoo.it); [www.cerb.unipg.it](http://www.cerb.unipg.it)

### Abstract

The high alpha-amylase activity and the excellent protein content make the triticale as an interesting cereal to be used in various fields of industrial application, from the production of bioethanol and biofuels to use as a substitute or as a raw material to produce beer and other fermented beverages (Ambriz-Vidal *et al.*, 2019; García-Aparicio *et al.*, 2011; Grujić and Pejin, 2007). In this study, three lines of triticale were analyzed to evaluate their use, both as it is and malted, for the production of beer. The malted cereal and the unmalted counterpart were subjected to assessment of the aptitude for brewing through different methods (extract, saccharification time, pH, total nitrogen, proteins, Kolbach index, FAN, fermentability, humidity, color, friability). The results of the analysis of the unmalted triticale showed a reduced enzymatic power and therefore a low extract of the obtained musts. On the contrary, the musts obtained from malted triticale had an extract and a saccharification time comparable to a barley or wheat malt. The friability, on the other hand, was very similar to a wheat malt.

### Riassunto

L'elevata attività alfa-amilasica e l'ottima dotazione proteica, ricorrenti in molte varietà di triticale, ne fanno un cereale interessante da utilizzare in diversi campi di applicazione industriale, dalla produzione di bioetanolo e biocarburanti all'utilizzo come succedaneo o come materia prima nella produzione di birra e altre bevande fermentate (Ambriz-Vidal *et al.*, 2019; García-Aparicio *et al.*, 2011; Grujić and Pejin, 2007). In questo studio, tre linee di triticale sono state analizzate per valutarne l'utilizzo, sia tal quale che maltato, per la produzione di birra. Il cereale maltato e la controparte non maltata sono stati sottoposti a valutazione dell'attitudine alla birrificazione attraverso diverse metodiche (estratto, tempo di saccarificazione, pH, azoto totale, proteine, indice Kolbach, FAN, fermentabilità, umidità, colore, friabilità). I risultati delle analisi del triticale non maltato hanno evidenziato un ridotto potere enzimatico e pertanto un basso estratto dei mosti ottenuti. Al contrario, i mosti ottenuti dal triticale maltato hanno avuto un estratto e un tempo di saccarificazione paragonabile ad un malto di orzo o di frumento. La friabilità, invece, è stata molto simile ad un malto di frumento.

### Introduzione

Il triticale (*Triticosecale Wittmack*) è stato sviluppato nel 1875 incrociando segale (genitore maschio) e frumento (genitore femmina). La composizione chimica del triticale sembra essere più simile al grano che alla segale. Recentemente si sta valutando l'uso del triticale per la produzione di alimenti e biocarburanti (McGoverin *et al.*, 2011). Allo stesso modo, molti lavori hanno studiato il possibile utilizzo di triticale per la produzione di pane e pasta (Fraś *et al.*,

2018; Glatthar *et al.*, 2005; Kaszuba *et al.*, 2021; Tohver *et al.*, 2005). Sebbene abbia interessanti proprietà nutrizionali, come dimostrato da alcuni lavori, l'uso del triticale come alimentazione umana è tuttora ridotto (Zhu, 2018). Attualmente la produzione di prodotti a base di triticale non è ancora su larga scala ma si basa principalmente su noodle, biscotti e prodotti dolciari. Per i primi vengono utilizzate varietà dalla cariosside più dura, per i secondi cariossidi più tenere e friabili (McGoverin *et al.*, 2011). Tuttavia, la composizione in carboidrati e proteine lo rendono un cereale interessante per lo sviluppo di nuovi alimenti e bevande. Inoltre, ricercatori e produttori sono fortemente interessati al Triticale in quanto rappresenta un cereale che ben si adatta a tutte le condizioni pedoclimatiche, anche quelle meno favorevoli rispetto ai cereali tradizionali. In questo lavoro tre diverse linee di triticale, provenienti dal raccolto degli anni 2020, e fornite dall'ENEA di Roma, Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile verranno studiate per valutare il loro utilizzo, come cereale tal quale e maltato, per la produzione di una birra. Il cereale maltato e la controparte non maltata sono stati sottoposti a valutazione dell'attitudine alla birrificazione attraverso diverse metodiche (estratto, tempo di saccarificazione, pH, azoto totale, proteine, indice Kolbach, FAN, fermentabilità, umidità, colore, friabilità).

## **Materiali e metodi**

### **Impianto pilota malto**

Per questo studio sono state prese in considerazione tre linee di triticale raccolte nell'annata 2020, perché la grande variabilità offerta dalle diverse cultivar ci permette di trovarne di più adatte allo scopo. Le linee sono state prodotte nei campi sperimentali dell'ENEA di Roma (ea2, linea4 e linea7). Le varie prove di maltaggio sono state svolte in una micromalteria (Custom Products Laboratory, Pioneer House, 9 Bond Ave, Bletchley, Milton Keynes MK1 1SW, Regno Unito) e messa a disposizione dal CERB dell'Università degli Studi di Perugia. L'impianto si compone di un sistema semi-automatico in acciaio controllato da un computer esterno, è costituito da due unità fondamentali: un modulo di macerazione/germinazione e un modulo per l'essiccamento. La Tabella 1 riporta il disegno sperimentale per l'individuazione del programma di maltazione ottimale e la successiva replica con le linee. Durante le prove di maltazione, data la stretta discendenza della triticale dal frumento e dalla segale, sono stati applicati simili curve di steeping e germinazione. Sono stati eseguiti 3 differenti metodi di steeping e germinazione (W01, W02, W03) per individuare le migliori condizioni di maltazione, variando i tempi delle fasi di immersione ed asciugatura e mantenendo inalterate le temperature e la durata della fase di germinazione. Per la determinazione dei fattori qualitativi per la valutazione del triticale come potenziale sostituto del malto d'orzo in birrificazione sono stati utilizzati i metodi dell'Analytica EBC.

### **Analisi chimico fisiche del triticale non maltato**

Le analisi svolte sul triticale non maltato sono le seguenti: Umidità (ANALYTICA EBC 3.2/1997); Azoto totale sul secco (ANALYTICA EBC 3.3.1/2004); Proteine totali sul secco (ANALYTICA EBC 3.3.1/2004).

### **Analisi chimico fisiche dei malti di triticale**

Di seguito sono elencate le analisi che sono state svolte per quanto riguarda triticale e malto di triticale: Umidità (ANALYTICA EBC 4.2/2000); Estratto-tal quale (A-EBC 4.5.1/2004 + A-EBC 4.2/2000); Estratto-sul secco (A-EBC 4.5.1/2004 + A-EBC 4.2/2000); Tempo di saccarificazione (A-EBC 4.5.1 2004); pH a 20°C (A-EBC 8.17/1999 + A-EBC 4.5.1/2004); Azoto totale-tal quale (A-EBC 4.3.1 / 2004); Azoto totale-sul secco (A-EBC 4.3.1 / 2004); Proteine totali (A-EBC 4.3.1 / 2004); Indice Kolbach (A-EBC 4.9.1 (8.1.4) / 1997); FAN (A-EBC 4.2/2000 + A-EBC 4.5.1/2004 + A-EBC 4.10/1997 + A-EBC 8.10.1/2015); Fermentabilità (A-EBC 4.11.1/1999 + A-EBC 4.5.1/2004); Colore (A-EBC 4.7.1/2000 + A-EBC 4.5.1/2004); Friabilità (A-EBC 4.15 / 2015).

Le analisi sopra riportate sono state eseguite sul triticale maltato in duplicato.

**Tabella 1.** Programmi di maltazione adottati per testare le tre linee di triticale

	WA01		WA02			WA03	
<b>STEEPING</b>							
	Fase di immersione (ore e °T)	Fase asciutta (ore e °T)	Fase di immersione (ore e °T)	Fase asciutta (ore e °T)		Fase di immersione (ore e °T)	Fase asciutta (ore e °T)
<b>Steeping</b>	7 ore a 20 °C	6 ore a 20 °C	4 ore a 20 °C	6 ore a 20 °C		6 ore a 20 °C	12 ore a 20 °C
	7 ore a 18 °C	6 ore a 18 °C	4 ore a 18 °C	6 ore a 18 °C		6 ore a 18 °C	12 ore a 18 °C
	7 ore a 16 °C	germinazione	4 ore a 16 °C	germinazione		6 ore a 16 °C	germinazione
<b>Ore tot. steeping</b>	<b>33</b>		<b>24</b>			<b>42</b>	
<b>GERMINAZIONE</b>							
	6 giorni a 16 °C		6 giorni a 16 °C			6 giorni a 16 °C	
<b>Umidità in germinazione</b>	44 %		40 %			46 %	
<b>ESSICCAMENTO</b>							
<b>Withering</b>	Durata (ore)	Temperatura (°C)	Ricircolo aria (%)				
	12	55	0				
	2,5	72	20				
<b>Colpo di fuoco</b>	2,5	82	70				

### Analisi statistica

Le prove di maltazione e le analisi sono state effettuate in doppio. Per valutare le differenze significative tra i vari campioni sono stati effettuati i seguenti test statistici ANOVA,  $p < 0.05$  e (Statgraphics Centurion XVI version 16.1.11, StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA).

### Risultati e discussioni

Il triticale non maltato ha presentato una ottimale umidità per un corretto stoccaggio (Tab. 2). Il contenuto in proteine è risultato sopra il 12,5 % per tutti i campioni. Un valore in linea con un frumento ma superiore all'orzo da birra. Il programma di maltazione è stato settato come per un frumento (Tab. 2). Il triticale non maltato ha presentato un estratto inferiore rispetto al corrispondente maltato (Tab. 3 e 4). L'estratto del triticale non maltato (Tab. 3) è stato inferiore allo standard commerciale dell'80 % circa. Interessante è la differenza significativa tra le linee, la linea 7 ha avuto un estratto del 74,7 %, più alto della linea 4 e 2. Il triticale è il cereale con il più alto contenuto di amilasi, anche se non maltato. Tale caratteristica potrebbe essere sfruttata per utilizzarlo come succedaneo non maltato in elevate quantità. Inoltre, potrebbe essere usato



come materia prima di una bevanda fermentata prodotta a partire da un cereale non maltato senza l'ausilio di enzimi esogeni, al contrario di quanto avviene con altri cereali (Cimini *et al.*, 2017; Kordialik-Bogacka *et al.*, 2018; Steiner *et al.*, 2012). In questo caso il triticale non maltato non ha presentato un quantitativo di enzimi amilolitici in grado di portare a termine la saccarificazione dopo 60 minuti (Tab. 3). In un malto la saccarificazione avviene in meno di 10 minuti, così come riscontrato nel malto di triticale (Tab. 4). La scarsa modificazione e solubilizzazione di zuccheri e proteine è confermata anche dai risultati della fermentabilità. L'indice Kolbach inoltre dimostra come le proteasi endogene alla triticale non siano sufficienti a stabilire un grado di modificazione proteica adeguato.

**Tabella 2.** Risultati delle analisi del triticale non maltato. n=2

<b>Triticale</b>	<b>linea2</b>	<b>linea4</b>	<b>linea7</b>
<b>Umidità (%)</b>	12,9 ± 0,4	12,7 ± 0,4	12,3±0,4
<b>Azoto totale % ss</b>	2,3 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,5±0,1
<b>Proteine % ss</b> <b>(N*5,70)</b>	13,3 ± 0,6	12,7 ± 0,6	14,5±0,6

**Tabella 3.** Parametri qualitativi del triticale non maltato dopo ammostamento.

	<b>Ammostamento 1: 2h a 70°C</b>			<b>Ammostamento 2: Congress standard</b>		
	<b>linea 2</b>	<b>linea4</b>	<b>linea 7</b>	<b>linea 2</b>	<b>linea 4</b>	<b>linea 7</b>
<b>Estratto s.s. (%)</b>	71,9b	68a	74,6c	69,1a	68a	74,7c
<b>Tempo di saccarificazione (min)</b>	>60	>60	>60	>60	>60	>60
<b>pH</b>	6,51a	6,39a	6,52a	6,51a	6,29a	6,47a
<b>Fermentabilità (%)</b>	54,2ab	63,2c	56b	56,5b	49,5a	56b
<b>Indice Kolbach (%)</b>	18,9°	18,8°	18,2°	18,9°	19,1°	17,6°
<b>FAN (mg/l)</b>	20,0b	20,0b	27,0c	17,0a	24,0c	26,0c

Lettere differenti sulla stessa riga indicano differenze statisticamente significative. P≤0,05. n=2. (s.s.=sostanza secca)

**Tabella 4.** Parametri qualitativi del malto di triticale ottenuto da differenti programmi di steeping.

<b>Triticale</b>	<b>T7 W01</b>	<b>T4 W01</b>	<b>T2 W01</b>	<b>T7 W02</b>	<b>T4 W02</b>	<b>T2 W02</b>	<b>T7 W03</b>	<b>T4 W03</b>	<b>T2 W03</b>
<b>Umidità (%)</b>	4,30a	4,40ab	4,60ab	4,70ab	4,90ab	5,10ab	5,00ab	5,10ab	5,30b
<b>Estratto (%ss)</b>	84,10a	82,90a	82,90a	83,00a	83,20a	83,20a	83,30a	82,80a	82,90a
<b>Saccarificazione (min)</b>	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
<b>pH</b>	5,76a	5,80ab	5,83ab	5,97b	5,88ab	5,87ab	5,82ab	5,90ab	5,96b
<b>Colore (EBC)</b>	10,20c	9,30c	8,80c	8,00b	8,20b	6,30a	7,30ab	7,40ab	6,50a
<b>Proteine totali (%ss)</b>	13,68b	13,22ab	12,94ab	13,85b	12,20a	13,11ab	13,40ab	12,26a	13,62b
<b>Kolbach (%)</b>	57,6d	47,6bc	51,1c	49,3bc	44,8ab	43,6a	54,9d	48,7bc	47,0bc
<b>Friabilità (%)</b>	58,00d	58,00d	43,00b	48,00c	48,00c	39,00a	53,00c	52,00c	40,00a

Lettere differenti sulla stessa riga indicano differenze statisticamente significative. P≤0,05. n=2. (s.s.=sostanza secca)

Le tre linee di triticale maltato hanno presentato un elevato estratto per tutti i programmi di maltazione testati, con valori oltre l'80 % in linea con gli standard di un malto d'orzo. Il tempo di saccarificazione inferiore ai 10 minuti conferma l'elevato potenziale enzimatico del malto di triticale. L'azoto totale mediamente risulta essere il 2,3% sulla sostanza secca, correlato ad un contenuto proteico del 13,1% sempre sulla sostanza secca, entrambi i valori in diminuzione rispetto al cereale grezzo che però sono giustificati da un indice Kolbach, mediamente del 49,4%, e una percentuale di azoto solubile del 1,1%, entrambi i valori più che raddoppiati,

sinonimo di un'intensa attività proteolitica durante le fasi di maltazione. Possiamo individuare come la linea T7 sia la varietà che complessivamente ha dato i risultati migliori anche se sottoposta a differenti metodologie di maltazione, questo pone l'accento sull'importanza di uno studio approfondito delle diverse varietà in commercio per valutare quelle che si adattano meglio ai processi di maltazione e birrificazione.

### Conclusioni

Lo scenario attuale della produzione della birra favorisce la sperimentazione di cereali minori con lo scopo di offrire al consumatore nuovi prodotti. Il triticale, incrocio tra frumento e segale, merita attenzione come succedaneo o come materia prima per lo sviluppo di una birra o di una bevanda fermentata. Alcuni studi riportano che il triticale presenta una elevata attività amilolitica anche se non maltato. Potrebbe essere un cereale interessante anche dal punto di vista ambientale in quanto potrebbe diventare una materia prima autosaccarificante senza l'ausilio della maltazione. Il triticale non maltato non ha mostrato sufficiente potere diastatico per terminare la saccarificazione in tempi utili. Tutti le linee testate non hanno saccarificato dopo 60 minuti. Le varietà analizzate non possono essere utilizzate come sostituto maggioritario ai malti tradizionali, si sta predisponendo una sua valutazione all'utilizzo come succedaneo amidaceo. Al contrario il malto di triticale si conferma come materia prima di interesse birrario, con estratto e tempo di saccarificazione paragonabili ad un malto di frumento. Il lavoro proseguirà con la produzione di una birra 100 % malto di triticale.

### Bibliografia

- Ambriz-Vidal T.N., Mariezcurrena-Berasain M.D., Heredia-Olea E., Pinzon Martinez D.L., Gutierrez-Ibañez A.T., 2019. Potential of Triticale (X Triticosecale Wittmack) Malts for Beer Wort Production. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 77: 282-286. <https://doi.org/10.1080/03610470.2019.1670030>
- Cimini A., De Francesco G., Perretti G. 2017. Effect of crossflow microfiltration on the clarification and stability of beer from 100% low- $\beta$ -glucan barley or malt. *LWT* 86: 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.033>
- Fraś A., Gołębiowski D., Gołębiowska K., Mańkowski D.R., Gzowska M., Boros D., 2018. Triticale-oat bread as a new product rich in bioactive and nutrient components. *Journal of Cereal Science*, 82: 146-154. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.05.001>
- García-Aparicio M., Trollope K., Tyhoda L., Diedericks D., Görgens J. 2011. Evaluation of triticale bran as raw material for bioethanol production. *Fuel* 90: 1638-1644. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2010.10.049>
- Glatthar J., Heinisch J.J., Senn T., 2005. Unmalted triticale cultivars as brewing adjuncts: Effects of enzyme activities and composition on beer wort quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 647-654. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1941>
- Grujić O.S., Pejin J.D. 2007. The application of triticale malt as the substitute for barley malt in wort production. *Acta Periodica Technologica*, 38: 117-126. <https://doi.org/10.2298/APT0738117G>
- Kaszuba J., Jaworska G., Krochmal-Marczak B., Kogut B., Kuźniar P. 2021. Effect of bran addition on rheological properties of dough and quality of triticale bread. *Journal of Food Processing and Preservation* 45. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15093>
- Kordialik-Bogacka E., Bogdan P., Pielech-Przybylska K., Michałowska D. 2018. Suitability of unmalted quinoa for beer production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98: 5027-5036. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9037>
- McGoverin C.M., Snyders F., Muller N., Botes W., Fox G., Manley M. 2011. A review of triticale uses and the effect of growth environment on grain quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91: 1155-1165. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4338>
- Steiner E., Auer A., Becker T., Gastl M. 2012. Comparison of beer quality attributes between beers brewed with 100% barley malt and 100% barley raw material. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92: 803-813. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4651>
- Tohver M., Kann A., Täht R., Mihhalevski A., Hakman J. 2005. Quality of triticale cultivars suitable for growing and bread-making in northern conditions. *Food Chemistry*, 89: 125-132. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.079>
- Zhu F. 2018. Triticale: Nutritional composition and food uses. *Food Chemistry*, 241: 468-479. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.009>

## **Determinazione di marker di processo in grano duro nazionale e canadese sottoposti a macinazione e decorticazione**

*S. Marzocchi<sup>1\*</sup>, F. Pasini<sup>1</sup>, M. C. Messia<sup>2,3</sup>, E. Marconi<sup>2,3</sup>, M. F. Caboni<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Università di Bologna, Piazza Goidanich 60, 47521 Cesena (FC).

<sup>2</sup>Dipartimento Agricoltura Ambiente e Alimenti (DiAAA), Università degli Studi del Molise, Via Francesco De Sanctis, 86100 Campobasso (CB).

<sup>3</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (CREA-AN), Via Ardeatina 546, 00178 Roma (RM).

\*E-mail: [silvia.marzocchi4@unibo.it](mailto:silvia.marzocchi4@unibo.it)

### **Abstract**

Production of whole grains represents a problem due to the perishability of the lipid fraction and the lack of integral indicators. The aim of the research was the study of process lipid markers in the fractions obtained by grinding and decortication to characterise the final integral mixture. Samples from Italian (NZ) and Canadian (CN) wheat milling process (grain, bran, fine bran, semolina and waste) and samples from different decortication levels of the same wheat (3, 6, 9, 12 and 15 % and waste) were characterised in tocopherols, fatty acids and phytosterols. The 15% decortication waste (DW) of NZ showed the maximum concentration of tocopherols, with higher values than previous decortications and CN. The  $\gamma$ -tocopherol was present in the DW but not in the decorticated grain; it reached the maximum in the NZ bran; while in the CN it was found only in grain and bran. Oleic acid in CN bran and fine bran was higher than in NZ, equally for linoleic and palmitic acid present in semolina and refining waste.  $\beta$ -sitosterol was the main sterol identified, more concentrated in semolina and grinding waste than in grain; in general it had a higher concentration in CN. Tocopherols, fatty acids, and phytosterols can be markers for milling/decortication process and to improve the traceability of wheat, as differences between NZ and CN have been observed.

### **Riassunto**

La produzione di sfarinati integrali rappresenta un problema a causa della deperibilità della frazione lipidica e della mancanza di indicatori di integralità. L'obiettivo è stato quello di studiare marker lipidici di processo di macinazione/decorticazione per rendere più chiara la miscela di sfarinato integrale finale. Tococromanoli, acidi grassi e fitosteroli sono stati determinati in campioni ottenuti dalla macinazione di grano nazionale (NZ) e canadese (CN) (grano, crusca, cruschetto, semola e scarto) e in campioni ottenuti dalla decorticazione dello stesso frumento. Lo scarto di decorticazione (SD) al 15% di NZ aveva la concentrazione massima di tococromanoli, con valori superiori alle decorticazioni precedenti e CN. Il  $\gamma$ -tocoferolo era presente nel SD, ma non nel grano decorticato e raggiungeva il massimo nella crusca di NZ; mentre nel CN si trovava solo in grano e crusca. L'acido oleico in crusca e cruschetto di CN era superiore a NZ, stesso andamento per l'acido linoleico e palmitico che erano presenti in semola e scarto di macinazione. Il  $\beta$ -sitosterolo era il principale sterolo identificato, più concentrato in semola e scarto di macinazione rispetto alla granella; in generale i fitosteroli erano maggiormente concentrati in CN. Tococromanoli, acidi grassi e fitosteroli rappresentano marker sia di macinazione/decorticazione che della tracciabilità del grano, viste le differenze osservate tra NZ e CN.

### **Introduzione**

Gli sfarinati attualmente in commercio vengono ottenuti dal processo di macinazione in cui si susseguono una serie di passaggi di rottura, setacciamento e rimacina, nei quali l'endosperma

della cariosside del grano viene separato dal resto per trasformarlo in farina o semola. Le altre parti del chicco (ricche in fibra, vitamine e minerali) sono considerate dei sottoprodotti, principalmente crusca e cruschetto. I prodotti ottenuti dal grano duro destinati all'alimentazione umana sono regolamentati dalla legge 580/1967 modificata dal DPR 187/2001, in cui gli sfarinati sono classificati in funzione del grado di raffinazione caratterizzato dal tenore in ceneri. Attualmente, nella maggior parte dei casi, gli sfarinati integrali vengono ottenuti dall'aggiunta della crusca e cruschetto agli sfarinati raffinati. Ciò ha portato ad avere dei prodotti con caratteristiche compositive e proprietà tecnologiche molto differenti, avendo un impatto anche sulle caratteristiche organolettiche dei prodotti a base di sfarinati integrali, come pane e pasta, questo perché nel regolamento sopra citato manca una definizione chiara e precisa. Infatti, è emerso che la definizione di prodotto integrale e della sua composizione in sostanze benefiche per la salute non è sempre chiara ed univoca ed emerge che i prodotti cosiddetti integrali possono derivare da sfarinati con caratteristiche compositive e proprietà reologiche assai differenti. Per questo motivo è nato il progetto PRIN 2015 (Prot. 2015 MFP4RC), supportato dal MIUR, che ha l'obiettivo di proporre nuove tipologie e definizioni di sfarinati integrali per racchiuderli all'interno di un'unica definizione di "sfarinato integrale" e "prodotto a base di sfarinato integrale". Inoltre, nel 2017 è stato presentato al governo un provvedimento per modificare gli articoli 1 e 2 del regolamento 187/2001. Esso ha gli obiettivi di individuare le caratteristiche compositive, affinché la farina e la semola possano essere definite integrali, provvedendo a fornire la definizione di "farina integrale di grano tenero", "semola integrale di grano duro", "farina integrale senza germe di grano tenero" e "semola integrale senza germe di grano duro". Al fine di raggiungere tale scopo sono stati ottenuti sfarinati integrali di grano duro con diversi sistemi di macinazione per differenziarli e classificarli in base alle differenze qualitative e tecnologiche emerse. In particolare, è stata condotta una analisi qualitativa e quantitativa di tocoferoli, acidi grassi e fitosteroli presenti nelle varie frazioni di sfarinati integrali ottenuti attraverso il processo di macinazione e di decorticazione più o meno spinti. Questo al fine di individuare dei markers di origine lipidica per differenziare le diverse frazioni. Infatti, conoscendo la composizione e la quantità di questi markers è possibile capire quali frazioni della cariosside del frumento siano state miscelate con gli sfarinati raffinati. Inoltre, l'analisi è stata condotta sia su campioni di grano nazionale che di grano canadese per valutare se questi markers possono contribuire al miglioramento della tracciabilità.

## **Materiali e metodi**

### ***Campioni***

I campioni provenienti dalla macinazione di grano nazionale (NZ) e grano canadese (CN) analizzati erano i seguenti: granella tal quale (GD), crusca (CRU), cruschetto (CLO), semola raffinata (SemR) e scarto di macinazione (ScR).

I campioni ottenuti invece dalla decorticazione di grano italiano (NZ) e canadese (CN) erano i seguenti: granella decorticata al 3, 6, 9, 12 e 15 % (GD3, GD6, GD9, GD9, GD12, GD15) e i relativi scarti di decorticazione (SD3, SD6, SD9, SD12, SD15).

### ***Estrazione lipidica***

La frazione lipidica dai diversi campioni ottenuti dalla macinazione e decorticazione di grano italiano e canadese è stata estratta a partire da 10 g di campione con esano nell'apparecchio Soxhlet (Behr Labor-Technik, Fischer Scientific Italia, Milano) (metodo ufficiale AOAC). La frazione lipidica è stata recuperata con esano:isopropanolo (4:1 v/v) e mantenuta a -18 °C fino al momento delle analisi. Ogni estrazione è stata condotta 2 volte ( $n=2$ ).

### **Determinazione degli acidi grassi**

La composizione in acidi grassi è stata condotta mediante analisi gas cromatografica dopo trattamento alcalino della frazione lipidica in accordo con Marzocchi *et al.* (2018). L'identificazione è stata realizzata mediante l'utilizzo di una miscela di standards, GLC-463 standard mixture (Nu-Check, Elysian. MN. USA) ed espressa in percentuale (%). La composizione in acidi grassi è stata condotta in 2 repliche per ogni estratto lipidico ( $n=4$ ).

### **Determinazione dei tococromanoli**

La determinazione dei tococromanoli è stata condotta come descritto da Ben Lajnef *et al.* (2017). L'identificazione dei composti è avvenuta attraverso l'iniezione di standards e la quantificazione attraverso la costruzione di una retta di taratura di  $\alpha$ -tocoferolo (da 1 a 100  $\mu\text{g/mL}$ ). L'analisi è stata condotta in doppio per ogni estratto lipidico ( $n=4$ ).

### **Determinazione dei fitosteroli**

La determinazione dei fitosteroli è stata condotta come riportato da Marzocchi *et al.* (2018). L'identificazione dei fitosteroli è stata condotta mediante l'iniezione di standards e l'utilizzo dei dati riportati in bibliografia (Pelillo *et al.*, 2003). L'analisi è stata condotta in doppio per ogni estratto lipidico ( $n=4$ ).

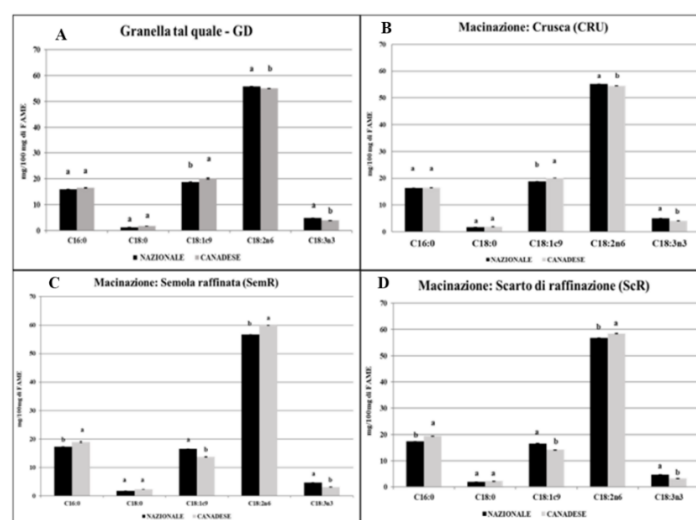
### **Analisi statistica**

L'analisi della varianza mediante ANOVA è stata valutata utilizzando il software Statistica 8 (2006, StatSoft, Tulsa, OK, USA). I valori di  $p$  inferiori a 0,05 sono stati considerati statisticamente significativi mediante il test di Tukey Honest Significant Difference (HSD).

## **Risultati e discussione**

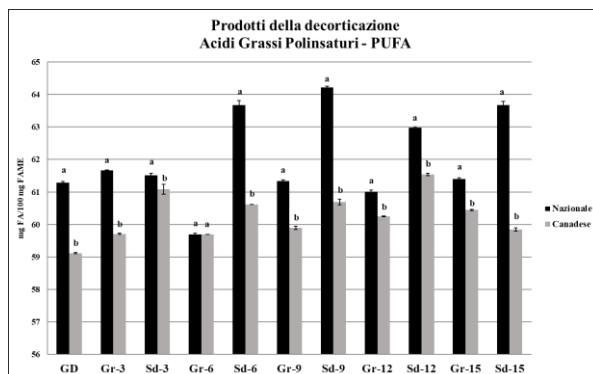
### **Determinazione degli acidi grassi**

In Figura 1 sono riportate le concentrazioni in acidi grassi nei campioni analizzati. Nei prodotti della macinazione la concentrazione totale in tutti i campioni era circa il 19 % per gli acidi grassi saturi (SFA) e monoinsaturi (MUFA) e del 58-61 % per gli acidi grassi polinsaturi (PUFA). L'acido linoleico (C18:2n6) era l'acido grasso più abbondante con concentrazione più elevata nella SemR. Il grano NZ mostrava concentrazioni maggiori di acido linoleico (C18:2n6) e palmitico (C16:0). Il grano CN, invece, mostrava concentrazioni maggiori di acido oleico (C18:1c9) e  $\alpha$ -linolenico (C18:3n3).



**Figura 1.** Concentrazione di acidi grassi (C16:0: palmitico; C18:0: stearico; C18:1c9: oleico; C18:2n6: linoleico; C18:3n3:  $\alpha$ -linolenico) nei principali prodotti della macinazione di grano nazionale e canadese (A: granello tal quale, B: crusca; C: semola; D: scarto di raffinazione).

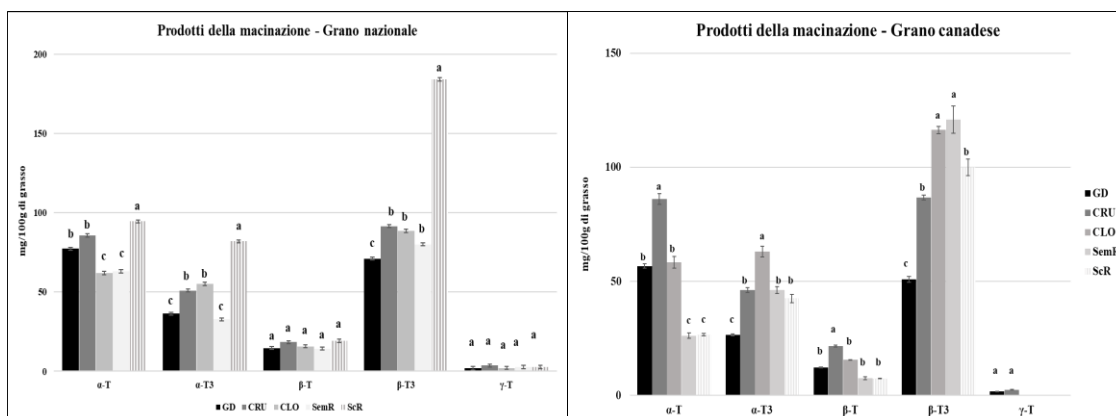
Nei prodotti ottenuti dalla decorticazione la concentrazione di SFA e MUFA era del 15-21%, mentre quella dei PUFA del 59-64 % (Fig. 2). C18:2n6 e C18:3n3 erano gli acidi grassi preponderanti. La granella decorticata mostrava concentrazioni di PUFA sempre inferiori al rispettivo scarto di decorticazione, a tutti i livelli di decorticazione.



**Figura 2.** Concentrazione degli acidi grassi polinsaturi (PUFA) nei prodotti della decorticazione (GD: granella tal quale; Gr: granella decorticata al 3, 6, 9, 12, 15 %; Sd: scarto di decorticazione al 3, 6, 9, 12, 15 %).

### Determinazione dei tococromanoli

Come mostra la Figura 3, il  $\beta$ -tocotrienolo ( $\beta$ -T3) era il tococromanolo principale all'interno dei prodotti di macinazione sia di GN che di GC. Nel GN le concentrazioni di  $\alpha$ -tocoferolo ( $\alpha$ -T),  $\alpha$ -tocotrienolo ( $\alpha$ -T3) e  $\beta$ -tocotrienolo ( $\beta$ -T3) aumentavano all'ottenimento della crusca (85,6; 51,0 e 91,6 mg/100 g di grasso, rispettivamente) per poi diminuire in CLO (61,9; 55,2 e 88,7 mg/100 g di grasso, rispettivamente) e SemR (63,1; 32,7 e 80,1 mg/100 g di grasso, rispettivamente) e raggiungere la più elevata concentrazione nello scarto di macinazione (94,5; 81,9 e 184,3 mg/100 g di grasso, rispettivamente). Nel GC l' $\alpha$ -T e il  $\beta$ -tocoferolo ( $\beta$ -T) aumentavano la loro concentrazione nella CRU rispetto alla granella; l' $\alpha$ -T3 raggiungeva la più alta concentrazione nel CLO (63 mg/100 g di grasso), il  $\beta$ -T3 era l'unico tocotrienolo presente maggiormente nella semola (120,9 mg/100 g di grasso) ed il  $\gamma$ -T era presente solo in GD e CRU (1,8 e 2,4 mg/100 g di grasso, rispettivamente).



**Figura 3.** Concentrazione di tococromanoli nei principali prodotti della macinazione di grano nazionale (a sinistra) e canadese (a destra).

Nei prodotti della decorticazione il  $\beta$ -T3 era il tocotrienolo maggiormente presente, sempre in concentrazione più elevata nella granella decorticata rispetto al relativo scarto. Il  $\gamma$ -T era

presente solo nella granella tal quale e negli scarti a diversi livelli di decorticazione, ma assente nella granella decorticata.

### ***Determinazione dei fitosteroli***

Sono stati identificati 8 fitosteroli nei diversi campioni analizzati: campesterolo, campestanolo, stigmasterolo,  $\beta$ -sitosterolo, sitostanolo, avenasterolo,  $\Delta^7$ -avenasterolo e avenastanolo. Il campesterolo mostrava una concentrazione simile durante tutto il processo di macinazione (342-358 mg/100 g di grasso), ad eccezione del CLO (270 mg/100 g di grasso). Nei prodotti della decorticazione, esso era sempre presente in concentrazioni minori nella granella decorticata rispetto al relativo scarto di decorticazione. Il  $\beta$ -sitosterolo, il fitosterolo più abbondante, nei prodotti della macinazione era maggiormente presente in SemR e ScR (917 e 880 mg/100 g di grasso, rispettivamente). Nei prodotti della decorticazione, esso era sempre presente in concentrazioni maggiori nella granella decorticata rispetto al relativo scarto di decorticazione. Lo stigmasterolo ha mostrato concentrazioni maggiori in GD, CRU e CLO (46, 49 e 37 mg/100 g di grasso, rispettivamente) e minori in SemR e ScR (14 e 20 mg/100 g di grasso, rispettivamente). Nei prodotti della decorticazione la concentrazione di stigmasterolo è sempre minore nella granella decorticata rispetto al rispettivo scarto e la sua concentrazione poi diminuisce con l'aumentare del livello di decorticazione.

Il processo di decorticazione non va ad influire sul contenuto di fitosteroli, poiché risultano essere presenti in maggiore quantità nella granella decorticata rispetto al relativo scarto. Questo è positivo perché con il medesimo processo si va ad eliminare muffe e batteri presenti nel pericarpo della cariosside senza andare a compromettere il contenuto di fitosteroli delle frazioni integrali ottenute. Tococromanoli, acidi grassi e fitosteroli rappresentano marker sia di macinazione/decorticazione che della tracciabilità del grano, poiché si è osservato che esistono alcune differenze tra il grano nazionale e canadese.

### **Bibliografia**

- AOAC. 2000. *Official methods of analysis. 16th ed.* Washington, DC: Association of Official Analysis Chemists.
- Ben Lajnef H., Pasini F., Politowicz J., Tlili N., Khaldi A., Caboni M.F., Nasri N. 2017. Lipid characterization of *Eryngium maritimum* seeds grown in Tunisia. *Industrial Crops and Products*, 105: 47-52.
- Marzocchi S., Pasini F., Baldinelli C., Caboni M.F. 2018. Value-addition of beef meat by-products: lipid characterization by chromatographic techniques. *Journal of Oleo Science*, 67(2): 143-150.
- Pelillo M., Iafelice G., Marconi E., Caboni M.F. 2003. Identification of plant sterols in hexaploid and tetraploid wheats using gas chromatography with mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 17: 2245-2252.

## Studio di shelf-life di taralli con miscele lipidiche diverse

F. Pasini<sup>1\*</sup>, S. Marzocchi<sup>1</sup>, C. Ravagli<sup>1</sup>, M. C. Messia<sup>2</sup>, M.F. Caboni<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>DISTAL, Università di Bologna, P.zza Goidanich 60, 47521 Cesena (FC).

<sup>2</sup>Dipartimento Agricoltura, Ambiente e Alimenti (DiAAA), Università degli Studi del Molise, Via Francesco De Sanctis, 86100 Campobasso (CB).

\*E-mail: [federica.pasini5@unibo.it](mailto:federica.pasini5@unibo.it)

### Abstract

Taralli are a typical product of the Puglia region prepared using about 15-20% of extra virgin olive oil (EVOO). The aim of this work was to produce and evaluate the oxidative quality over time of taralli formulated not only with EVOO but also with other lipid blends, such as EVOO: rice oil (75:25) and high oleic sunflower oil: coconut oil (87.5:12.5). All samples were stored at room temperature for a shelf life of 75 days. Despite the higher content in natural antioxidants in EVOO and rice oil, the greater oxidative stability was shown by taralli samples formulated with the blend of high oleic sunflower oil and coconut oil. These results demonstrated how the longer shelf life of a product rich in fats such as taralli is mainly due to the fatty acids composition compared to the presence of antioxidant compounds.

### Riassunto

I taralli sono un prodotto tipico della regione Puglia la cui ricetta prevede un 15-20% di olio extravergine di oliva (EVO). Lo scopo di questo lavoro è stato quello di produrre e valutare la qualità ossidativa nel tempo di taralli formulati non solo con l'olio EVO ma anche con altre miscele lipidiche, come olio EVO: olio di riso (75:25) e olio di girasole alto oleico: olio di cocco (87,5:12,5). Tutti i campioni sono stati conservati a temperatura ambiente per una durata di 75 giorni. Nonostante il maggiore contenuto in sostanze antiossidanti delle miscele grasse costituite da olio EVO e olio di riso, la maggiore stabilità ossidativa è stata mostrata dai taralli contenenti olio di girasole alto oleico e olio di cocco. Questi risultati hanno dimostrato come la maggiore shelf life di un prodotto ricco in grassi come i taralli sia dovuta principalmente alla composizione in acidi grassi rispetto alla presenza di composti antiossidanti.

### Introduzione

Oggi la consapevolezza dei consumatori nei riguardi della qualità è molto elevata e durante la pandemia questo aspetto si è accentuato in quanto lo stare a casa ha provocato un aumento dei consumi di alimenti a lunga conservazione. Il settore dei prodotti da forno è stato uno dei più interessati per la preferenza di snack salati come i taralli al pane fresco. I taralli sono un prodotto tipico della regione Puglia, particolari per la loro semplicità di produzione e per questo spesso non sono percepiti dai consumatori come prodotti “grassi”, ma nella realtà apportano alla dieta una consistente quantità di lipidi, in quanto la ricetta prevede un 15-20% di olio extravergine di oliva (EVO).

La qualità dei prodotti da forno durante la loro conservazione è legata principalmente a due fenomeni: perdita di croccantezza e ossidazione lipidica. Quest'ultima può essere favorita da fattori quali presenza di ossigeno, temperatura e luce. Un aspetto importante che influenza la shelf life di un prodotto è sicuramente anche la qualità e il tipo di materia prima utilizzata. Per prodotti da forno come i taralli, i grassi svolgono un ruolo importante in tal senso in quanto possono essere la causa principale di irrancidimento dovuto a fenomeni di ossidazione che possono prendere il via durante i trattamenti termici quali cottura, frittura, tostatura o il periodo di conservazione in condizioni non ottimali (Calligaris *et al.*, 2008; Riciputi e Caboni, 2017).



In virtù di queste considerazioni, lo scopo del lavoro è stato quello di produrre e valutare taralli ottenuti con miscele lipidiche differenti, alternative all'olio EVO che da un lato ha proprietà nutrizionali uniche, ma dall'altro è molto suscettibile all'ossidazione lipidica con il rischio di produrre off-flavour e ridurre così la shelf life del prodotto e l'accettabilità da parte del consumatore.

### **Materiali e metodi**

La ricetta impiegata per la produzione dei taralli prevedeva farina di frumento zero (9%), vino bianco (24%), olio (16%) e sale (1%). Tre tipologie di campione sono state ottenute variando la componente lipidica, rappresentata quindi dal 100% olio EVO (T0), dalla miscela 75% di olio EVO + 25% di olio di riso (T4) e dalla miscela 87,5% di olio di girasole alto oleico e 12,5% di olio di cocco (T5).

Lo studio di shelf life è stato condotto conservando i campioni a temperatura ambiente in sacchetti di plastica per alimenti e campionando a 0, 7, 21, 35, 50 e 75 giorni. La valutazione dello stato ossidativo è stata svolta mediante la determinazione del numero di perossido (Shantha e Decker, 1994) in seguito ad estrazione lipidica con metodo Soxhlet (AOAC, 2000) e del contenuto di esanale attraverso analisi della componente volatile con la tecnica SPME-GC-MS (Marzocchi *et al.*, 2017). È stata inoltre effettuato un test di ossidazione accelerata con strumento Oxitest<sup>®</sup> (Marzocchi e Caboni, 2018) su tutti i vari campioni.

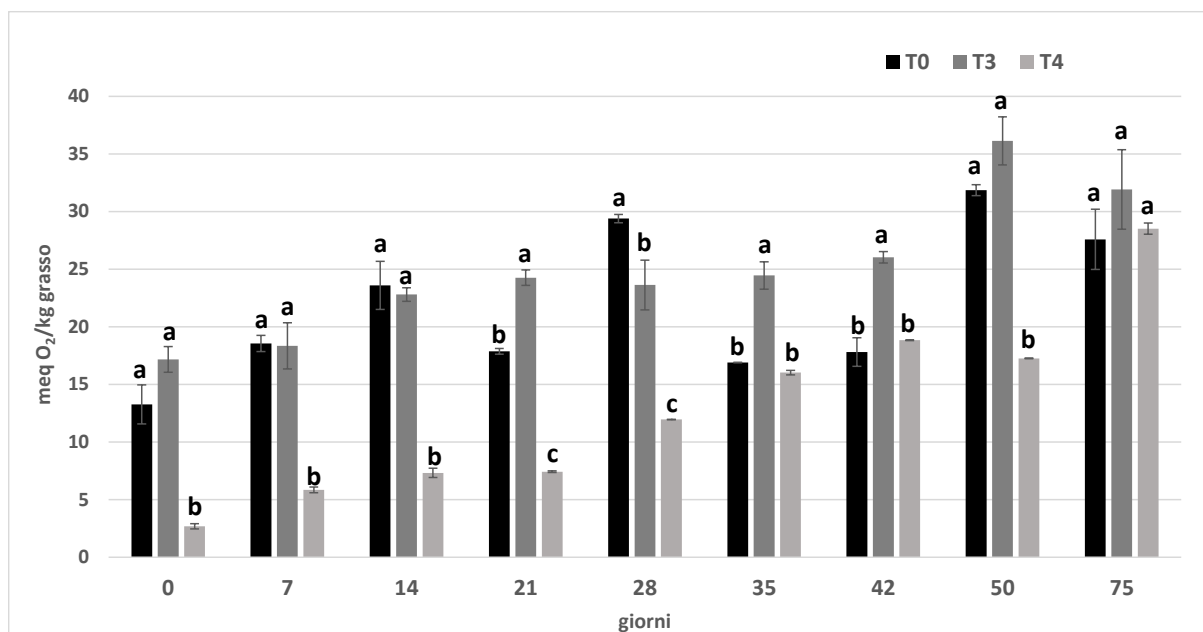
### **Risultati e discussione**

In Figura 1 è riportato l'andamento del contenuto in perossidi (PV) dei tre taralli a diversa formulazione e nonostante presentino tutti un andamento altalenante tipico di questi composti primari dell'ossidazione, possiamo notare come il campione T4 presenti dei valori significativamente inferiori ( $p \leq 0,05$ ) rispetto agli altri due campioni. L'ultimo punto di shelf life (75gg), invece, presenta un valore significativamente più alto (28,25 meqO<sub>2</sub>/kg di olio), tale da raggiungere quello degli altri due campioni. I campioni T0 e T3, invece, presentano un contenuto in perossidi molto simile tra loro. È importante inoltre notare come il campione T0, insieme al campione T3, già dalla seconda settimana di conservazione presentino valori superiori al limite di 20 meqO<sub>2</sub>/kg di grasso, considerato il valore in PV massimo tollerabile per un alimento; al contrario, il campione T4, formulato con olio di girasole alto oleico e olio di cocco mostra un PV sempre sotto al limite tranne a fine shelf-life.

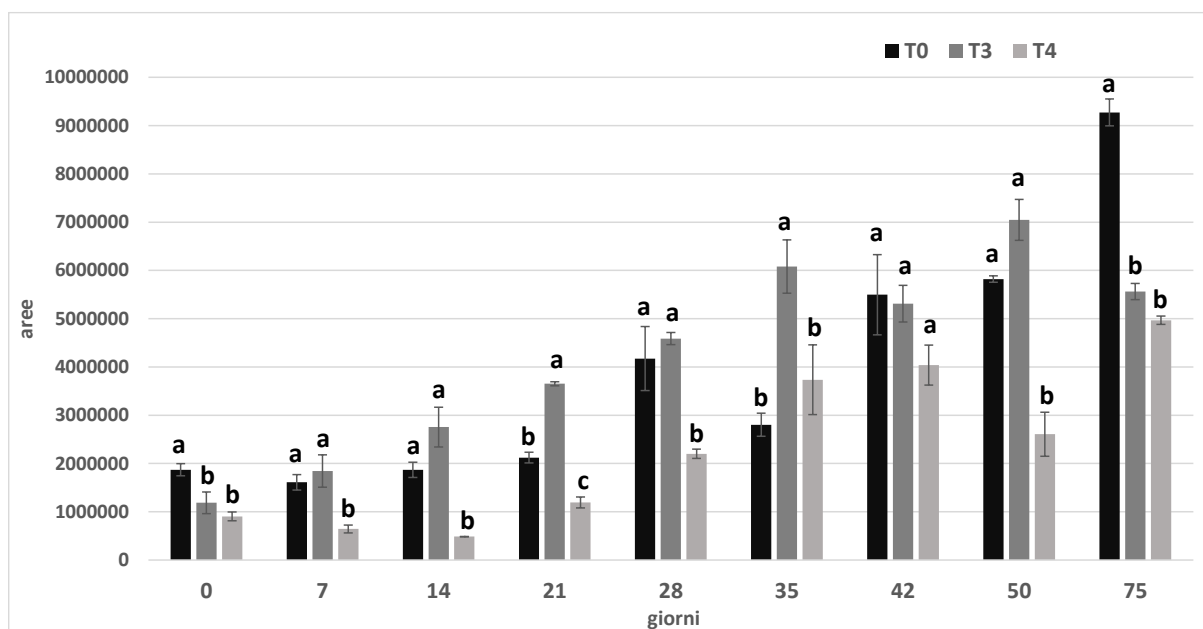
Il contenuto in esanale, che sappiamo essere una delle principali aldeidi responsabili dell'alterazione dell'aroma, rispecchia in parte l'andamento riscontrato per i PV nei campioni (Fig. 2). Infatti, anche in questo caso, il campione T4 risulta quello con il più basso contenuto in esanale, a volte con valori significativamente differenti ( $p \leq 0,05$ ) da T0 e T3. Anche in questo caso, però, seppur meno marcato che per i PV, il campione T4 mostra un'ossidazione più accelerata raggiungendo a fine shelf life un contenuto 5,5 volte maggiore. Il campione T3, costituito da olio EVO e olio di riso, invece, mostra un contenuto in esanale spesso molto simile al campione T0 anche se con un incremento molto più regolare nel tempo e un calo significativo ( $p \leq 0,05$ ) a fine shelf life. Dall'altro lato, il campione T0 formulato solo con olio EVO, come per i PV, presenta un andamento un po' altalenante rispetto agli altri due campioni.

I risultati ottenuti con l'analisi OXItest sono espressi sotto forma di periodo di induzione (IP) ossia il tempo limite in cui il campione riesce a resistere all'ossidazione forzata prima di andare in contro a decadimento qualitativo, espresso in minuti (min). Osservando la Figura 3 si nota bene come il campione T0, nonostante l'andamento nel tempo rimanga costante, presenti un IP sempre significativamente inferiore a quello degli altri due taralli. Questo risultato è in parte in linea con i valori di PV ed esanale riscontrati che risultavano spesso significativamente più elevati rispetto a T3 e T4. In linea generale il campione T3 presenta IP elevati, che oscillano al

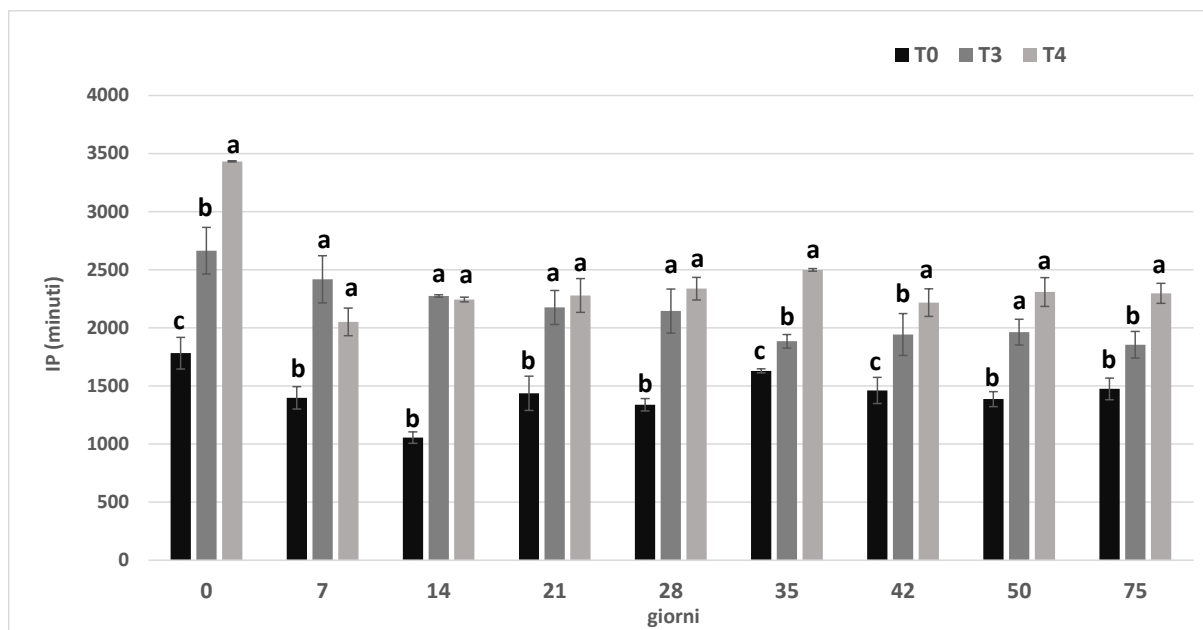
di sopra delle 30 ore così come il campione T4 che mostra IP in linea a quelli del T3 o addirittura significativamente superiori ( $p \leq 0,05$ ), come al tempo zero e a fine conservazione. Nonostante il campione T4 presenti i valori più elevati è importante sottolineare come sia l'unico dei tre che già dopo una settimana abbia un calo drastico e importante della resistenza all'ossidazione, mostrando un valore di 1,6 volte più basso



**Figura 1.** Valore del numero di perossido dei campioni di taralli ai diversi giorni di shelf life, espresso come meq O<sub>2</sub>/kg di grasso. Le barre con lettere diverse all'interno di ogni tempo di shelf life rappresentano valori significativamente diversi ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 2.** Contenuto di esanale nei campioni di taralli ai diversi giorni di shelf life, espresso in aree. Le barre con lettere diverse all'interno di ogni tempo di shelf life rappresentano valori significativamente diversi ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 3.** Valore di IP nei campioni di taralli ai diversi giorni di shelf life, espresso in minuti. Le barre con lettere diverse all'interno di ogni tempo di shelf life rappresentano valori significativamente diversi ( $p \leq 0,05$ ).

I risultati ottenuti dalle analisi svolte per valutare la stabilità ossidativa dei taralli formulati ci portano ad affermare che il campione T4 rappresenta il tarallo con uno stato ossidativo migliore durante i 75 giorni di conservazione a temperatura ambiente. Questo tarallo è caratterizzato da una composizione acidica molto favorevole, ricca sia in acidi grassi monoinsaturi, apportati dall'olio di girasole alto oleico, che in acidi grassi saturi, apportati dall'olio di cocco. Dall'altro lato, però, il T4 presenta una velocità di decadimento ossidativo nel tempo maggiore e ciò potrebbe essere legato ad un contenuto inferiore di composti antiossidanti, rispetto a T0 e T3. Questi due taralli, dove l'EVO è il grasso principale con un patrimonio di antiossidanti naturali, hanno però un'acidità libera iniziale più elevata di quella degli oli raffinati. Gli acidi grassi liberi sono molto più sensibili all'ossidazione di quelli esterificati e la presenza di questi indici di ossidazione elevati nell'EVO, da un lato è legata alla sua tecnologia di produzione, che non permette di allontanare eventuali composti pro-ossidanti, dall'altro presenta un'evoluzione del processo ossidativo più rallentato grazie all'alta concentrazione di sostanze come tocoferoli e fenoli.

Nel campione T3, oltre alle sostanze antiossidanti presenti nell'EVO si aggiunge l'azione anche di quelle presenti nell'olio di riso, caratterizzato da una elevata concentrazione di tocoferoli, tocotrienoli e anche del  $\gamma$ -orizanolo.

Possiamo quindi concludere che la composizione in acidi grassi sembra avere un effetto maggiore rispetto al contenuto in sostanze antiossidanti per quel che riguarda la qualità ossidativa di un prodotto ricco in grassi come il tarallo. La complessità degli alimenti formulati potrebbe in parte spiegare questo fenomeno in quanto l'interazione tra alcuni composti, come i grassi e gli antiossidanti, potrebbe non essere così semplice e immediata.

## **Bibliografia**

- AOAC 2000. *Official methods of analysis*. 16th ed. Washington, DC: Association of Official Analysis Chemists.
- Calligaris S., Pieve S. D., Kravina G., Manzocco L., Nicoli C. M. 2008. Shelf life prediction of bread sticks using oxidation indices: A validation study. *Journal of Food Science*, 73(2): E51-E56.
- Marzocchi S., Pasini F., Verardo V., Ciemniewska-Żytkiewicz H., Caboni M.F., Romani S. 2017. Effects of different roasting conditions on physical-chemical properties of Polish hazelnuts (*Corylus avellana* L. var. *Kataloński*). *LWT - Food Science and Technology*, 77: 440-448.
- Marzocchi S., Caboni M. F. 2018. Study of the Effect of Tyrosyl Oleate on Lipid Oxidation in a Typical Italian Bakery Product. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(47): 12555-12560.
- Riciputi Y., Caboni M. F. 2017. Assessing Oil Oxidative Stability In Tarallini By Oxitest®. *Italian Journal of Food Science*, 29:63-73.
- Shanta N.C., Decker E.A. 1994. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, 77(2): 421-424.

## **Innovazione di processo e di prodotto per la produzione di bevande fermentate a base di quinoa**

*V. Sileoni<sup>3\*</sup>, E. Bravi<sup>1</sup>, G. De Francesco<sup>1</sup>, G. Perretti<sup>2</sup>, O. Marconi<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Università di Perugia, Centro di Ricerca per l'Eccellenza della Birra, Via San Costanzo, 06126 Perugia (PG).

<sup>2</sup>Università di Perugia, Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Borgo XX Giugno, 06121 Perugia (PG).

<sup>3</sup>Universitas Mercatorum, Piazza Mattei 10, 00186 Roma (RM).

\*E-mail: [valeria.sileoni@collaboratori.unipg.it](mailto:valeria.sileoni@collaboratori.unipg.it)

### **Abstract**

This study aims to create a new gluten-free fermented drink based on quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), in response to the growing demand for this type of product.

Due to the poor aptitude of quinoa to malting, the unmalted raw material was used, and mashing was carried out with the aid of the Ondea®Pro enzymatic kit, optimizing temperatures based on enzymatic activity. Primary fermentation was carried out at 19° C for 7 days, followed by bottle conditioning. The standard quality attributes of both worts and beers show regular values. The high attenuation indicates a good fermentation, despite the raw material being unmalted. The high amino acids and glucose content of the wort has led to high values of isoamyl acetate (banana). Compared to the literature data for similar beverages, the amino acid and phenolic acid contents were high; the latter contributes to the stability of the drink thanks to its antioxidant power. The panelists judged positively the obtained drinks for their aspect, aroma, and taste. In conclusion, the results showed that the use of quinoa and this production process made it possible to obtain a gluten-free fermented drink with characteristics similar to other traditional ones currently on the market.

### **Riassunto**

Questo studio mira a creare una nuova bevanda fermentata gluten-free a base di quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), in risposta alla crescente domanda di questo tipo di prodotto.

A causa della scarsa attitudine della quinoa alla maltazione, si è utilizzata materia prima non maltata, e l'ammestamento è stato svolto con l'ausilio del kit enzimatico Ondea®Pro, ottimizzando le temperature sulla base dell'attività enzimatica. La fermentazione primaria è stata condotta a 19° C per 7 giorni, seguita da rifermentazione in bottiglia. Gli attributi standard di qualità sia dei mosti che delle birre mostrano valori regolari. L'alta attenuazione indica una buona fermentazione, nonostante la materia prima sia non maltata. L'alto contenuto di glucosio e amminoacidi del mosto ha portato a valori elevati dell'isoamil acetato (banana). Rispetto ai dati di letteratura per bevande simili, i contenuti di amminoacidi e di acidi fenolici sono risultati elevati; questi ultimi contribuiscono alla stabilità della bevanda grazie al loro potere antiossidante. I panelisti hanno giudicato positivamente le bevande sia dal punto di vista visivo che olfattivo e gustativo. In conclusione, i risultati hanno dimostrato che l'uso della quinoa e questo processo di produzione hanno permesso di ottenere una bevanda fermentata senza glutine con caratteristiche analoghe ad altre tradizionali attualmente in commercio.

## **Introduzione**

Lo sviluppo di nuovi prodotti è una sfida per l'industria alimentare, che oggi deve soddisfare la domanda di consumatori sempre più interessati alla qualità degli alimenti, come dimostra la crescente domanda di prodotti ad alto valore nutrizionale, ma anche gluten-free [1, 2].

La quinoa (*Chenopodium quinoa* Wild) si inserisce perfettamente in questa prospettiva. L'alto contenuto proteico, la composizione ricca di aminoacidi essenziali, l'assenza di glutine e l'alto contenuto in microelementi e antiossidanti rendono questo cereale particolarmente interessante nella formulazione di nuovi alimenti capaci di soddisfare le richieste di un consumatore consapevole. Questo studio mira a mettere a punto e caratterizzare bevande fermentate innovative gluten-free a base di quinoa.

## **Materiali e metodi**

Le due bevande fermentate sono state prodotte utilizzando una soluzione enzimatica, evitando il processo di maltazione. Questa scelta è dovuta alla limitata idoneità della quinoa ad essere maltata e alla possibilità di ottenere un risparmio energetico. Sono state prodotte due bevande a base di due diverse varietà di quinoa, una bianca (Real) e una nera (Black Crown), che presentavano un contenuto proteico rispettivamente di 15,0 e 12,8 g/100 g di sostanza secca. Le bevande sono state ottenute seguendo lo stesso processo, ad eccezione dei 5 g di agenti chiarificanti a base di carragenina (SuperMoss HB™) che sono stati aggiunti ai mosti di quinoa nera a 10 minuti dalla fine della bollitura, per ottenere un colore più chiaro. Per la produzione delle bevande è stato utilizzato un impianto pilota da 30 L (Braumeister, Speidel, Ofterdingen, Germania). La quinoa è stata macinata (mulino Bühler, Uzwil, Svizzera) e utilizzata per l'ammestamento in rapporto 1:4 con acqua (5 kg di quinoa e 20 L di acqua), integrata con CaCl<sub>2</sub> (6 g). Quindi, il pH è stato regolato con acido lattico a 5,7 e sono stati aggiunti 12,5 g della soluzione enzimatica Ondea®Pro. Il programma di ammostamento è stato messo a punto tenendo in considerazione le temperature ottimali degli enzimi esogeni e endogeni coinvolti e quella di gelatinizzazione dell'amido della quinoa (57-64 °C): 30 min a 52 °C, 60 min a 64 °C, 30 min a 72 °C, 10 °C min a 78 °C.

La filtrazione, eseguita con nylon filtrante a causa dell'assenza di glumelle, è stata eseguita da 3 sparging con acqua a 78 °C. La bollitura è stata eseguita per 60 minuti fino a raggiungere i gradi Plato (12 °P) desiderati. All'inizio di questa fase, è stato aggiunto il luppolo in pellets (Hallertau Magnum, 12,1%  $\alpha$ -acidi, Barth Haas) nelle quantità necessarie per raggiungere un valore di 20 IBU (International Bitterness Unit) e il pH è stato regolato con acido lattico fino a 5.3. Il mosto bollito (30 L) è stato chiarificato attraverso whirlpool, raffreddato a 20 °C, aerato ed inoculato con 0,7 g/L di lievito secco (US-05, Fermentis, Marcq-en-Barœul Cedex, Francia). La fermentazione primaria è stata protratta per 7 giorni a 19 °C e il suo corretto procedimento è stato monitorato ogni giorno valutando l'estratto apparente (°P). Successivamente la temperatura è stata abbassata a 2°C per 10 giorni per la maturazione. In seguito allo scarico del lievito, la bevanda è stata imbottigliata utilizzando bottiglie da 33 cl con l'aggiunta di 6 g/L di zucchero per la riferimentazione, che si è protratta per 2 settimane a 19 °C.

I mosti e le birre ottenute sono stati analizzati per i loro attributi standard di qualità e per il loro contenuto di zuccheri, amminoacidi ed acidi fenolici. Inoltre, le birre sono state analizzate per il loro contenuto di composti volatili (alcoli superiori ed esteri) e sottoposte ad analisi sensoriale.

## **Risultati e discussione**

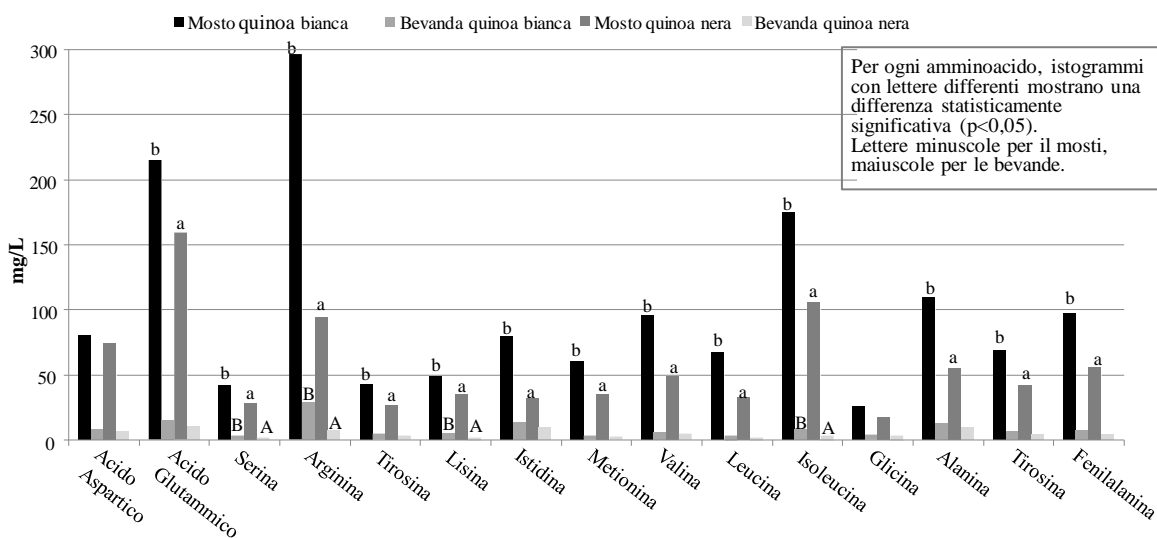
In Tabella 1 sono mostrati i risultati delle analisi degli attributi standard di qualità e del contenuto di zuccheri, composti volatili ed acidi fenolici dei due campioni di mosto e bevanda fermentata ottenuti rispettivamente dalle due varietà utilizzate, bianca e nera.

**Tabella 1.** attributi standard di qualità e del contenuto di zuccheri, composti volatili ed acidi fenolici dei due campioni di mosto e bevanda fermentata. U-EBC: European Brewery Convention Units, FAN = Free Amino Nitrogen, n = 2, valori sulla stessa riga con lettere diverse mostrano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ), lettere minuscole per i mosti, maiuscole per le bevande.

	Mosto con quinoa bianca	Mosto con quinoa nera	Bevanda con quinoa bianca	Bevanda con quinoa nera
Estratto (°P) del mosto	12,47 <sup>a</sup>	11,88 <sup>a</sup>	-	-
Estratto Originale (°P)	-	-	12,70 <sup>A</sup>	12,00 <sup>A</sup>
Estratto Reale (°P)	-	-	3,49 <sup>A</sup>	3,12 <sup>A</sup>
Alcol (% v/v)	-	-	6,07 <sup>A</sup>	5,80 <sup>A</sup>
Attenuazione reale (%)	-	-	73,90 <sup>A</sup>	75,20 <sup>A</sup>
pH	5,30 <sup>a</sup>	5,30 <sup>a</sup>	4,59 <sup>A</sup>	4,70 <sup>A</sup>
Colore (U-EBC)	8,98 <sup>b</sup>	5,70 <sup>a</sup>	6,95 <sup>B</sup>	4,26 <sup>A</sup>
Azoto totale (mg/L)	1645 <sup>b</sup>	1108 <sup>a</sup>	1464 <sup>B</sup>	837 <sup>A</sup>
FAN (mg/L)	170 <sup>b</sup>	115 <sup>a</sup>	82 <sup>B</sup>	58 <sup>A</sup>
Viscosità (mPa*s)	1,55 <sup>a</sup>	1,53 <sup>a</sup>	1,42 <sup>A</sup>	1,39 <sup>A</sup>
Fermentabilità (%)	84 <sup>a</sup>	84 <sup>a</sup>	-	-
Glucosio (g/L)	105 <sup>a</sup>	102 <sup>a</sup>	0,06	n.d.
Totale zuccheri (g/L)	140 <sup>a</sup>	135 <sup>a</sup>	29,46 <sup>A</sup>	31,36 <sup>A</sup>
Totale alcoli superiori (mg/L)	-	-	198 <sup>A</sup>	197 <sup>A</sup>
Etil Acetato (mg/L)	-	-	18 <sup>A</sup>	15 <sup>A</sup>
Isoamil Acetato (mg/L)	-	-	1,68 <sup>B</sup>	0,53 <sup>A</sup>
Etil esanoato (mg/L)	-	-	0,20 <sup>B</sup>	0,13 <sup>A</sup>
Acidi fenolici (mg/L)	71 <sup>b</sup>	55 <sup>a</sup>	52 <sup>B</sup>	43 <sup>A</sup>

Per quanto riguarda i mosti, il valore di estratto raggiunto corrisponde al target di 12°P, così come il pH che è stato opportunamente corretto durante il processo produttivo. Sebbene non si tratti di una materia prima maltata, il mosto ottenuto ha mostrato un colore abbastanza alto, soprattutto nel caso della quinoa bianca, la quale mostrava effettivamente un maggior contenuto di sostanze azotate. Tale risultato si è poi confermato nel maggior valore di azoto totale e FAN rispetto al mosto ottenuto da quinoa nera. In entrambi i casi, il contenuto di azoto solubile è risultato maggiore di 1000 mg/L, quindi ottimale per la produzione di bevande fermentate. Gli aminoacidi liberi (FAN) devono essere presenti in una quantità sufficientemente elevata per evitare che la mancanza di nutrienti azotati limiti la fermentazione. I valori riscontrati nei mosti sperimentali sono sufficienti a garantire un normale svolgimento della fermentazione (> 100 mg/l), anche se non ottimali (200 e 230 mg/l, [1]). In un mosto di malto d'orzo, il contenuto di FAN dovrebbe corrispondere ad un 20-30% del contenuto di azoto totale. I valori più bassi riscontrati in questo studio sono dovuti all'utilizzo di enzimi esogeni, che evidentemente hanno mostrato una efficienza più bassa rispetto alle proteasi ottenute dalla maltazione dell'orzo. Tuttavia, come detto la fermentazione ha mostrato un buon andamento, come dimostrato anche dal valore di fermentabilità, superiore all'80% per entrambi i mosti. Tale valore è riconducibile anche ad un adeguato contenuto di zuccheri, perfettamente coerente con quanto atteso per un mosto a 12°P di densità. La composizione zuccherina risulta essere diversa da quella di un mosto di malto d'orzo, in quanto lo zucchero più rappresentato è il glucosio, invece che il maltosio. Tale risultato è imputabile, anche in questo caso, all'utilizzo di enzimi esogeni. Il glucosio è comunque uno zucchero che viene facilmente metabolizzato dal lievito *Saccharomyces*. Infine, la viscosità mostra un valore ottimale, inferiore al limite di 1,7 cP che potrebbe causare problemi in fase di filtrazione. Per quanto riguarda le bevande fermentate, i

valori di estratto originale, reale, alcol e attenuazione apparente sono perfettamente nei range di quelli di una birra ad alta fermentazione di malto d'orzo (Estratto originale: 8.99-17.50°P, reale: 2.80-6.83°P, alcol: 3.70-7.46% v/v, attenuazione reale: 53.4-76.6%). Come normalmente accade, i valori di pH, colore e viscosità si abbassano durante la fermentazione, raggiungendo valori coerenti con quelli di questa tipologia di bevande (pH: 3.80-4.80, colore: 4.1-14.9 U-EBC, viscosità: 1.40-1.60 cP). La bevanda fermentata ottenuta da quinoa bianca mostra un colore più scuro di quella ottenuta da quinoa nera a causa, come già detto, di un maggior contenuto di sostanze azotate, quali azoto totale e FAN, come riscontrato nella materia prima, nel mosto e anche nelle bevande finali. Durante la fermentazione, i valori di azoto totale e di FAN hanno mostrato un calo, raggiungendo valori comparabili con quelli di una birra ad alta fermentazione di malto d'orzo per quanto riguarda l'azoto totale (600-1100 mg/l), e inferiori per quanto riguarda i FAN (80-120 mg/l), come atteso dai valori del mosto. Il contenuto di zuccheri residui è perfettamente coerente con quello di una bevanda fermentata (intorno a 30 g/l), così come quello degli alcoli superiori (146-214 mg/l), anche se nessuno dei singoli composti supera la soglia di percezione. Per quanto riguarda gli esteri, l'etil acetato non supera la soglia di percezione di 25 mg/l, mentre per la bevanda di quinoa bianca sia l'isoamil acetato (banana) che l'etil esanoato (fruttato) mostrano un contenuto superiore alle rispettive soglie di percezione di 1,2 e 0,2 mg/l. Infine, per quanto riguarda gli acidi fenolici, valori riscontrati sia nel mosto che nella birra sono risultati più elevati di quelli trovati in letteratura per bevande simili; ad esempio, la birra a base di malto d'orzo ed il corrispondente mosto mostrano solitamente valori medi intorno a 22.1 e and 33.8 mg/L, rispettivamente. Questi composti sono molto importanti perché contribuiscono all'attività antiossidante della bevanda, garantendo una maggiore stabilità all'aumentare della loro quantità.

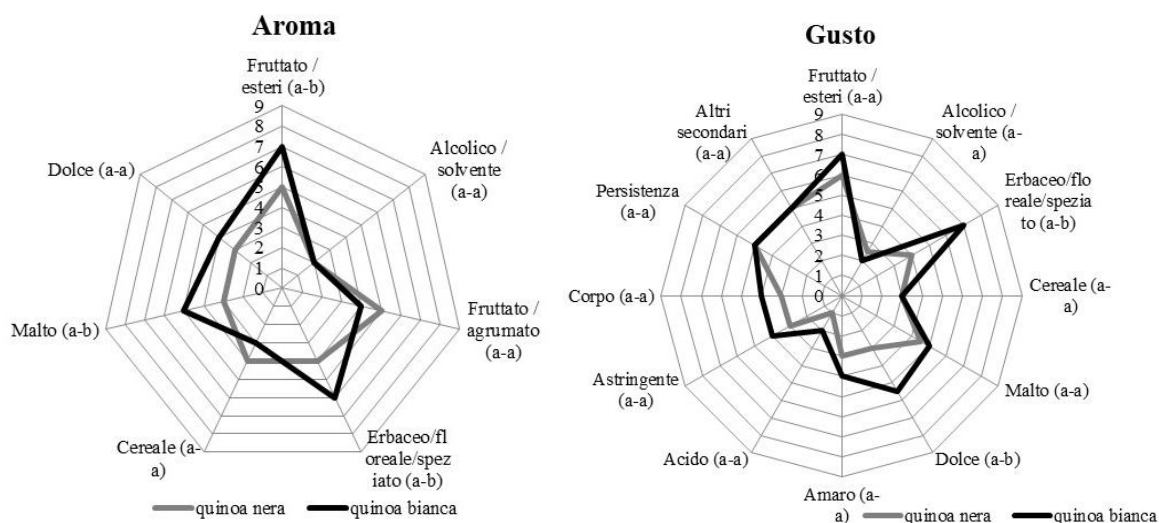


**Figura 1.** profilo amminoacidico dei due campioni di mosto e bevanda fermentata., n = 2, istogrammi con lettere diverse mostrano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ), lettere minuscole per i mosti, maiuscole per le bevande

Il profilo amminoacidico (Fig. 1) del mosto è risultato in linea con quanto ritrovato in letteratura riguardo ad un mosto ottenuto da malto d'orzo [2] tranne che per l'acido glutammico e arginina, i quali sono risultati molto al di sopra del range usuale nel malto d'orzo. In generale tutti gli aminoacidi sono stati utilizzati dal lievito, con un calo medio del 90% tra mosto e bevanda fermentata. Anche in questo caso, come per l'azoto totale e che per i FAN, la quinoa bianca presenta un contenuto totale di aminoacidi maggiore rispetto alla quinoa nera, sia per il mosto che per la bevanda fermentata.



Osservando i risultati dell'analisi sensoriale (Fig. 2), per quanto riguarda l'aspetto visivo, la bevanda di quinoa bianca ha mostrato una schiuma bianca, fine, persistente e aderente, un colore giallo dorato ed una limpidezza "velata". La bevanda di quinoa nera, anche a cause del minor contenuto di azoto, ha presentato una schiuma bianca abbastanza fine, abbastanza resistente e abbastanza aderente, un colore giallo paglierino e anch'essa una limpidezza "velata". Confrontando il profilo olfattivo delle due bevande, risulta evidente come quella di quinoa bianca mostri valori superiori a quella di quinoa nera per i parametri "fruttato/esteri" ed "erbaceo/ floreale speziato". Per il parametro "fruttato/esteri" i panelisti hanno indicato come descrittori "banana" e "frutta matura" per la bevanda di quinoa bianca, e "pera" per quella di quinoa nera. Per il parametro "erbaceo/ floreale speziato" il descrittore individuato è stato "chiodi di garofano", riferito esclusivamente alla bevanda di quinoa bianca. Gli altri parametri non hanno dimostrato una differenza statisticamente significativa. Per quanto riguarda il profilo gusto-olfattivo, le due bevande non hanno mostrato differenze statisticamente significative, ad eccezione di punteggi superiori per la bevanda di quinoa bianca per i descrittori di "erbaceo/ floreale speziato", come risultato anche al profilo olfattivo, e "dolce", nonostante la concentrazione di zuccheri sia comparabile. In linea generale i panelisti hanno giudicato positivamente le bevande, in particolare la bevanda di quinoa bianca, che ha presentato un profilo sensoriale molto interessante, simile ad una birra weizen. Tuttavia, le bevande sono risultate caratterizzate da un finale leggermente astringente e un retrogusto descritto da note di rabarbaro e genziana, che ricordano molto il terroso e la radice.



**Figura 1.** profilo sensoriale dei due campioni di bevanda fermentata., n = 2, parametri con lettere diverse mostrano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ )

## Bibliografia

- Zarnkow M., Matthias Keßler M., Burberg F., Back W., Arendt E. K., Kreis S. 2007. The use of response surface methodology to optimise malting conditions of quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) as a raw material for gluten-free foods. *Brewing Science*, 60: 118-126.
- Di Ghionno L., Sileoni V., Marconi O., De Francesco G., Perretti G. 2017. Comparative study on quality attributes of gluten-free beer from malted and unmalted teff [*Eragrostis tef* (zucc.) trotter *LWT - Food Science and Technology*, 84: 746-752.

## **Effetto della decorticazione su composti bioattivi e metalli pesanti in frumenti duri pigmentati**

*D. B. M. Ficco<sup>1\*</sup>, G. M. Borrelli<sup>1</sup>, O. Miedico<sup>2</sup>, A. Spina<sup>3</sup>, V. Giovanniello<sup>1</sup>, M. Tarallo<sup>2</sup>, C. Pompa<sup>2</sup>, P. De Vita<sup>1</sup>, A. E. Chiaravalle<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria (CREA), Centro di Ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali (CREA-CI), S.S. 673 km 25.200, 71122 Foggia (FG).

<sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Dipartimento di Chimica, Via Manfredonia 20, 71121 Foggia (FG).

<sup>3</sup>Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria (CREA), Centro di Ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali (CREA-CI), Corso Savoia 190, 95024 Acireale (CT).

\*E-mail: [donatellabm.ficco@crea.gov.it](mailto:donatellabm.ficco@crea.gov.it)

### **Abstract**

Pigmented durum wheats are naturally rich in anthocyanins, high in antioxidant power, that are mainly located in the pericarp and, therefore, are susceptible to milling. The aim of this study was to test the effectiveness of debranning as a useful technology to provide flours in which healthy compounds can be preserved, reducing the presence of contaminants. For this purpose, three purple durum wheats were debranned for six subsequent times (30, 60, 90, 120, 150, 180 s), corresponding to six debranning levels (GD-1 to GD-6). The content of total anthocyanins (TAC) and polyphenols (TPC), and of ash, and essential (Mn, Zn, Se, Fe and Mo) and toxic (Pb and Cd) trace elements were determined on each debranned grain (GD). In GD-1, 60% of the anthocyanins and 85% of the polyphenols were preserved, and in GD-2 the levels were of 43% and 77%, respectively. In adding, at these levels, the essential trace elements were mostly preserved (83%, in average), while the Pb and Cd levels were below legal limit. Debranning is confirmed as a useful technology to obtain improved flours enriched in bioactive compounds and low in toxicity to make superior end-use products.

### **Riassunto**

I frumenti duri pigmentati sono naturalmente ricchi di antociani, composti ad azione antiossidante, presenti principalmente nel pericarpo e, per questo, suscettibili ai processi di molitura. L'obiettivo di questo studio è stato quello di testare l'efficacia della decorticazione come tecnologia utile a fornire degli sfarinati in cui siano preservati gli strati esterni della cariosside, ricchi in composti bioattivi, riducendo la presenza di contaminanti. A tal fine, la granella di tre frumenti duri con pericarpo porpora è stata decorticata per sei tempi successivi (30, 60, 90, 120, 150, 180 sec) corrispondenti a sei livelli di decorticazione (da GD-1 a GD-6). Su ciascun campione di granella decorticata (GD) è stato determinato il contenuto di antociani totali (TAC), polifenoli totali (TPC), ceneri, minerali essenziali (Mn, Zn, Se, Fe e Mo) e tossici (Pb e Cd). Sono stati individuati due livelli di decorticazione ottimali nei quali sono preservati i composti bioattivi, TAC e TPC (60% e 85% rispettivamente in GD-1 e il 43% e 77% in GD-2), e l'83% in media dei minerali essenziali mentre gli elementi tossici restano al di sotto dei limiti di legge. La decorticazione si conferma come tecnologia interessante per produrre sfarinati ricchi in composti benefici e con bassi contenuti di composti tossici che influenzano negativamente la qualità e la sicurezza alimentare.

**Parole chiave:** frumenti duri pigmentati, decorticazione, antociani, polifenoli, minerali essenziali/ tossici.

## Introduzione

L'uso della decorticazione prima della molitura rappresenta una via alternativa per ridurre la perdita di composti bioattivi presenti negli strati più esterni della cariosside. Infatti, le parti cruscali sono ricche oltre che di polifenoli, carotenoidi e fibre anche di minerali essenziali, alcuni dei quali hanno una funzione biologica nelle piante e nell'uomo in quanto agiscono come co-fattori di enzimi (Delcour *et al.*, 2012).

Negli ultimi anni una particolare attenzione è stata rivolta ai frumenti pigmentati, ricchi di antociani, una classe di composti fenolici ad attività antiossidante, che essendo concentrati negli strati più esterni della cariosside, sono suscettibili ai processi di molitura (Ficco *et al.*, 2016). In numerosi studi condotti su frumenti convenzionali è stata utilizzata la decorticazione per preservare il contenuto di composti bioattivi riducendo il livello di tossicità degli sfarinati prodotti (De Brier *et al.*, 2015; Giordano & Blandino 2018). Nessuna informazione è, al momento, disponibile riguardo all'effetto della decorticazione sui frumenti duri pigmentati.

Pertanto, lo scopo della ricerca è stato quello di applicare tale tecnologia a frumenti duri con pericarpo porpora e valutare i contenuti di composti bioattivi e tossici, identificando i livelli di decorticazione che permettono di ottenere sfarinati migliorati dal punto di vista qualitativo e a basso contenuto in metalli pesanti.

## Materiali e metodi

Tre genotipi di frumento duro (*Triticum durum* Desf.) con pericarpo porpora, PI 352395, Cltr 14754 e PI 352445, selezionati per differenti livelli di antociani (Ficco *et al.*, 2014), sono stati decorticati secondo la procedura riportata in Borrelli *et al.* (2008) (Fig. 1). La granella è stata decorticata per tempi crescenti (30, 60, 90, 120, 150, 180 sec) corrispondenti a sei livelli di decorticazione, GD-1 → GD-6, corrispondenti alla rimozione di frazioni di cariosside che vanno dal 5% al 23%. L'integrale e tutti i campioni di granella decorticata (GD) sono stati macinati in un molino da laboratorio (Tecator Cyclotec 1093) con un vaglio di 500 µm. Tutti gli sfarinati sono stati caratterizzati per il contenuto di antociani totali (TAC), polifenoli totali (TPC), ceneri, minerali essenziali (Mn, Zn, Se, Fe e Mo) e tossici (Pb e Cd).

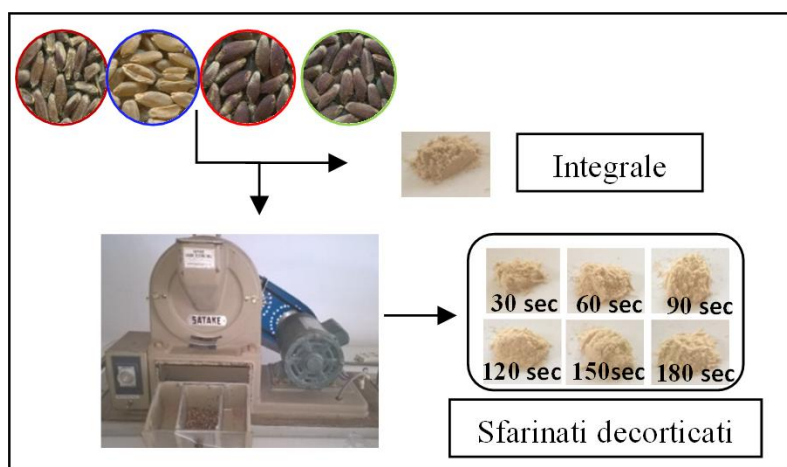
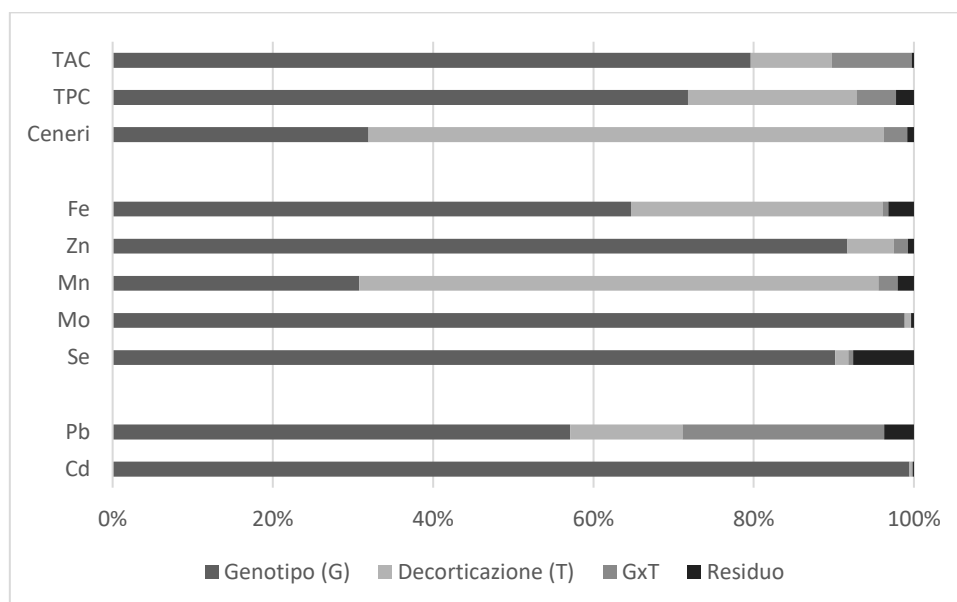


Figura 1. Schema sperimentale adottato.

## Risultati e discussione

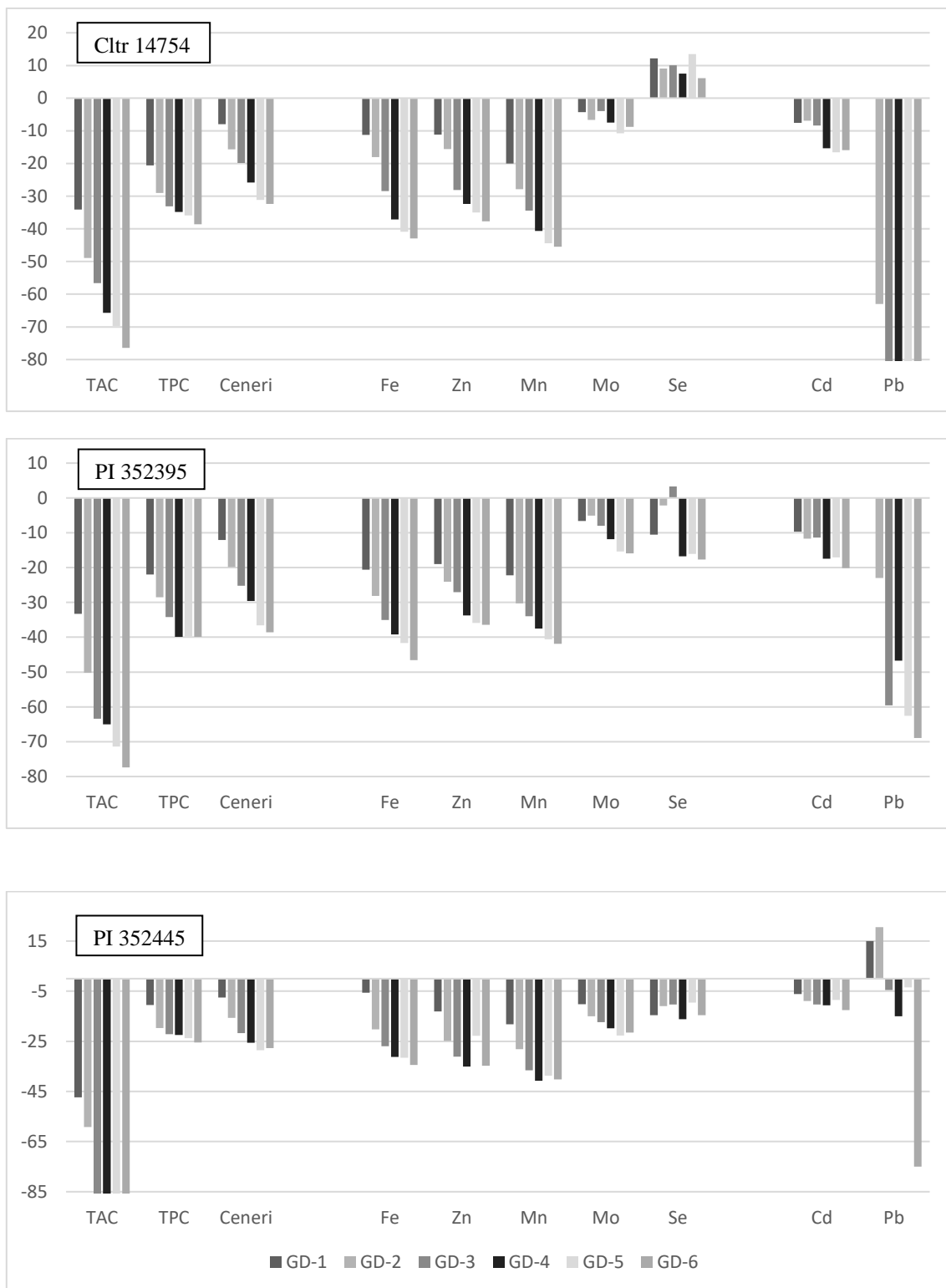
Tra i genotipi analizzati, il PI 352395 e il Cltr 14754 si caratterizzano per un più alto contenuto di TAC, TPC e ceneri, rispetto al PI 352445. I minerali presentano, invece, contenuti variabili tra i genotipi (Ficco *et al.*, 2020).

Le componenti della varianza (Fig. 2) mostrano una prevalenza dell'effetto genotipico (oltre il 70%) per TAC e TPC a conferma dell'alta ereditabilità osservata per tali caratteri in studi precedenti (Ficco *et al.*, 2014). La decorticazione influenza notevolmente il contenuto in ceneri, come già precedentemente evidenziato (Fares *et al.*, 1996; Borrelli *et al.*, 2008). Considerando gli elementi minerali, solo il Mn risulta influenzato dal processo di decorticazione mentre per tutti gli altri prevale l'effetto del genotipo. Un piccolo effetto dell'interazione tra i due fattori è osservato solo per il Pb.



**Figura 2.** Percentuale del contributo del genotipo (G), della decorticazione (T) e della loro interazione (G x T) per i parametri analizzati.

L'effetto del processo è riportato in Figura 3. In tutti i genotipi è possibile notare una perdita progressiva dei livelli di TAC, TPC e ceneri. Questa riduzione è particolarmente pronunciata per la TAC che, già dopo 30 sec di decorticazione, mostra una perdita media del 40%. Questo andamento conferma la localizzazione di tali componenti negli strati esterni della cariosside (Ficco *et al.*, 2016; Giordano *et al.*, 2017) rendendoli particolarmente suscettibili al processo. I cali nel contenuto di ceneri riflettono il comportamento osservato per gli elementi. Ciò è in accordo con quanto riportato in letteratura (Giordano & Blandino, 2018). Per i minerali essenziali, i cali maggiori sono osservati per Fe, Zn, e Mn. Come è noto, i primi due minerali sono principalmente localizzati nell'aleurone, associati ai fitati, mentre il Mn è un elemento mobile nello xilema ed è principalmente presente negli strati più esterni (De Brier *et al.*, 2015). Un comportamento particolare è evidenziato per il Se che, in genere, presenta perdite minori durante la decorticazione e, nel genotipo Cltr 14754, mostra incrementi in tutti i GD. Ciò è motivato dal fatto che esso è presente come selenometionina nelle proteine che circondano i granuli di amido nell'endosperma e quindi non viene influenzato sostanzialmente dal processo. Per quanto concerne i minerali tossici, Pb e Cd, sebbene siano sotto il limite consentito per legge (0,20 mg/kg di peso fresco; EC n. 1881/2006), una ulteriore riduzione è stata osservata durante la decorticazione, particolarmente consistente per il Pb in Cltr 14754 e PI 352395. Nel genotipo PI 352445 si osserva un comportamento particolare del Pb che aumenta fino a GD-2 per poi ridursi progressivamente, indicando una sua maggiore presenza negli strati più esterni.



**Figura 3.** Effetto del processo di decorticazione su ciascun parametro considerato. Sulle ordinate sono riportati i cali % da DG-1 a DG-6 e sulle ascisse i differenti parametri per ciascun genotipo.

In tale studio, sono stati individuati due livelli di decorticazione nei quali sono preservati i composti bioattivi, TAC e TPC (in media, 60% e 85% rispettivamente in GD-1 e il 43% e 77% in GD-2), e i minerali essenziali (in media, l'83%) con dei livelli degli elementi tossici nella

granella decorticata al di sotto dei limiti di legge. Alla luce di queste osservazioni, tali materiali possono essere usati direttamente come sfarinati integrali per la trasformazione industriale.

### **Bibliografia**

- Borrelli G.M., De Leonardis A.M., Platani C., Troccoli A. 2008. Distribution along durum wheat kernel of the components involved in semolina colour. *Journal of Cereal Science*, 48: 494-502.
- Delcour J.A., Rouau X., Courtin C.M., Poutanen K., Ranieri R. 2012. Technologies for enhanced exploitation of the health-promoting potential of cereals. *Trends in Food Science & Technology*, 25: 78-86.
- De Brier N., Gomand S. V., Donner E., Paterson D., Delcour J. A., Lombi E., Smolders E. 2015. Distribution of minerals in wheat grains (*Triticum aestivum* L.) and in roller milling fractions affected by pearling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63: 1276-1285.
- Fares C., Troccoli A., Di Fonzo N. 1996. Use of friction debranning to evaluate ash distribution in Italian durum wheat cultivars. *Cereal Chemistry*, 73: 232-234.
- Ficco D.B.M., De Simone V., Colecchia S.A., Pecorella I., Platani C., Nigro F., Finocchiaro F., Papa R., De Vita P. 2014. Genetic variability in anthocyanin composition and nutritional properties of blue, purple, and red bread (*Triticum aestivum* L.) and durum (*Triticum turgidum* L. spp. *turgidum* var. *durum*) wheats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(34): 8686-8695.
- Ficco D.B.M., De Simone V., De Leonardis A.M., Giovanniello V., Del Nobile M.A., Padalino L., Borrelli G.M., De Vita P. 2016. Use of purple durum wheat to produce naturally functional fresh and dry pasta. *Food Chemistry*, 205: 187-195.
- Ficco D.B.M., Borrelli G.M., Miedico O., Giovanniello V., Tarallo M., Pompa C., De Vita P., Chiaravalle A.E. 2020. Effects of grain debranning on bioactive compounds, antioxidant capacity and essential and toxic trace elements in purple durum wheats. *LWT - Food Science and Technology*, 118: 108734.
- Giordano D., Locatelli M., Travaglia F., Bordiga M., Reyneri A., Coisson J. D., Blandino M. 2017. Bioactive compound and antioxidant activity distribution in roller-milled and pearled fractions of conventional and pigmented wheat varieties. *Food Chemistry*, 233: 483-491.
- Giordano D., Blandino M. 2018. Arsenic, lead and cadmium distribution in the pearled fractions of different winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Cereal Science*, 80: 94-101.

## **Pre-trattamenti fisici e biotecnologici per il miglioramento delle proprietà tecnologiche del sorgo**

A. Marti\*, S. Iametti, M. Zanoletti, G. Cardone, M. A. Pagani

Dipartimento di Scienze per gli alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente (DeFENS), Università degli Studi di Milano, Via Celoria 2, 20133 Milano (MI).

\*E-mail: [alessandra.marti@unimi.it](mailto:alessandra.marti@unimi.it)

### **Abstract**

Thermal, enzymatic and sprouting treatments were studied in order to set up biotechnological processes suitable to increase the use of sorghum in baking. The modifications induced by the thermal, germination and enzymatic processes were defined by assessing the rheological properties of wheat dough enriched with 20% of the various sorghum flours. In all cases, the addition of sorghum to wheat gave a decrease in dough stability at the Farinograph test. The formation of gluten in the presence of sorghum is impaired due to interference from sorghum proteins with wheat gluten, as indicated by the GlutoPeak test. The various sorghum-containing doughs also showed a poor leavening ability and impaired carbonic dioxide retention in a Reofermentometer. Mixtures with sprouted sorghum fared better than others as for rising ability, whereas those containing heat-treated (or untreated) sorghum fared better on stability. The formulation containing sorghum treated with exogenous enzymes showed both good rising capacity and sufficient stability. This study indicates that the overall modifications induced by sprouting or by enzymatic treatment are interesting and may be worth testing in baking processes.

### **Riassunto**

Allo scopo di individuare trattamenti idonei a migliorare la performance in panificazione del sorgo, questo cereale è stato sottoposto a trattamenti termici, di germinazione e di idrolisi enzimatica. L'effetto dei trattamenti è stato valutato analizzando l'attitudine alla panificazione di impasti di frumento addizionati del 20% di farina di sorgo. All'analisi farinografica le miscele arricchite si sono tutte distinte per bassa stabilità. Anche il test al GlutoPeak ha evidenziato che l'aggiunta di sorgo generalmente peggiora l'attitudine delle proteine ad interagire formando glutine. L'analisi reofermentografica ha confermato la criticità delle formulazioni addizionate di sorgo, caratterizzate dal decremento dello sviluppo in altezza e dalla minor capacità di trattenere la CO<sub>2</sub>. Nel dettaglio, nelle miscele arricchite con sorgo germinato è stata rilevata una maggiore capacità di sviluppo, mentre gli impasti con sorgo tal quale o sottoposto a un processo termico "a secco" - sebbene poco sviluppate - si sono distinte per una maggior stabilità. Le miscele di sorgo trattate con proteasi esogene hanno mostrato buona capacità di sviluppo e discreta stabilità. Nel complesso questo studio ha evidenziato come le modificazioni associate alla germinazione e al trattamento enzimatico possano essere giudicate complessivamente interessanti, suggerendo di verificarne l'applicazione per panificazioni su scala pilota.

### **Introduzione**

Il sorgo, cereale di origine africana, è oggi ritenuto una materia prima di grande interesse anche nei Paesi occidentali per alcune sue peculiarità, sia di carattere agronomico (le basse esigenze idriche di questa coltura ne permettono la coltivazione anche in climi caldi e siccitosi) che di natura nutrizionale (de Morais Cardoso *et al.* 2017). Infatti, la presenza in elevata quantità di composti funzionali, quali composti fenolici e fibra, rende il sorgo una materia prima idonea

per l'arricchimento di alimenti di base della dieta mediterranea; tuttavia, la mancanza di proteine formanti glutine, se da un lato ne permette l'utilizzo in formulazioni *gluten-free*, dall'altro può produrre effetti negativi sulla struttura e sull'accettabilità sensoriale degli alimenti a base frumento addizionati di suoi sfarinati (Marengo *et al.*, 2015).

Per promuovere l'impiego del sorgo in alimenti quali il pane, è perciò indispensabile individuare trattamenti efficaci a migliorare il comportamento tecnologico di miscele arricchite con questo cereale. Sono stati perciò applicati sia trattamenti idro-termici, che processi di germinazione (formazione "naturale" di un pool di enzimi idrolitici) nonché processi con enzimi esogeni mirati a idrolizzare le proteine del sorgo con l'obiettivo di favorirne l'interazione con quelle del frumento. Le modificazioni così ottenute sono state valutate mediante test reologici di previsione del comportamento in panificazione su miscele di farina di frumento tenero addizionate del 20% di ogni tipologia di sfarinato di sorgo diversamente trattato.

## Materiali e metodi

Su un lotto di granella di sorgo bianco di origine commerciale (BTQ) sono stati condotti trattamenti termici di tostatura (45 min/125°C, campione BT1) o di cottura (15 min/102 °C, campione BT2), processi di germinazione (27 h/22°C, campione BG1 o 32 h/22°C, campione BG2). Sullo sfarinato ottenuto per macinazione della granella sono invece stati condotti trattamenti di idrolisi enzimatica (12 h/22°C, campione BE1) utilizzando un'endopeptidasi commerciale *food grade* con attività tripsino-simile. Dopo i diversi trattamenti la granella o lo sfarinato sono stati essiccati a 60°C. Gli effetti di ogni trattamento sono stati valutati sulle due principali macromolecole presenti nel sorgo e considerando la granella tal quale come controllo. In particolare, per quanto riguarda l'amido sono state analizzate le variazioni della frazione di amido danneggiato (A.D.) e delle *pasting properties* mediante test microviscoamilografico (15 g di campione in 100 ml di acqua distillata; 250 rpm; 300 cmg; 3 °C/min), mentre il profilo proteico è stato studiato mediante misure di solubilità delle proteine in diversi mezzi e SDS-PAGE (Elkhalifa *et al.*, 2017). Infine, l'attitudine alla panificazione delle miscele ottenute addizionando a farina di frumento tenero gli sfarinati di sorgo (rapporto sorgo: frumento pari a 20:80) è stata valutata mediante i test farinografico (50 g di farina; 63 rpm; 30 °C), GlutoPeak (9 g di campione in 10 mL di acqua distillata; 2750 rpm; 35 °C) e reofermentografico (315 g di impasto preparato con farina, acqua (come da analisi farinografica), 1,5% lievito fresco e 1% di sale).

## Risultati e discussione

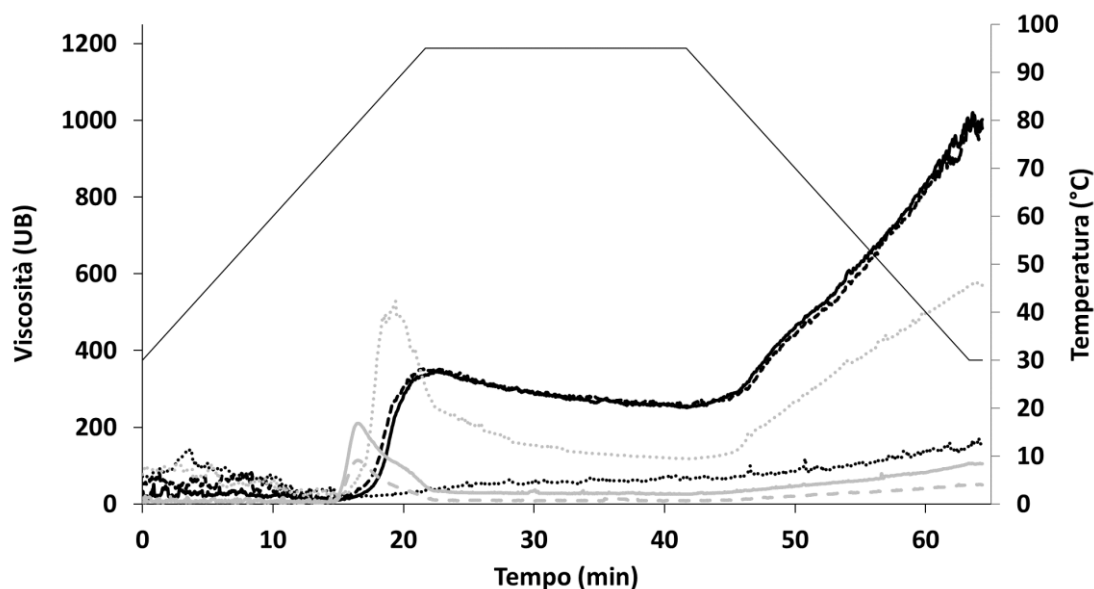
### *Trattamenti sulla granella*

La Figura 1 permette di confrontare, rispetto al sorgo tal quale, gli effetti indotti da ogni trattamento sulla capacità dell'amido di sorgo a rigonfiare e gelatinizzare durante cicli di riscaldamento e raffreddamento in condizioni controllate (*pasting properties*); nella Figura 2 sono riportati i tracciati elettroforetici SDS-Page del sorgo tal quale e dei 5 campioni trattati al fine di valutare le modificazioni promosse dai diversi trattamenti sulle proteine.

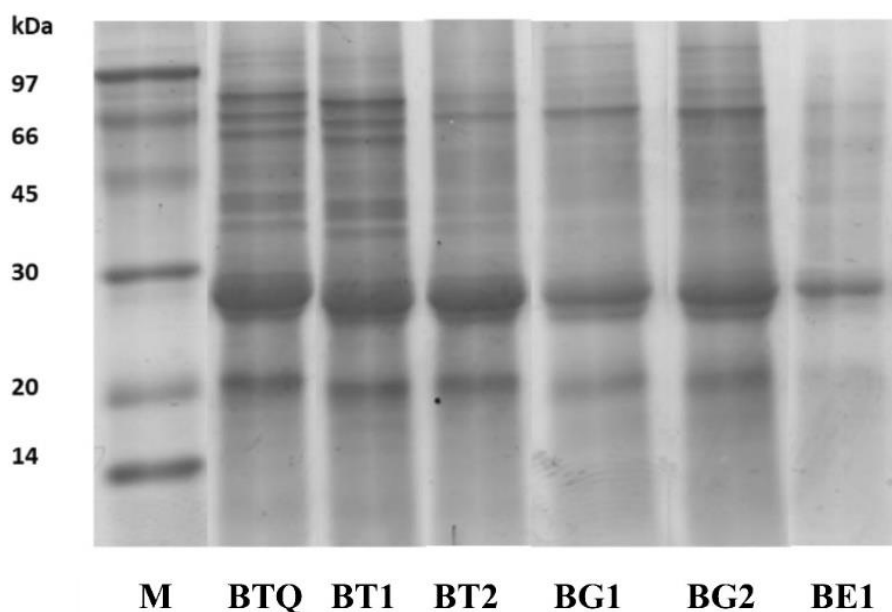
*Trattamenti idrotermici* - Rispetto alla granella di sorgo tal quale, il trattamento BT1 (processo corrispondente ad una tostatura) non produce variazioni importanti né a livello di amido, come indicato dai tracciati viscoamilografici (Fig. 1) e dai valori di A.D. (5,8% e 5,9% per BTQ e BT1, rispettivamente), né a carico delle proteine: i tracciati elettroforetici non mostrano, infatti importanti cambiamenti delle frazioni in funzione del peso molecolare (Fig. 2). Al contrario, il trattamento BT2 (cottura ad alta temperatura con vapore) promuove il raddoppiamento della frazione di amido danneggiato (A.D. =11,7%) e modifica fortemente la capacità dell'amido di



gelatinizzare (assenza di viscosità in tutto periodo di mantenimento a 95° C durante il test viscoamilografico; Fig. 1). Per quanto riguarda le proteine, le alte temperature in presenza di vapore (campione BT2) inducono l'insolubilizzazione e la coagulazione proteica, fenomeni chiaramente riconoscibili nel tracciato elettroforetico di questo campione (Fig. 2) le cui frazioni ad alto peso molecolare diminuiscono sensibilmente.



**Figura 1.** *Pasting properties* dei campioni di sorgo (BTQ, linea nera continua; BT1, linea nera tratteggiata; BT2, linea nera a punti; BG1, linea grigia continua, BG2, linea grigia tratteggiata; BE1, linea grigia a punti).



**Figura 2.** SDS-Page dei campioni di sorgo.

*Trattamenti di germinazione* - Sebbene il processo di germinazione dei cereali sia associato all'accumulo di enzimi idrolitici (in particolare di amilasi), nei campioni BG1 e BG2 si è osservato solo un leggero incremento della frazione di amido danneggiato che si innalza di circa un punto percentuale rispetto a quella della granella tal quale (A.D. = 5,8%, 6,3% e 6,8% per

BTQ, BG1 e BG2, rispettivamente). L'aumento di enzimi amilolitici nei campioni germinati, tuttavia, promuove una spiccata idrolisi dei granuli d'amido da parte delle amilasi non appena lo sfarinato viene disperso nell'acqua durante il test viscoamilografico: di conseguenza, i tracciati dei campioni BG1 e BG2 si distinguono per la bassa viscosità anche a 95°C (Fig. 1), ad indicare l'incapacità dell'amido di rigonfiare a caldo. Il fenomeno è tanto più accentuato quanto più lungo è il tempo di germinazione. La germinazione modifica fortemente anche la componente proteica con attenuazione delle bande ad elevato peso molecolare, soprattutto dopo 32 ore di germinazione.

*Trattamento enzimatico* – Il trattamento con endopeptidasi esogene è responsabile di modificazioni importanti a carico di tutte le frazioni proteiche, sia a basso che alto peso molecolare, come indicato dal tracciato elettroforetico del campione BE1 (Fig. 2). L'accentuata idrolisi della sola frazione proteica si ripercuote sul comportamento dell'amido che, «liberato» dalle proteine che lo avvolgono nel sorgo nativo (Elkhalifa *et al.*, 2017), gelatinizza completamente, assicurando il rapido incremento di viscosità alla dispersione fino al raggiungimento di 88°C; il sistema, tuttavia, perde altrettanto velocemente tale consistenza se sottoposto ad agitazione a caldo (Fig. 1).

*Caratterizzazione degli impasti arricchiti con sfarinati di sorgo* - L'attitudine alla panificazione delle miscele arricchite con sfarinati di sorgo diversamente trattati è stata valutata mediante diversi test reologici, utili a prevedere la capacità di aggregazione delle proteine (GlutoPeak test), il comportamento durante la fase d'impastamento (test farinografico) e di lievitazione (test reofermentografico).

*GlutoPeak test* - Questo test, recentemente proposto per valutare la capacità di aggregazione delle proteine del glutine, evidenzia l'indebolimento della maglia proteica a seguito dell'aggiunta del 20% di farina di sorgo. Come indicato nella Tabella 1, tutte le miscele arricchite presentano una perdita di consistenza del 20-25% rispetto alla farina di frumento, fenomeno senza dubbio correlabile alla diluizione del glutine. Tuttavia, si osservano differenze sensibili sulla base del tempo a cui appare la massima consistenza. In particolare, la miscela con il campione sorgo tal quale (BTQ) e quella con sorgo BT1 danno una risposta analoga, con un ritardo nel tempo di interazione di circa 60 s rispetto a quanto avviene per la farina di frumento. Per quel che riguarda il parametro "Energia", il peggioramento, quantificabile con una riduzione del 10-15% del valore registrato per la farina di riferimento, può tuttavia essere considerato accettabile.

*Analisi farinografica* - L'aggiunta alla farina di frumento di buona qualità panificatoria del 20% di farina di sorgo riduce sensibilmente la stabilità farinografica delle miscele, come indicato nella Tabella 1. In particolare, la capacità di mantenere la consistenza ottimale durante l'impastamento si dimezza, passando da 18 minuti per la farina di frumento a 7-8 minuti per gli impasti addizionati con sorgo tal quale o trattato termicamente. L'aggiunta di sorgo germinato determina invece il crollo della stabilità che si riduce a soli 2 minuti.

*Analisi reofermentografica* - L'indebolimento del tessuto del glutine degli impasti arricchiti con sorgo rilevato con gli altri approcci strumentali è responsabile del minor sviluppo in lievitazione valutato con il test reofermentografico: i dati della Tabella 1 indicano infatti che lo sviluppo si abbassa del 24-28% per tutte le miscele contenenti sorgo, ad eccezione del campione MBT2 (sorgo trattato con vapore), che presenta il comportamento più critico, con perdite che raggiungono il 32%. La ricchezza di enzimi idrolitici delle due miscele con sorgo germinato (MBG1 e MBG2) giustifica l'elevata produzione di CO<sub>2</sub>, superiore del 30% circa rispetto a quella osservata per la farina di frumento (Tab. 1). Sebbene l'indebolimento della

maglia glutinica permetta di trattenerne solo il 62%, l'indice "tempo di apparizione della porosità", prolungato di almeno 20-30 minuti, assicura tempi di lavorazione più prolungati rispetto alle miscele con sorgo trattato termicamente.

In conclusione, le modificazioni associate alla germinazione e al trattamento enzimatico, sebbene indeboliscano le caratteristiche reologiche dell'impasto, possono essere giudicati complessivamente interessanti e meriterebbero di essere applicati per panificazioni su scala pilota.

**Tabella 1.** Indici reologici di previsione dell'attitudine alla panificazione della farina di frumento e delle miscele addizionate con il 20% di sfarinato di sorgo diversamente trattato (tutti i dati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard; differenti lettere nella stessa colonna indicano differenze significative).

Campione	Gluto Peak Test			Test Farinografico		Test Reofermentografico		
	Tempo al picco (s)	Consistenza al picco (BE)	Energia (GPE)	Tempo Sviluppo (min)	Stabilità (min)	CO <sub>2</sub> prodotta (mL)	CO <sub>2</sub> trattenuta (%)	Tempo porosità (h:min:s)
Farina Frumento	141 $\pm$ 1.0 <sup>e</sup>	45 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	2362 $\pm$ 57 <sup>c</sup>	5.7 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	18.27 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	1736 $\pm$ 14.2 <sup>f</sup>	82 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	1:43:30 $\pm$ 0:05:35 <sup>a</sup>
Mix BTQ	202 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	33.7 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>	2378 $\pm$ 57 <sup>c</sup>	1.3 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>	8.3 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	1930 $\pm$ 15.3 <sup>d</sup>	73 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	1:19:30 $\pm$ 0:01:34 <sup>d</sup>
Mix BT1	196 $\pm$ 5.2 <sup>b</sup>	33.1 $\pm$ 0.3 <sup>d</sup>	2393 $\pm$ 36 <sup>a</sup>	1.3 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>	9.2 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	1860 $\pm$ 10.6 <sup>e</sup>	76 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>	1:16:30 $\pm$ 0:02:10 <sup>e</sup>
Mix BT2	133 $\pm$ 1.5 <sup>f</sup>	35.8 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	1999 $\pm$ 64 <sup>g</sup>	1.3 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>	6 $\pm$ 0.1 <sup>e</sup>	2116 $\pm$ 25.1 <sup>b</sup>	70 $\pm$ 2.4 <sup>c</sup>	1:16:30 $\pm$ 0:02:29 <sup>e</sup>
Mix BG1	152 $\pm$ 1.5 <sup>d</sup>	34.8 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>	2125 $\pm$ 28 <sup>e</sup>	4.9 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	2 $\pm$ 0.3 <sup>f</sup>	2526 $\pm$ 18.7 <sup>a</sup>	62 $\pm$ 0.9 <sup>d</sup>	1:27:00 $\pm$ 0:03:51 <sup>c</sup>
Mix BG2	143 $\pm$ 3.2 <sup>e</sup>	35.8 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	2144 $\pm$ 51 <sup>d</sup>	1.3 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>	2.1 $\pm$ 0.1 <sup>f</sup>	2504 $\pm$ 19.2 <sup>a</sup>	62 $\pm$ 0.5 <sup>d</sup>	1:39:00 $\pm$ 0:02:00 <sup>b</sup>
Mix BE1	160 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	36 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	2089 $\pm$ 37 <sup>f</sup>	1.6 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	7 $\pm$ 0.2 <sup>d</sup>	2017 $\pm$ 21.5 <sup>c</sup>	74 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	1:39:00 $\pm$ 0:04:00 <sup>b</sup>

## Ringraziamenti

Si ringrazia lo Studio Tecnico Appiani (Carugate, MI) per i trattamenti idrotermici ed il Molino Quaglia (Vighizzolo d'Este, PD) per i trattamenti di germinazione.

Questa ricerca è parte del progetto "MIND FoodS HUB (Milano Innovation District Food System Hub): Concept innovativo per l'eco-intensificazione delle produzioni agrarie e per la promozione di modelli alimentari per la salute e la longevità dell'uomo attraverso la creazione in MIND di un food system digital Hub" cofinanziato da Regione Lombardia, POR FERS 2014-2020\_BANDO Call HUB Ricerca e Innovazione.

## Bibliografia

- de Moraes Cardoso L., Pinheiro S.S., Martino H.S., Pinheiro-Sant'Ana H.M. 2017. Sorghum (*Sorghum bicolor* L.): nutrients, bioactive compounds, and potential impact on human health. *Critical Review Food Science and Nutrition*, 57(2): 372-390.
- Elkhalifa A.E.O., Bernhardt R., Cardone G., Marti A., Iametti S., Marengo M., 2017. Physicochemical properties of sorghum flour are selectively modified by combined germination-fermentation. *Journal of Food Science and Technology*, 54(10): 3307-3313.
- Marengo M., Bonomi F., Marti A., Pagani M.A., Elkhalifa A.E.O., Iametti S. 2015. Molecular features of fermented and sprouted sorghum flours relate to their suitability as components of enriched gluten-free pasta. *LWT - Food Science and Technology*, 63: 511-518.

## **Composti fenolici liberi e legati in farina di teff (*Eragrostis tef*): determinazione mediante HPLC-ESI-TOF-MS**

*E. Diaz-de-Cerio*<sup>1</sup>, *V. Verardo*<sup>1,2</sup>, *E. Stopponi*<sup>3</sup>, *G.G. Pinnavaia*<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Nutrition and Food Science, University of Granada, 18071 Granada (Spain).

<sup>2</sup>Institute of Nutrition and Food Technology “José Mataix”, University of Granada, 18071 Granada (Spain).

<sup>3</sup>DISTAL, Campus di Scienze degli Alimenti, Università di Bologna, Piazza Goidanich 60, 47521 Cesena (FC), Italia.

<sup>4</sup>Docente a contratto, DICAM, Università di Bologna, Via U. Terracini 28, 40131 Bologna (BO), Italia.

\*E-mail: [giangaetan.pinnavaia@unibo.it](mailto:giangaetan.pinnavaia@unibo.it)

### **Abstract**

The growing interest in Teff (*Eragrostis tef*), a cereal originating from Ethiopia, is linked to its nutritional composition which has a good amount of proteins and essential amino acids, slow-absorbing complex carbohydrates, fiber, minerals, essential fatty acids and phenolic substances. In addition, the absence of gluten makes teff a valid alternative to wheat in the making of bread, pasta and other baked goods for celiac sufferers. The quantitative and qualitative data currently available regarding the phenolic profile of teff are extremely lacking, consequently its phenolic composition is still partially unknown. The aim of this work was the determination of free and bound phenolic compounds in teff flour. The identification and quantification of these compounds was carried out through the combination of high-performance liquid chromatography and mass spectrometry with a time-of-flight analyzer (HPLC-ESI-TOF-MS). The data obtained underline that teff is a source of flavonoids present in free form, while, like other cereals, bound phenols are made up of phenolic acids, mainly represented by ferulic acid and its derivatives.

### **Riassunto**

Il crescente interesse per il Teff (*Eragrostis tef*), cereale originario dell’Etiopia, è legato alla sua composizione nutrizionale che presenta un buon quantitativo di proteine e amminoacidi essenziali, carboidrati complessi a lento assorbimento, fibra, minerali, acidi grassi essenziali e sostanze fenoliche. Inoltre, l’assenza di proteine costituenti il glutine, rende il teff una valida alternativa al frumento nella realizzazione di pane, pasta e altri prodotti da forno destinati ai malati di celiachia. I dati quali e quantitativi attualmente disponibili riguardanti il profilo fenolico del teff sono estremamente carenti, di conseguenza la sua composizione fenolica rimane ancora parzialmente sconosciuta.

La finalità di questo lavoro è stata la determinazione dei composti fenolici liberi e legati in una farina di teff. L’identificazione e la quantificazione di tali composti è stata effettuata attraverso la combinazione della cromatografia liquida ad alte prestazioni e la spettrometria di massa con analizzatore a tempo di volo (HPLC-ESI-TOF-MS). I dati ottenuti sottolineano come il teff sia una fonte di flavonoidi presenti in forma libera, mentre, al pari di altri cereali, i fenoli legati sono costituiti da acidi fenolici, rappresentati maggiormente dall’acido ferulico e i suoi derivati.

### **Introduzione**

Il teff o tef (*Eragrostis tef*) è un cereale appartenente alla famiglia delle Poaceae (Bultosa, 2016). Originario dell’Etiopia, che rappresenta il primo produttore mondiale di teff, è largamente utilizzato nell’alimentazione delle popolazioni locali (Lee, 2018).

Grazie alle sue notevoli capacità di resistenza alla siccità e all'attacco di parassiti, è stato possibile adattare la coltivazione del teff a differenti condizioni climatiche (Gebremariam *et al.*, 2014), perciò negli ultimi anni si sta diffondendo anche in altri Paesi come Sud Africa, USA, India e Australia (Zhu, 2018). Nel 2017, il teff copriva il 24% della superficie nazionale destinata alla coltivazione dei cereali ed era concentrato nelle regioni Amhara e Oromia, che contribuivano per l'87,8% alla produzione totale (Lee, 2018). Secondo Berhane *et al.* (2011), tra il 2001 e il 2007 il teff soddisfaceva circa l'11% del fabbisogno calorico giornaliero della popolazione etiopica, mentre il consumo annuale pro-capite ammontava a 61 kg nelle zone urbane contro appena 20 kg nelle aree rurali. Il crescente interesse per questo cereale è legato alla sua composizione nutrizionale che presenta un buon quantitativo di proteine e amminoacidi essenziali, carboidrati complessi a lento assorbimento, fibra, minerali, acidi grassi essenziali e sostanze fenoliche (Yilmaz e Arslan, 2018). Infine, l'assenza di glutine rende il teff una valida alternativa al frumento nella realizzazione di pane, pasta e altri prodotti da forno destinati ai malati di celiachia (Zhu, 2018).

Oltre a ciò, l'utilizzo di cereali e pseudocereali alternativi al frumento nella realizzazione di prodotti da forno lievitati e non e di paste secche e fresche è ormai prassi consolidata e in continuo sviluppo, sia in Italia, sia a livello europeo e mondiale.

## **Materiali e metodi**

### *Campioni*

È stato analizzato un campione di farina di teff, ottenuta dalla macinazione di una varietà commerciale, acquistata in un negozio di prodotti biologici. La farina così ottenuta è stata conservata a -18 °C in attesa del suo utilizzo.

### *Estrazione dei fenoli liberi*

L'estrazione dei fenoli liberi è stata realizzata secondo il metodo messo a punto da Verardo *et al.* (2011). Sono stati pesati circa 3 g di farina di teff. Il campione è stato addizionato di 40 mL di etanolo all'80% e sonicato per 15 min nel bagno a ultrasuoni BÜCHI B-480 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Switzerland). Per separare la frazione solida, i campioni sono stati centrifugati per 10 min a 5000 rpm mediante centrifuga Sigma 2-16PK (Sigma Laboratory Centrifuges, Osterode am Harz, Germany). È stato prelevato il surnatante e il procedimento è stato ripetuto una seconda volta per massimizzare la resa estrattiva. L'estratto complessivo è stato concentrato mediante evaporatore BÜCHI Rotavapor R-114 in combinazione con BÜCHI Waterbath B-480 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Switzerland).

Il residuo è stato ricostituito in 1 mL di soluzione metanolica (MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v)) e conservato a -18°C in attesa di essere analizzato. Sono state effettuate tre repliche del processo (n=3).

### *Estrazione dei fenoli legati*

L'estrazione dei fenoli legati è stata condotta seguendo il metodo messo a punto da Verardo *et al.* (2011). È stato preparato 1 L di soluzione di NaOH 1 M, ottenuta pesando 40 g di NaOH e portando a volume con acqua bidistillata. Sono stati aggiunti 100 mL di NaOH 1 M a ciascuno dei due campioni rimasti dalla precedente estrazione in una bottiglia di topazio della capacità di 250 mL. È stato aggiunto N<sub>2</sub> nello spazio di testa per 15 secondi e la bottiglia è stata tappata per creare un'atmosfera inerte. I campioni sono stati posti in agitazione per tutta la notte in ambiente oscuro, mantenendo la temperatura del bagno a 13°C.

Il giorno seguente sono stati ripresi i campioni e posti in ghiaccio, dopo aver raccolto eventuali residui dalle pareti della bottiglia con aliquote di acqua distillata. Mediante l'aggiunta di aliquote di HCl (3-4 pipettate circa) ciascuna soluzione è stata portata a un pH compreso tra

2 e 2.5 con l'aiuto di un pHmetro precedentemente calibrato. Un'eventuale eccessiva acidità è stata corretta aggiungendo aliquote di NaOH 1 M.

I campioni sono stati posti in un imbuto separatore, addizionati di 100 mL di acetato di etile e agitati brevemente mantenendo l'imbuto in verticale, onde evitare la formazione di emulsioni che potessero ritardare la separazione delle fasi. Dopo una breve attesa, la fase acquosa inferiore è stata scartata nel vaso contenente il campione iniziale, mentre la fase organica soprastante è stata raccolta in una beuta. Il residuo acquoso è stato nuovamente sottoposto a estrazione con una seconda aliquota di acetato, ottenendo un'ulteriore quantità di estratto da aggiungere alla precedente. L'estratto complessivo è stato anidrificato mediante aggiunta di solfato di sodio e sottoposto a evaporazione nel BÜCHI Rotavapor R-114 per eliminare l'acetato. Il residuo è stato ricostituito in 2 mL di soluzione metanolica (MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v)) e conservato a -18°C in attesa dell'analisi.

#### *Analisi mediante HPLC-ESI-TOF-MS*

Le analisi sono state eseguite mediante un cromatografo liquido ACQUITY UPLC M-Class System di Waters (Waters Corp., Milford, MA, USA), composto da un degaser, una pompa binaria e un autocampionatore accoppiato a uno spettrometro di massa con analizzatore a tempo di volo SYNAP G2 di Waters. La colonna HPLC utilizzata è una colonna Poroshell 120, SB-C18 (3.0×100 mm, 2.7 µm) di Agilent Technologies (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). L'analisi è stata effettuata utilizzando il gradiente proposto da Gomez-Caravaca, et al. (2014). Tutti gli estratti sono stati filtrati con filtri a trottola di nylon da 0,20 µm. La ionizzazione è stata effettuata in modalità negativa in un range di massa m/z 50-1100. La calibrazione dello strumento è stata effettuata per ogni analisi in modalità di calibrazione interna, utilizzando una soluzione nota fornita dall'azienda Waters.

#### **Risultati e discussione**

I composti fenolici liberi identificati mediante HPLC-ESI-TOF-MS sono riportati nella seguente tabella (Tab. 1).

**Tabella 1.** Composti fenolici liberi identificati mediante HPLC-ESI-TOF-MS

N°	Composto polare	Tempo di ritenzione (t <sub>R</sub> )	Formula molecolare	m/z sperimentale	m/z calcolato	Errore (ppm)	Fit %
1	Apigenina diesoside isomero I	7,766	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	593,1512	593,1506	1	99,81
2	Luteolina diesoside	7,783	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	609,1461	609,1456	0,8	99,89
3	Apigenina diesoside isomero II	7,816	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	593,1509	593,1506	0,5	99,73
4	Apigenina esoside pentoside isomero I	8,825	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	563,1394	563,1401	-1,2	97,41
5	Apigenina diesoside isomero III	9,04	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	593,1502	593,1506	-0,7	99,11
6	Apigenina esoside pentoside isomero II	9,384	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	563,1407	563,1401	1,1	99,99
7	Apigenina esoside isomero I	9,649	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	431,0984	431,0978	1,4	99,41
8	Apigenina esoside isomero II	10,567	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	431,0984	431,0978	1,4	99,9
9	Apigenina-7-Me-6/8-glucoside isomero I	10,985	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	445,1149	445,1135	3,1	99,03
10	Acetil-vitexina isomero I	11,188	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	473,109	473,1084	1,3	98,77
11	Luteolin-siringilarabinosil-glucoside	11,53	C <sub>35</sub> H <sub>36</sub> O <sub>19</sub>	759,1786	759,1773	1,7	15,7
12	Apigenina neoesperidoside	11,862	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	577,1564	577,1557	1,2	99,61
13	Acetil-vitexina isomero II	12,45	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	473,1086	473,1084	0,4	100
14	Apigenin-siringilarabinosil-glucoside	12,582	C <sub>35</sub> H <sub>36</sub> O <sub>18</sub>	743,1811	743,1823	-1,6	86,95
15	7-metil apigenin-succinil glucoside	13,53	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	515,1202	515,119	2,3	99,92

Il contenuto totale di fenoli liberi, ottenuto come somma delle singole concentrazioni, è risultato essere pari a  $113 \pm 2 \mu\text{g/g}$  d.w. di campione. Prevalgono i derivati dell'apigenina (circa l'86% dei fenoli liberi), mentre i derivati della luteolina costituiscono appena il 6% del totale. In particolare, è stata riscontrata un'elevata quantità di apigenina esoside (isomero I), pari a  $42 \pm 3 \mu\text{g/g}$  d.w., seguita dall'isomero III di apigenina di-esoside ( $15 \pm 2 \mu\text{g/g}$  d.w.) e dall'apigenina siringilarabinosil-glucoside ( $7 \pm 1 \mu\text{g/g}$  d.w.). Tra i derivati dell'apigenina non sono da trascurare l'apigenina neoesperidoside ( $5,30 \pm 0,06 \mu\text{g/g}$  d.w.), l'isomero I di apigenina esoside pentoside ( $4,8 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$  d.w.) e l'apigenina-7-metil-6/8-glucoside ( $4,7 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$  d.w.).

Per quanto riguarda i composti della luteolina, prevale la luteolina diesoside, stimata in concentrazione pari a  $4,3 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$  d.w., mentre la quantità di luteolina-siringilarabinosilglucoside è poco più della metà ( $2,9 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$  d.w.).

Da notare una discreta quantità di acetil-vitexina nella forma isomerica I, pari a  $5,2 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$  d.w. Sebbene dal punto di vista qualitativo i risultati ottenuti siano in accordo con quelli riportati da Ravisankar *et al.* (2018), l'aspetto quantitativo presenta differenze significative. Secondo tale fonte, il composto presente in maggiore quantità è la luteolina diesoside, in concentrazione variabile tra  $599,3 \pm 32,9$  (teff scuro, coltivato in Etiopia) e  $375,1 \pm 5,7 \mu\text{g/g}$  (teff scuro, coltivato negli USA). Altri composti fenolici liberi presenti in quantità significative sono l'isomero III dell'apigenina diesoside (tra  $590,4 \pm 13,9$  e  $375,1 \pm 5,7 \mu\text{g/g}$ ) e l'isomero I dell'apigenina esoside (tra  $388,3 \pm 7,4$  e  $195,2 \pm 3,9 \mu\text{g/g}$ ), riscontrati nella stessa varietà di teff chiaro, coltivato in Etiopia oppure negli USA. Pertanto, le analisi effettuate da Ravisankar *et al.* (2018) sembrano suggerire che la variabilità del dato quantitativo non dipenda solo dalla varietà di pianta (teff chiaro o scuro), ma anche dalle modalità e dal luogo di coltivazione.

Totalmente discordanti sono i risultati ottenuti da Kotásková *et al.* (2016). La fonte riporta un contenuto totale in fenoli liberi nettamente superiore (tra  $284,5$  e  $626,6 \mu\text{g/g}$ ); inoltre, i composti prevalenti sono acidi fenolici come il trans-p-cumarico, il protocatecuico, il ferulico e il gallico nella varietà scura e gli acidi protocatecuico e ferulico nella varietà bianca. Tale discrepanza potrebbe essere attribuita sia all'impiego di un'altra varietà di teff, sia al differente metodo di analisi (HPLC-DAD) che è meno specifico della metodologia che utilizza lo spettrometro di massa come detector.

Ancora maggiore è il contenuto in fenoli liberi riportato da Koubov *et al.* (2018): tra  $530,8 \pm 1,8$  (teff bianco) e  $751 \pm 2,1 \text{ mg/kg}$  (teff marrone). Anche in questo studio, i composti prevalenti nella frazione solubile sono acidi fenolici (soprattutto ferulico, protocatecuico, p-cumarico ed ellagico), mentre si riscontra una minore concentrazione di flavonoidi (rutina ed epigallocatechina).

I composti fenolici legati identificati sono riportati nella seguente tabella (Tab. 2).

**Tabella 2.** Composti fenolici legati identificati mediante HPLC-ESI-TOF-MS

N°	Composto polare	Tempo di ritenzione (t <sub>R</sub> )	Formula molecolare	m/z sperimentale	m/z calcolato	Errore (ppm)	Fit %
1	Acido ferulico	7,945	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	193,0511	193,0501	5,2	21,3
2	Acido isoferulico	8,685	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	193,0513	193,0501	6,2	
3	5,5'- acido diferulico	11,2	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	385,0911	385,0923	-3,1	41,44
4	8,5'- acido diferulico	11,96	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	385,0921	385,0923	-0,5	97,97
5	8,4'- acido diferulico	14,122	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	385,0918	385,0923	-1,8	93,82

Il contenuto totale in fenoli legati dell'estratto insolubile di teff è di  $125 \pm 3 \mu\text{g/g}$  d.w., valore nettamente inferiore a quelli ottenuti da Ravisankar *et al.* ( $600 - 728 \mu\text{g/g}$  d.w.), da Kotásková *et al.* ( $188,4 - 423,3 \mu\text{g/g}$ ) e da Koubov *et al.* (tra  $272,2 \pm 2,0$  e  $321,5 \pm 3,1 \text{ mg/kg}$ ). Come

riscontrato dal presente studio, le tre fonti concordano nell'affermare che la frazione insolubile è dominata dagli acidi fenolici.

In accordo con Ravisankar *et al.* (2018), prevalgono le forme monomeriche quali l'acido isoferulico ( $54,7 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$ ) e l'acido ferulico ( $17,5 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$ ). Tra i deidrodimeri dell'acido ferulico, il composto principale è l'8,4'-DiFA, presente in concentrazione di  $42 \pm 1 \mu\text{g/g d.w.}$ . Altri studi hanno evidenziato una maggiore varietà di fenoli legati: accanto all'acido ferulico, Kotásková *et al.* (2016) ipotizzano la presenza di quercetina, catechina e acido gallico (nel teff marrone) e di quercetina, catechina e rutina (nel teff bianco).

Secondo Koubov *et al.* (2018) sarebbero presenti anche acido gallico, acido sinapico, acido ellagico, catechina ed epigallocatechina

L'uso dell'HPLC-ESI-TOF-MS ha permesso l'identificazione e quantificazione di due isomeri che non erano stati precedentemente identificati. Al momento altri composti sono in via di identificazione.

I dati presentati in questo lavoro presentano valori di composti fenolici inferiori a quelli presenti in bibliografia. Il motivo principale risiede nel fatto che è stato analizzato teff bianco che probabilmente ha un contenuto di composti fenolici inferiore.

## **Bibliografia**

- Berhane G., Paulos Z., Tafere K., Tamru S. 2011. Foodgrain consumption and calorie intake patterns in Ethiopia, Ethiopia strategy support program II, documento di lavoro n°23.
- Bultosa G. 2016. Teff: Overview, In C. Wrigley; H. Corke; K. Seetharaman e J. Faubion, *Encyclopedia of food grains*, Academic Press, 209-220.
- Gebremariam M.M., Zarnkow M., Becker T. 2014. Teff (*Eragrostis tef*) as a raw material for malting, brewing and manufacturing of gluten-free foods and beverages: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 51: 2881-2895.
- Gómez-Caravaca A.M., Verardo V., Berardinelli A., Marconi E., Caboni M.F. 2014. A chemometric approach to determine the phenolic compounds in different barley samples by two different stationary phases: A comparison between C18 and pentafluorophenyl core shell columns. *Journal of Chromatography A*, 1355: 134-142.
- Kotásková E., Sumczynski D., Mlček J., Valášek P. 2016. Determination of free and bound phenolics using HPLC-DAD, antioxidant activity and in vitro digestibility of *Eragrostis tef*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 46: 15-21.
- Koubov' a E., Sumczynski D., Šenk' arov' a L., Orsavov' a J., Fišera M. 2018. Dietary intakes of minerals, essential and toxic trace elements for adults from *Eragrostis tef* L.: a nutritional assessment. *Nutrients*, 10: 1-11.
- Lee H. 2018. Teff, A Rising Global Crop: Current Status of Teff Production and Value Chain. *The open agriculture journal*, 12: 185-193.
- Ravisankar A., Abegaz K., Awika J.M. 2018. Structural profile of soluble and bound phenolic compounds in teff (*Eragrostis tef*) reveals abundance of distinctly different flavones in white and brown varieties. *Food Chemistry*, 263: 265-274.
- Verardo V., Gómez-Caravaca A.M., Marconi E., Caboni M.F. 2011. Air classification of barley flours to produce phenolic enriched ingredients: Comparative study among MEKC-UV, RPHPLC-DAD-MS and spectrophotometric determinations. *LWT - Food Science and Technology*, 44: 1555-1561.
- Yilmaz H.O., Arslan M. 2018. Teff: Nutritional Compounds and Effects on Human Health. *Acta Scientific Medical Science*, 2.9: 15-18.
- Zhu F. 2018. Chemical composition and food uses of teff (*Eragrostis tef*). *Food Chemistry*, 239: 402-415.



## **Realizzazione di nuovi prodotti a base di cereali ad elevato valore nutrizionale.**

### ***Il progetto “IN.TE.GRA. - INnovazioni TEcnologiche GRani Antichi”***

A. Zappalà<sup>1</sup>, F. Sciacca<sup>1\*</sup>, M. Palumbo<sup>1</sup>, A. Pesce<sup>1</sup>, M. Bizzini<sup>2</sup>, S. Licciardello<sup>1</sup>, E. Li Puma<sup>1</sup>, A. Leonardi<sup>1</sup>, G. Spina<sup>3</sup>, A. Barbera<sup>4</sup>, N. Virzi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali (CREA-CI), Laboratorio di Acireale - Corso Savoia 190, 95024 Acireale (CT).

<sup>2</sup>Stazione Consorziale Sperimentale di Granicoltura per la Sicilia. Via Sirio 1, 95041 Santo Pietro - Frazione di Caltagirone (CT).

<sup>3</sup>Studio Associato Agriengineering - Via Imperia 13, 95128 Catania (CT).

<sup>4</sup>Università degli Studi di Catania - Dipartimento di Agricoltura, Alimentazione e Ambiente - Via Valdisavoia 5, 95123 Catania (CT).

\*E-mail: [fabiola.sciacca@crea.gov.it](mailto:fabiola.sciacca@crea.gov.it)

## **Abstract**

In this work, the preliminary data emerged from the merceological, qualitative and biochemical evaluation of the genotypes of old Sicilian landraces of durum wheat (Timilia, Margherito, Russello and Farro Lungo) and bread wheat (Romano and Maiorca) are presented to be used for the characterization of a product with a high nutritional value, *bulgur*, examined in the context of the project “IN.TE.GRA. - INnovations TEchnological GRani Antichi”, financed by sub-measure 16.1 of the P.S.R. Sicily 2014/20. Furthermore, the “IN.TE.GRA.” Project, currently under construction, aims to improve the formulation of flour mixtures to be used in the production of pizza loaves and provides for the characterization and technological evaluation of derivative flours by an innovative grinding process that allows the temperature to be lowered during the processing phases. For the purposes of traceability of raw materials, the project involves the determination of their biochemical fingerprinting, through the determination of high and low molecular weight glutenin subunits, by SDS electrophoresis.

## **Riassunto**

In questo lavoro, vengono presentati i dati preliminari emersi dalla valutazione merceologica, qualitativa e biochimica dei genotipi di vecchie popolazioni siciliane di frumento duro (Timilia, Margherito, Russello e Farro Lungo) e di frumento tenero (Romano e Maiorca) da destinare alla caratterizzazione di un prodotto ad alto valore nutrizionale, il *bulgur*, esaminati nell'ambito del progetto “IN.TE.GRA. - INnovazioni TEcnologiche GRani Antichi”, finanziato dalla sottomisura 16.1 del P.S.R. Sicilia 2014/20. Inoltre, il progetto, attualmente in fase di realizzazione, si prefigge l'obiettivo di individuare la formulazione ottimale di miscele di sfarinati, da destinare alla realizzazione di panetti per pizza. È prevista la caratterizzazione e valutazione tecnologica di sfarinati derivati da un innovativo processo di macinazione che consente l'abbassamento della temperatura durante le fasi di lavorazione. Ai fini della tracciabilità delle materie prime, il progetto contempla anche la determinazione del loro *fingerprinting* biochimico, attraverso la determinazione delle subunità gluteniniche ad alto e a basso peso molecolare, mediante elettroforesi in SDS PAGE.

## **Introduzione**

Il territorio siciliano rappresenta una delle poche zone dell'Europa meridionale nella quale è ancora possibile trovare antiche popolazioni locali di frumenti duro e tenero. Molte di questi materiali genetici non vengono più coltivati a seguito della maggiore diffusione di nuove varietà più produttive e più adatte alle esigenze dei trasformatori. Il rischio dell'erosione genetica, unito

agli orientamenti della PAC e all'introduzione di sistemi agricoli sempre più sostenibili, hanno contribuito a spingere l'interesse di agricoltori e consumatori verso prodotti locali tipici e dotati di peculiari caratteristiche qualitative e organolettiche. In questo contesto, la sede di Acireale del Centro di ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali del CREA ha rivolto il proprio interesse verso la valutazione qualitativa di prodotti a base di cereali, in particolare pani, caratterizzati da elevate proprietà nutrizionali e qualitative. Nell'ambito della sottomisura 16.1 del P.S.R. 2014/20 "Sostegno per la costituzione e la gestione dei gruppi operativi del PEI in materia di produttività e sostenibilità dell'agricoltura", è stato avviato il Progetto "Innovazioni Tecnologiche Grani Antichi" (IN.TE.GRA.). L'obiettivo del progetto, in fase di realizzazione, è quello di mettere a punto e caratterizzare nuovi prodotti ad elevato valore nutrizionale ed introdurre, nell'ambito delle tecniche colturali, l'agricoltura di precisione nell'attuale contesto cerealicolo siciliano.

### **Materiali e metodi**

A sostegno delle sei aziende agricole coinvolte nel progetto "IN.TE.GRA.", dislocate nelle aree interne della Sicilia, è stato messo a punto dal CREA un protocollo di coltivazione, in regime biologico, idoneo alle caratteristiche pedoclimatiche degli ambienti cerealicoli siciliani e sono in fase di valutazione antiche *landraces* siciliane di frumento duro (Timilia, Margherito, Russello e Perciasacchi) e di frumento tenero (Romano e Maiorca). Inoltre, in collaborazione con il Dipartimento di Agricoltura, Alimentazione e Ambiente (Di3A) dell'Università di Catania, è stato predisposto un piano di fertilizzazione in regime biologico, allo scopo di valutare la capacità delle popolazioni di instaurare una simbiosi con funghi micorrizici arbuscolari (AMF) e batteri promotori della crescita

Ai fini della caratterizzazione qualitativa e tecnologica, sulle cariossidi dei genotipi in studio, da destinare alla trasformazione in *bulgur*, sono state eseguite analisi per la determinazione dei parametri merceologici e qualitativi. Attraverso l'Infratec grain analyzer 1241 – FOSS, sono stati determinati l'umidità, il peso ettolitrico, il contenuto proteico e in glutine, la durezza (*hardness*) dei frumenti teneri. Sono in fase di realizzazione le analisi sugli sfarinati, eseguite mediante il sistema Glutomatic, per la determinazione del contenuto e della qualità del glutine (metodo UNI n° 10690), e utilizzando l'alveografo di Chopin, per la determinazione degli indici alveografici (metodo UNI n° 10453). Al momento, i dati non sono ancora disponibili. La caratterizzazione biochimica delle proteine di riserva della cariosside è stata condotta su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE), per l'identificazione delle subunità gluteniniche ad alto e a basso peso molecolare, utilizzando il metodo descritto da Payne *et al.* (1981).

### **Risultati e discussione**

Per quanto ancora parziali, i risultati della sperimentazione relativi al raccolto 2021, riportati nelle Tabelle 1 e 2, mettono in evidenza le diverse caratteristiche qualitative delle *landraces* in studio. Per quanto riguarda le accessioni di frumento duro, i risultati delle analisi condotte sulla granella hanno evidenziato che Timilia ha espresso valori più elevati del contenuto proteico e in glutine, oltre che dell'indice di giallo. Per quanto riguarda i parametri merceologici, correlati con la qualità molitoria, Margherito ha mostrato ottimi valori del peso ettolitrico e del peso delle mille cariossidi, mentre Perciasacchi ha confermato valori elevati del peso dei 1000 semi.

**Tabella 1.** Indici qualitativi delle *landraces* di frumento duro

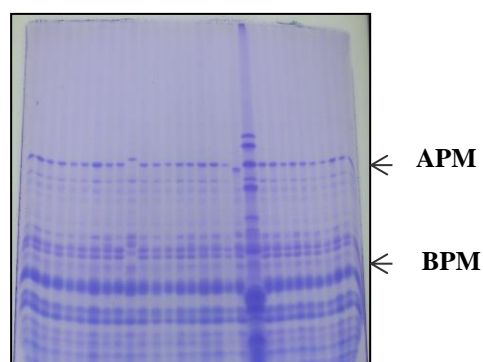
FRUMENTO DURO							
ACCESSIONE	Umidità (%)	Proteine (% s.s.)	Glutine (% s.s.)	Indice di giallo (b*)	Peso ettolitrico (kg/hL)	Peso 1000 semi (g)	Germinabilità (%)
MARGHERITO	9,3	10,6	6,7	13,6	84,5	50,0	91
PERCIASACCHI	8,7	10,6	6,8	13,3	79,0	50,7	92
RUSSELLO	8,7	10,7	7,0	14,0	81,6	34,5	95
TIMILIA	9,9	14,0	10,8	14,8	79,8	32,3	91

Per quanto riguarda i frumenti teneri, Maiorca ha mostrato il valore più elevato del tenore proteico e del peso ettolitrico, mentre Romano ha evidenziato un peso dei 1000 semi più elevato, ma un contenuto proteico molto modesto (Tab. 2).

**Tabella 2.** Indici qualitativi delle *landraces* di frumento tenero

FRUMENTO TENERO						
ACCESSIONE	Umidità (%)	Proteine (% s.s.)	Peso ettolitrico (kg/hL)	Hardness	Peso 1000 semi (g)	Germinabilità (%)
MAIORCA	8,4	11,4	79,4	75,9	35,2	98
ROMANO	8,5	9,9	76,9	79,4	40,9	97

Per quanto riguarda la caratterizzazione biochimica delle accessioni in studio, i risultati delle analisi condotte su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) hanno permesso di evidenziare le subunità gluteniniche ad alto (APM) e a basso (BPM) peso molecolare, caratteristiche di ciascuna accessione. Il *pattern* elettroforetico determinato permette di ottenere il *fingerprinting* biochimico dei genotipi, consentendone la loro tracciabilità (Fig. 1).



**Figura 1.** Pattern elettroforetico di Timilia

I risultati ottenuti dalle analisi condotte sulla granella e sugli sfarinati delle *landraces* siciliane in studio, insieme alle determinazioni analitiche ancora in corso di realizzazione, pongono le basi per l'ottenimento dei prodotti attesi dal progetto "IN.TE.GRA.", quali il *bulgur* e le miscele di sfarinati per innovativi panetti per pizza, dotati di elevato valore nutrizionale e caratteristiche qualitative e organolettiche gradite a consumatori sempre più esigenti e rivolti a prodotti diversificati.

### **Bibliografia**

Palumbo M., Sciacca F., Virzì N., Spina A. 2005. Study of storage protein composition, qualitative characteristics and bread-making quality in durum wheat Sicilian landraces [*Triticum durum* Desf.]. *Tecnica Agricola*, 53-64 (Italy).

Payne P. I., Holt L. M., Law C. N. 1981. Structural and genetical studies on the high-molecular-weight subunits of wheat glutenin. *Theoretical and Applied Genetics*, 60(4): 229-236.

*Lavoro realizzato nell'ambito del progetto "IN.TE.GRA. - INnovazioni TEcnologiche GRani Antichi", approvato e finanziato nell'ambito della Sottomisura 16.1 "Sostegno per la costituzione e la gestione dei gruppi operativi del P.E.I. in materia di produttività e sostenibilità dell'Agricoltura" del Programma di Sviluppo Rurale 2014-2022 della Regione Sicilia, in attuazione del Fondo europeo agricolo di sviluppo rurale (FEASR).*

## Lista degli autori

**A**grimonti C.; 165

Aguzzi A.; 155

Albanese G.; 280

Alberti I.; 189

Alfeo V.; 12

Allegra M.; 284; 289

Amenta M.; 284

Anchisi E.; 184

Angelicola M.; 86; 232

Annabi M.; 247

Arcangeli A.; 179; 318

Arlorio M.; 7

**B**alconi C.; 146

Barbera A.; 373

Barbiroli A.; 37; 41

Basili O.; 179

Beleggia R.; 91

Belocchi A.; 131; 179

Benbelkacem A.; 247

Bertola M.; 247

Bisaglia C.; 212

Bizzini M.; 284; 289; 373

Blandino M.; 7; 17; 111; 160; 207

Blangiforti S.; 151

Bonarrigo M.; 136

Bonassisa L.; 22

Bonomi F.; 41

Borgo L.; 170; 194

Borrelli G. M.; 358

Borriello A.; 101

Boscaino F.; 252

Botticella E.; 81; 91

Bravi E.; 12; 338; 353

Buonocore P.; 151

Burešová B.; 17

**C**abizza R.; 328

Caboni M.F.; 96; 343; 348

Cacciatori P.; 141

Caldara M.; 126

Calì M.; 189

Cammerata A.; 131

Canale M.; 56; 151; 284; 289

Cantale C.; 338

Cantalupi A.; 106; 175

Capo L.; 207

Caponio F.; 266

Cappelletti E.; 189

Caproni R.; 198

Carcea M.; 237; 293

Cardone G.; 363

Carini E.; 66

Carnia A.; 170; 194

Casali M.; 175

Cavella S.; 101

Cecchini C.; 323

Chiaravalle A. E.; 358

Chiodetti M.; 66

Cibelli M.; 308; 313

Ciccoritti R.; 71; 141

Cimini A.; 27; 51; 81; 308; 313

Cirlini M.; 66

Coisson J.D.; 7

Colombo A.M.; 7

Conte P.; 298; 303

Coppola R.; 271; 280

Cormegna M.; 242

Cortassa M.; 7

Costa C.; 323

Costantini M.; 266

Covino C.; 46; 262

Cuomo F.; 76

**D'**Angelo D.; 276

D'Auria G.; 111

Dahdah P.; 328

Dall'Asta C.; 160

De Angelis D.; 266

De Arcangelis E.; 81; 86

De Francesco G.; 338; 353

De Luise G.; 146

De Maio E.; 22

De Vita P.; 22; 56; 91; 116; 212; 358

Del Caro A.; 298; 303  
Del Nobile M.A.; 56  
Del Vecchio L.; 66  
Di Fazio A.; 66  
Di Nardo V.; 86; 155  
Di Nunzio M.; 37  
Di Pierro P.; 46; 262  
Di Renzo T.; 252  
Di Stasio L.; 111; 121; 257  
Di Stefano V.; 61  
Diaz-de-Cerio E.; 368  
Donna M.; 160  
Durante M.; 71  
Durazzo A.; 293

**E**l-Fatehi S.; 247  
Emide D.; 41  
Esposito S.; 22

**F**accini N.; 276  
Fadda C.; 298; 303; 328  
Falasca L.; 76; 86  
Falciano A.; 27  
Fallot A.; 247  
Fantozzi E.; 106  
Farbo M. G.; 298; 303; 328  
Ferranti P.; 111; 257  
Ficco D. B. M.; 56; 358  
Figorilli S.; 323  
Finamore A.; 293  
Folloni S.; 2; 184  
Fornara M.; 131; 179

**G**abrielli P.; 151  
Galassi E.; 71; 131; 141; 318; 333  
Galaverna G.; 247  
Galeffi P.; 338  
Gambacorta G.; 91  
Garcia Molina M.D.; 91  
Gardella M.; 37  
Gazza L.; 71; 141; 237; 247; 318; 333; 338  
Gianinetti A.; 276  
Giannelli G.; 165  
Giannone V.; 56; 289  
Giovanniello V.; 56; 358

Gosparini E.; 131; 318  
Gozzi M.; 160  
Grando S.; 2  
Graziano S.; 126  
Gretter C.; 2  
Gulli M.; 126

**H**assoun G.; 328

**I**acovino S.; 76; 86; 232  
Iametti S.; 37; 41; 363  
Iori A.; 131; 179  
Iorizzo M.; 271; 280  
Iraci Capuccinello D.; 189

**K**ouagang Tchakoutio P.; 318

**L**afiandra D.; 81; 91; 136  
Landolfi V.; 7  
Latini A.; 338  
Lecce L.; 56  
Lenucci M. S.; 71  
Leonardi A.; 61; 276; 373  
Letizia F.; 280  
Li Puma E.; 61; 276; 289; 373  
Licciardello S.; 61; 276; 373  
Lo Scalzo A.M.; 276  
Lombardi S. J.; 271; 280  
Loscalzo M.; 7  
Lucini L.; 184

**M**aestri E.; 126  
Malagesi F.; 179  
Mamone G.; 111; 121; 252; 257  
Mangini G.; 116  
Manni F.; 22  
Marceddu S.; 303  
Marchini M.; 2; 184  
Marconi E.; 22; 76; 86; 121; 155; 343  
Marconi O.; 12; 338; 353  
Mariotti R.; 179  
Marmioli N.; 126

Marti A.; 37; 363  
Martinek P.; 17  
Marulo S.; 252  
Marzocchi S.; 96; 343; 348  
Masci M.; 198; 237  
Masci S.; 91; 136  
Masi P.; 27; 46; 111; 257; 262  
Mattera M.; 227  
Mazzon V.; 131  
Melilli M. G.; 61  
Meloni R.; 160  
Menesatti P.; 323  
Meriggi P.; 222  
Messia M. C.; 22; 76; 86; 96; 121; 232; 343; 348  
Messina B.; 136  
Miazzi M. M.; 116  
Miceli C.; 136  
Miedico O.; 358  
Miele N.A.; 101  
Monci D.; 32  
Montanari M.; 189  
Moresi M.; 27; 51; 81; 308; 313  
Mortaro R.; 318  
Moscaritolo S.; 22  
Moschini V.; 2  
Murru A.; 333

**N**arducci V.; 293  
Natale C.; 141; 318; 333  
Nazzaro F.; 271  
Navigato T.; 198  
Nitride C.; 257  
Nocente F.; 71; 141; 318; 333; 338

**P**adalino L.; 56  
Pagani M. A.; 363  
Pallottino F.; 323  
Palmeri R.; 284  
Palombieri S.; 22; 91; 136  
Palumbo M.; 61; 212; 276; 373  
Pasini F.; 96; 343; 348  
Pasini G.; 165  
Pasqualone A.; 266; 289  
Pecchioni N.; 203  
Pecorella I.; 212

Perretti G.; 12; 353  
Pesce A.; 61; 276; 373  
Pesce F.; 284  
Petitti M.; 2  
Piazza C.; 2; 184  
Piga A.; 298; 303; 328  
Pinnavaia G.G.; 368  
Poliziani A.; 51; 81  
Pompa C.; 358  
Potestio S.; 136  
Prodi A.; 189

**Q**uaranta F.; 131; 179  
Quiquero M.; 86; 232

**R**avagli C.; 96; 348  
Reale A.; 121; 232; 252  
Redaelli R.; 146  
Reyneri A.; 207  
Righetti L.; 160  
Rollini M.; 37  
Romani M.; 175  
Romano A.; 111; 257  
Romano E.; 212  
Roselli M.; 293  
Rossi V.; 222  
Ruggeri M.; 217; 222  
Ruggeri S.; 151; 155  
Ruggieri R.; 217  
Rumpel C.; 247  
Russo G.; 136

**S**aia S.; 212  
Sansoni F.; 203  
Sardella C.; 17; 160  
Scapino M.; 207  
Scarpino V.; 7; 207  
Sciacca F.; 61; 212; 276; 373  
Senatore M.T.; 189  
Sereni L.; 141  
Sestili F.; 22; 86; 91; 136  
Sileoni V.; 12; 353  
Silletti R.; 266  
Simonelli C.; 106; 170; 175; 194; 242  
Sommovigo A.; 2

Sorrentino A.; 46; 262  
Sorrentino E.; 271; 280  
Spina A.; 56; 151; 165; 284; 289; 358  
Spina G.; 373  
Squeo G.; 266  
Stevanato P.; 116  
Stopponi E.; 368  
Strano M.C.; 284; 289  
Succi M.; 280  
Summo C.; 266

**T**addei A.R.; 308  
Taddei F.; 71; 131; 141; 318; 333  
Tarallo M.; 358  
Taranto F.; 116  
Terzi V.; 237  
Testa B.; 271; 280  
Todaro A.; 284; 289  
Tommasi L.; 22  
Torri A.; 146  
Torrieri E.; 101  
Travaglia F.; 7

Tremonte P.; 271; 280  
Trivisonno M.C.; 76; 86  
Turfani V.; 293

**V**accino P.; 203; 237; 242  
Valente A.; 7  
Valoti P.; 146  
Vanara F.; 17; 207  
Velleca N.; 101  
Verardo V.; 368  
Vinci G.; 217  
Virzì N.; 61; 212; 276; 373  
Visioli G.; 165; 247  
Volante A.; 203  
Volpato M.; 22  
Vurro F.; 266

**Z**accaria M.; 227  
Zanoletti M.; 363  
Zappalà A.; 373



**NOTE**

## NOTE



**ISBN: 978-88-906680-7-4**