



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE

**Dipartimento di Agricoltura, Ambiente e Alimenti**

Dottorato di Ricerca in Biotecnologia degli Alimenti

XXVII Ciclo

***Germe di grano e quinoa: ingredienti alternativi  
per lo sviluppo di alimenti ad alta valenza  
tecnologica e nutrizionale***

***Settore Scientifico Disciplinare: AGR/15***

***Coordinatore del dottorato: Emanuele Marconi***

Tutor

*Prof. Emanuele Marconi*

Dottorando

*Paolo Gioia*

*Matr. 146245*

Co-Tutor

*Prof.ssa Maria Cristina Messia*

*paolo.gioia@studenti.unimol.it*

Anno Accademico 2013/2014

## *Abstract*

In this research activity, alternative ingredients such as wheat germ and quinoa, have been studied in order to develop innovative foods. Their chemical, nutritional and technological characteristics have been evaluated.

Results showed that quinoa and wheat germ contain remarkable amounts of some nutrients (protein, fat and dietary fiber) and bioactive compounds (amino acids, essential fatty acids, tocopherols, polyphenols), which are useful for developing new value added products.

Viewing the importance of these raw materials, innovative cereal foods (bread, pasta, biscuits) were produced which are able to meet consumers requirements and, at the same time, to have enhanced nutritional value compared to traditional products.

Since quinoa seeds are rich in saponins, dehulling/pearling process of quinoa achenes removed around 70% of saponins, providing flours with high sensory acceptability.

Wheat germ extracts exhibited a marked antimicrobial activity because of their polyphenolic components.

Thus, it can be used for developing of fresh pasta with enhanced bioactive compounds and prolonged shelf life by inhibition of degradative microorganisms.

## **Riassunto**

Le attività sperimentali sono state focalizzate su due diverse linee di ricerca, nell'ambito delle quali sono stati caratterizzati dal punto di vista chimico, nutrizionale e tecnologico ingredienti alternativi, quali il germe di grano e la quinoa, per la preparazione di prodotti alimentari innovativi.

Dalla caratterizzazione chimico-nutrizionale è emerso che il germe e la quinoa contengono quantità significative di nutrienti (proteine, grassi e fibra alimentare) e componenti bioattive (amminoacidi, acidi grassi essenziali, tocoli, polifenoli), le cui proprietà possono essere sfruttate nella produzione di alimenti con elevata valenza dietetico-nutrizionale.

Dal punto di vista tecnologico, è stata avvalorata l'ipotesi di integrare nelle formulazioni di prodotti tradizionali quali pane, pasta e biscotti, sia il germe che la quinoa con la possibilità di produrre alimenti con caratteristiche nutrizionali ed organolettiche che rispondano ai requisiti di commercializzazione e di qualità richiesti dal mercato e che allo stesso tempo abbiano un valore aggiunto rispetto a quelli già presenti in commercio.

La tecnica di decorticazione/perlatura, testata sugli acheni di quinoa, si è rivelata idonea per l'allontanamento di più del 70% delle saponine presenti sulla superficie della quinoa, con la conseguenza di poter ottenere, dagli acheni perlati, uno sfarinato con caratteristiche chimico-nutrizionali idonee per la produzione di alimenti accettabili anche dal punto di vista sensoriale.

La componente fenolica di estratti di germe di grano ha mostrato una notevole attività inibitoria nei confronti di diversi ceppi microbici avvalorando l'ipotesi di poter integrare il germe di grano nelle formulazioni di pasta fresca al fine di incrementarne non solo la componente bioattiva a valenza funzionale ma anche per allungarne la shelf life attraverso l'inibizione di microrganismi alteranti.

**Abstract**

**Riassunto**

**Introduzione**

**Scopo della ricerca**

**Sezione 1-Germe di grano**

|   |         |
|---|---------|
| Capitolo 1. Germe di grano  | pag. 7  |
| Capitolo 2. I polifenoli  | pag. 27 |
| Capitolo 3. Utilizzo di cereali non convenzionali in pastificazione e panificazione | pag. 42 |
| Capitolo 4. Shelf life dei prodotti alimentari                                      | pag. 62 |
| Capitolo 5. Materiali e metodi  | pag. 70 |
| Capitolo 6. Risultati e discussione   | pag. 84 |

**Sezione 2-Quinoa**

|  |          |
|--|----------|
| Capitolo 1. Quinoa ( <i>Chenopodium quinoa Willd</i> ) | pag. 114 |
| Capitolo 2. Lavorazione della Quinoa                   | pag. 144 |
| Capitolo 3. Applicazioni tecnologiche della quinoa     | pag. 154 |
| Capitolo 4. Materiali e metodi                         | pag. 161 |
| Capitolo 5. Risultati e discussione                    | pag. 171 |

**Conclusioni**

**Bibliografia**

## Introduzione

Le attuali esigenze dell'industria alimentare e del comparto della pasta e dei prodotti da forno in particolare, sono quelle di sviluppare prodotti innovativi ed alternativi, da immettere in un settore ormai saturo in cui l'innovazione di processo e di prodotto, o l'utilizzo di ingredienti alternativi rispetto a quelli comunemente utilizzati, costituisce l'unico modo per diversificare l'offerta e guadagnare nuove fette di mercato.

Numerose ricerche scientifiche hanno evidenziato, nell'ultimo decennio, l'esistenza di uno stretto legame intercorrente tra alimentazione e salute. È derivata la profonda evoluzione del concetto di "cibo", tradizionalmente inteso come l'insieme di sostanze (nutrienti) plastiche ed energetiche che, sottoforma di alimenti, vengono assunte dall'organismo, per il normale e regolare svolgimento delle funzioni vitali. Oggi all'alimento, oltre a soddisfare esclusivamente esigenze nutrizionali e sensoriali, viene attribuita la possibilità di influenzare il benessere psico-fisico dell'organismo e, in particolare, di prevenire il rischio di insorgenza di alcune patologie.

Un ruolo importante, a tal proposito, viene assegnato ad alcuni pseudocereali quali la quinoa e sottoprodotti della lavorazione dei cereali come il germe di frumento. Il germe rappresenta circa il 2-4% dell'intera cariosside di frumento ed è considerato di notevole interesse nell'ambito alimentare e nell'industria farmaceutica. È stato riconosciuto, infatti, che contiene quantità significative di componenti bioattive quali i tocoli, carotenoidi e amminoacidi essenziali le cui proprietà possono essere sfruttate nella produzione di alimenti con elevata valenza dietetico-nutrizionale.

La quinoa è una pianta erbacea annuale, considerata uno pseudocereale poiché la pianta, al pari dei cereali, presenta dei semi amidacei chiamati acheni, ma in realtà appartiene alla stessa famiglia degli spinaci e della barbabietola da zucchero. È coltivata principalmente nelle regioni andine ed è stata accertata la possibilità che tale coltura possa garantire produzioni sia in termini di quantità che di qualità, tali da rispondere alle richieste delle industrie alimentari.

L'interesse per la quinoa scaturisce dalla sua elevata capacità di adattamento a diversi ambienti così da renderla competitiva con i cereali comuni ed al suo elevato valore nutrizionale, superiore ai cereali tradizionali, che conferiscono a questa pianta un grande potenziale per il miglioramento dell'alimentazione sia umana sia animale. Per tali motivi, la FAO ha lanciato nel 2013 l'anno internazionale della quinoa riconoscendo alla quinoa il ruolo importante nell'eliminazione della fame, malnutrizione e povertà nel mondo.

## Scopo della ricerca

Nell'ambito dello studio di innovazione di prodotto, le attività sperimentali condotte sono state rivolte alla ricerca di materie prime o ingredienti alternativi da utilizzare per la produzione di prodotti a base di cereali e pseudocereali con elevati standard nutrizionali, qualitativi e igienici.

Il germe di frumento e la quinoa sono due prodotti non comunemente utilizzati nell'industria alimentare, ma che possiedono notevoli potenzialità se utilizzati come ingredienti alternativi per la produzione di diversi alimenti.

Le attività di ricerca, suddivise in due sezioni, hanno avuto come finalità:

Sezione I Germe di grano:

- valutazione delle caratteristiche chimico-nutrizionali di germe di frumento;
- analisi delle potenzialità tecnologiche del germe attraverso l'ipotesi di formulazioni e realizzazione di prodotti innovativi a base di germe;
- studio dell'influenza della componente bioattiva del germe, i polifenoli, sulla stabilità microbiologica e sulla shelf life di pasta fresca.

Sezione II Quinoa:

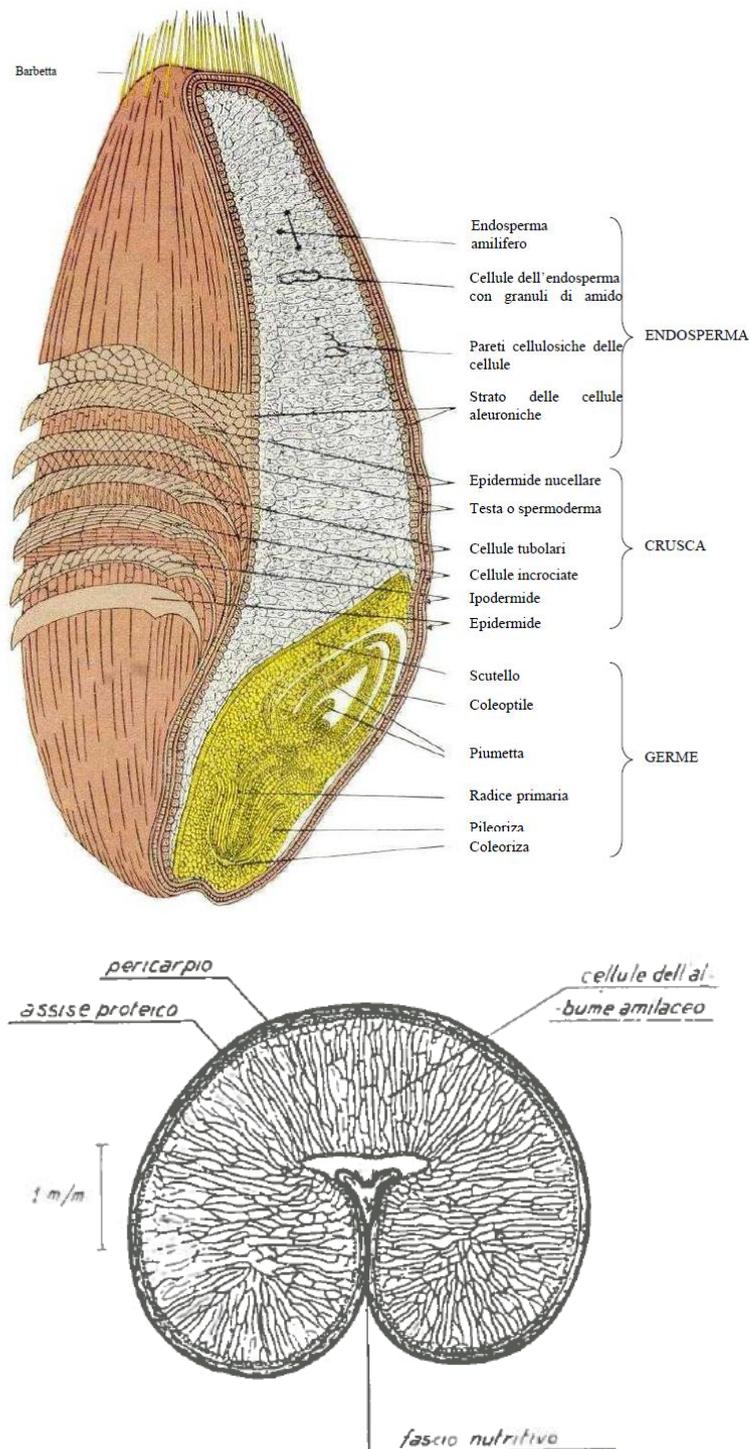
- valutazione delle caratteristiche chimico-nutrizionali della quinoa;
- sviluppo di tecnologie innovative di decorticazione/perlatura per la rimozione di saponine dalla quinoa;
- sviluppo di formulazioni e realizzazione di prodotti ad alta valenza dietetico-nutrizionale a base di quinoa.

Il lavoro sperimentale è stato svolto nell'ambito del Progetto di ricerca dal titolo "Influenza delle materie prime e dei trattamenti termici sulla qualità della pasta e studio di innovazione di prodotto" che vedeva coinvolti il DiAAA dell'Università degli Studi del Molise e il pastificio F. Divella S.p.A di Rutigliano (BA) e nell'ambito del Progetto finanziato dalla Regione Campania, PSR 2007/2013 misura 124, dal titolo "Introduzione della quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*) in Campania per la produzione di alimenti a valenza funzionale ad elevato valore nutrizionale".

*Sezione I*  
*Germe di grano*

## Capitolo 1. Il germe di grano

Nella cariosside si distinguono varie parti ognuna di esse è composta da più strati e possiede una struttura ed una composizione chimica diversa e specifica per meglio rispondere alla propria funzione biologica (Figura 1.1).



**Figura 1.1.** Sezione longitudinale e trasversale della cariosside di frumento (tratta da Cubadda & Quattrucci, 1996)

È possibile evidenziare all'interno della cariosside le seguenti componenti:

- esternamente si trova *il pericarpo*, formato a sua volta da diversi strati di cellule (epicarpo, cellule intermedie, cellule incrociate e cellule tubolari), seguito dallo spermoderma e dal perisperma. Tutti questi strati costituiscono l'involucro esterno del chicco, conosciuto comunemente come crusca, la cui funzione protettiva è garantita dalla composizione particolarmente ricca in fibre cellulosiche ed emicellulosiche, sali minerali e composti antiossidanti.

La cariosside all'interno della spiga è protetta anche da altre strutture, le glume o brattee. In alcuni cereali (quali orzo, riso, avena) questi rivestimenti sono intimamente associati ai tegumenti del frutto: per questa caratteristica tali cariossidi sono definite “*vestite*”, a differenza di quelle degli altri cereali, come il frumento, denominate “*nude*” o “*svestite*”, in quanto si liberano facilmente di tali parti durante le operazioni di trebbiatura. L'eliminazione delle glume nelle cariossidi vestite è indispensabile se il cereale è destinato ad usi alimentari, a causa dell'elevato contenuto in silice (Lucisano & Pagani, 1997).

- internamente è presente *l'endosperma*, che rappresenta la componente maggiormente presente nella cariosside e quella più importante ai fini alimentari.

Comprende lo strato aleuronico, che si trova più esternamente e separa l'endosperma dal pericarpo, rappresentato da cellule monostratificate ricche in proteine di tipo solubile ad alto valore biologico (albumine e globuline), sali minerali, lipidi, vitamine ed enzimi (amilasi e proteasi).

Al centro, troviamo l'endosperma amilifero detto anche mandorla o albume, costituito da cellule in cui sono immagazzinati, in forma insolubile, nutrienti importantissimi, che potranno essere disponibili durante la fase di germinazione del seme (Lucisano & Pagani, 1997), rappresentate principalmente da cellule contenenti granuli di amido (60-70%) e proteine di riserva (8-18%).

La forma e le dimensioni dei granuli di amido sono tipiche di ogni cereale, tanto che, è possibile, mediante l'esame microscopico, riconoscere la provenienza della farina. La grandezza dei granuli aumenta procedendo verso il centro del chicco, mentre diminuisce progressivamente il contenuto proteico. In tutti i cereali infatti si può riscontrare un gradiente di concentrazione di queste due componenti, man mano che si passa dalle cellule esterne della mandorla, più ricche in proteine, verso quelle più centrali, più ricche in amido. L'endosperma contiene inoltre, piccole percentuali di lipidi, sostanze minerali, polisaccaridi non amidacei e composti fenolici.

• *l'embrione o germe*, separato dall'endosperma da un rivestimento esterno detto scutello (nelle cui cellule cilindriche si depositano, durante la maturazione, le sostanze nutritive necessarie al momento della germinazione), rappresenta la parte da cui si forma una nuova pianta quando si verificano le condizioni per la germinazione. La composizione dell'embrione è perciò caratterizzata da un'elevata presenza in proteine, lipidi, zuccheri solubili e vitamine. Purtroppo l'embrione e i tegumenti esterni della cariosside vengono allontanati durante il processo di raffinazione a seconda del tipo di farina che si vuole ottenere, privando la farina di frumento di buona parte del suo prezioso carico di fibre, vitamine e sali minerali.

Quest'operazione si rende necessaria per motivi organolettici ma anche per aumentare i tempi di conservazione, dato che gli acidi grassi contenuti nel germe sono soggetti a rapido irrancidimento.

La composizione chimica della cariosside di grano è influenzata da numerosi fattori: la specie di appartenenza, il terreno e il clima, i trattamenti a cui la pianta è stata sottoposta, lo stato di conservazione (Tabella 1.1).

**Tabella 1.1.** Composizione della cariosside di grano e delle sue regioni anatomiche (dati espressi per 100 g di sostanza secca; Lucisano & Pagani, 1997)

| Regione anatomica della cariosside | % cariosside | Amido e altri carboidrati (%) | Proteine (%) | Lipidi (%) | Cellulosa, emicellulosa, pentosani (%) | Sali minerali (%) |
|------------------------------------|--------------|-------------------------------|--------------|------------|--|-------------------|
| Pericarpo                          | 4            | 14-16                         | 10-14        | 1-3        | 60-74                                  | 3-5               |
| Strato aleuronico                  | 8            | 10-14                         | 29-35        | 7-9        | 35-41                                  | 5-15              |
| Germe                              | 3            | 19-21                         | 36-40        | 13-17      | 20-24                                  | 4-6               |
| Endosperma                         | 82           | 80-85                         | 8-14         | 2-3        | 1-3                                    | 0,15-0,15         |

L'acqua è presente in quantità variabile dall'8 al 16-18% (mediamente il 12%), in relazione alla zona, più o meno umida, in cui il grano è stato coltivato. I glucidi rappresentano mediamente l'82% del peso della cariosside e sono caratterizzati dall'amido (80-85%), pentosani, cellulosa e lignina (2-3%) e zuccheri riducenti (1,5%). Le proteine ammontano mediamente tra 8-14% e si distinguono in base alla loro solubilità in albumine e globuline (proteine ad alto valore biologico) e prolammine (glutenine e gliadine, localizzate nell'endosperma). I lipidi presenti quasi esclusivamente nel germe sono costituiti da gliceridi esterificati ad acidi grassi insaturi per l'80-84% e saturi per il 13%. I sali minerali

rappresentati da fosfato di magnesio e potassio, sali di calcio, ferro, zinco sono situati nella parte esterna della cariosside (Cappelli & Vannucchi, 2005).

Inoltre, i cereali rappresentano una importantissima fonte di vitamine, soprattutto del gruppo B; in particolare niacina e piridossina, tendono a concentrarsi nello strato aleuronico (Panatta, 1997), la tiamina nello scutello, la vitamina E nell'embrione della cariosside. Le operazioni di macinazione con conseguente abburattamento (setacciatura e allontanamento delle frazioni esterne della cariosside) comportano un impoverimento vitaminico negli sfarinati.

Le Linee Guida per una Sana Alimentazione Italiana pubblicati dall'Istituto Nazionale per la Ricerca degli Alimenti e la Nutrizione (INRAN, 2003) stabiliscono che i cereali (fondamentalmente pane e pasta) devono essere assunti in modo da conferire almeno il 45% delle calorie apportate giornalmente. Con riferimento ad altri nutrienti introdotti attraverso l'assunzione di prodotti derivati dal grano duro, sono da segnalare, il discreto contenuto in proteine e soprattutto nei prodotti integrali, di fibra alimentare. Notevole è anche l'apporto in elementi minerali (potassio, ferro e fosforo) ed in vitamine (tiamina e niacina).

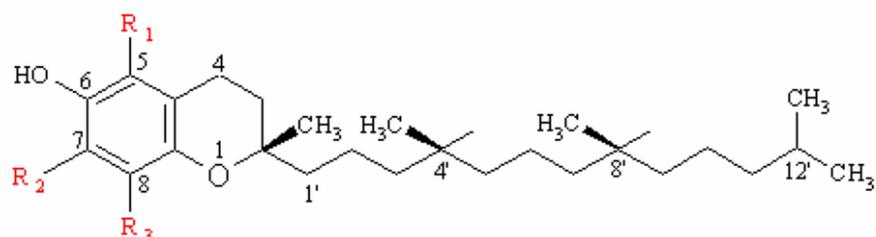
Nonostante molto sia stato indagato sulle relazioni fra struttura e funzione dell'endosperma, minore interesse è stato rivolto alla composizione di germe e crusca, sebbene queste due componenti contribuiscano a circa il 20% del peso della frazione finale dopo la molitura tradizionale. Ciò è dovuto al fatto che queste frazioni costituiscono solo una piccola percentuale del totale valore economico del frumento molito, mentre all'endosperma è attribuito il 90% del valore (Fulcher & Duke, 2002). È ormai risaputo, tuttavia, che le frazioni di pericarpo e germe derivate dalla molitura convenzionale forniscono la maggioranza dei composti biologicamente attivi della granella. L'elevato valore nutrizionale e salutistico è dovuto, oltre che all'elevato contenuto in vitamine del gruppo B (tiamina, niacina, riboflavina ed acido pantotenico), minerali (calcio, magnesio, potassio, fosforo, sodio e ferro) ed amminoacidi essenziali (arginina e lisina), anche agli alti livelli di fibre alimentari e composti antiossidanti.

I tocoli (antiossidanti di natura lipofila) sono presenti in concentrazioni significative nel frumento e da tempo sono considerati efficaci antiossidanti a livello di membrana cellulare e con dimostrata attività ipocolesterolemica ed antitumorale. Con il termine tococromanoli o vitamina E si indica una famiglia di composti strutturalmente simili (vitameri), otto dei quali più noti dal momento che si trovano in natura.

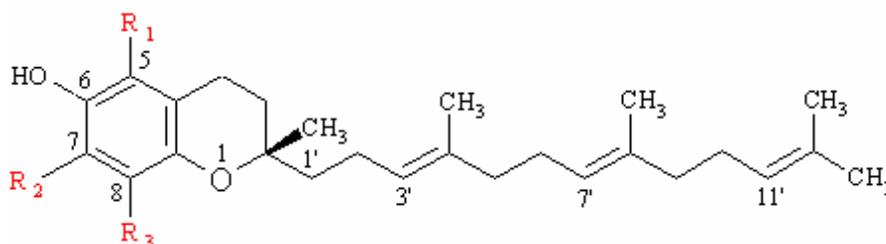
Gli otto isomeri si suddividono in due classi: *tocopheroli* e *tocotrienoli*; entrambi sono costituiti chimicamente da un anello biciclico sostituito, detto cromano, e da una lunga catena

isoprenoide a sedici atomi di carbonio, chiamata fitile, che è satura nei tocoferoli mentre presenta tre doppi legami non coniugati nei tocotrienoli.

A seconda del numero e della posizione dei gruppi metilici (CH<sub>3</sub>) sostituenti sull'anello cromanico si distinguono l' $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocoferolo e i loro corrispondenti tocotrienoli insaturi l' $\alpha$ -  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocotrienolo (Figura 1.2).



| NOME COMUNE          | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub>   | R <sub>3</sub>   | NOME CHIMICO         |
|----------------------|------------------|------------------|------------------|----------------------|
| $\alpha$ -Tocoferolo | -CH <sub>3</sub> | -CH <sub>3</sub> | -CH <sub>3</sub> | 5-7-8-trimetiltocolo |
| $\beta$ -Tocoferolo  | -CH <sub>3</sub> | -H               | -CH <sub>3</sub> | 5-8-dimetiltocolo    |
| $\gamma$ -Tocoferolo | -H               | -CH <sub>3</sub> | -CH <sub>3</sub> | 7-8-dimetiltocolo    |
| $\delta$ -Tocoferolo | -H               | -H               | -CH <sub>3</sub> | 8-monometiltocolo    |



| NOME COMUNE            | -R <sub>1</sub>  | -R <sub>2</sub>  | -R <sub>3</sub>  | NOME CHIMICO               |
|------------------------|------------------|------------------|------------------|----------------------------|
| $\alpha$ -Tocotrienolo | -CH <sub>3</sub> | -CH <sub>3</sub> | -CH <sub>3</sub> | 5-7-8-trimetiltocotrienolo |
| $\beta$ -Tocotrienolo  | -CH <sub>3</sub> | -H               | -CH <sub>3</sub> | 5-8-dimetiltocotrienolo    |
| $\gamma$ -Tocotrienolo | -H               | -CH <sub>3</sub> | -CH <sub>3</sub> | 7-8-dimetiltocotrienolo    |
| $\delta$ -Tocotrienolo | -H               | -H               | -CH <sub>3</sub> | 8-monometiltocotrienolo    |

**Figura 1.2.** Strutture e nomi comuni dei tocoferoli e tocotrienoli

La presenza di un gruppo ossidrilico in posizione 6 e di un metile in posizione 2 è una caratteristica comune a tutti i vitameri che, pertanto, sono dei derivati del 2-metil-6-cromanolo. Il gruppo ossidrilico legato all'anello cromanico è un punto critico per l'attività antiossidante, ma svolgono un ruolo importante anche i gruppi metilici. L' $\alpha$ -tocoferolo, con tre gruppi metilici, è biologicamente più attivo degli altri omologhi (Lampi *et al.*, 2008), dotato di maggiore attività antiossidante, anche se il ruolo degli altri isomeri sta riscuotendo nuovi interessi (Panfili *et al.*, 2008). Infatti, l'attività antiossidante diminuisce nel seguente ordine  $\alpha > \beta > \gamma > \delta$  (Ingold *et al.*, 1990). L'azione antiossidante dei tocoli si esplica attraverso la donazione di un atomo di idrogeno ai radicali perossidici, rallentando, in questo modo, il

processo di ossidazione delle sostanze grasse; tuttavia i tocoli sono efficaci anche come quenchers dell'ossigeno singoletto e dei radicali dell'ossido d'azoto (Lampi *et al.*, 2008).

Alcuni studi indicano che l' $\alpha$ -tocotrienolo è più efficiente come scavenger dei radicali perossidici rispetto al corrispondente tocoferolo (Panfili *et al.*, 2008). Dal punto di vista nutrizionale i tocoferoli hanno un'importanza notevole poiché esplicano nell'organismo diverse funzioni: funzione biologica, effetti ipocolesterolemici ed ipoglicemici e prevenzione di malattie cardiovascolari e del cancro (Lampi *et al.*, 2008; Panfili *et al.*, 2003).

Relativamente all'attività vitaminica E, in passato era definita in termini di Unità Internazionale (UI) ed 1 Unità Internazionale era equivalente ad 1 mg di  $\alpha$ -tocoferolo acetato; attualmente l'attività della vitamina è definita in termini di Tocoferolo Equivalente (TE), dove un TE corrisponde a 1 mg di  $\alpha$ -tocoferolo. Tale attività dipende dalla struttura chimica e fattori fisiologici ( $\alpha$ -T >  $\beta$ -T >  $\alpha$ -T3 >  $\gamma$ -T >  $\beta$ -T3 >  $\delta$ -T) (Panfili *et al.*, 2008). Tra gli altri tocotrienoli, il  $\gamma$ -T3 e il  $\delta$ -T3 presentano attività vitaminica non riconosciuta (Tabella 1.2).

Secondo il Decreto 18 marzo 2009 del Ministero del lavoro, della salute e delle politiche sociali che attua la Direttiva 2008/100/CE relativa all'etichettatura nutrizionale dei prodotti alimentari la razione giornaliera raccomandata (RDA) della Vitamina E è pari a 12mg per 100g di prodotto.

Essendo sostanze lipofile, i tocoli sono intimamente associate con i composti lipidici della matrice alimentare e quindi possono essere presenti in forma esterificata o legati alla matrice, oltre che libera; di conseguenza per la loro determinazione risulta necessario applicare una procedura di idrolisi della matrice, che idrolizzi gli esteri lipidici, seguita da estrazione con un solvente compatibile con il sistema cromatografico (Panfili *et al.*, 2003).

**Tabella 1.2.** Attività vitaminica E di tocoferoli e tocotrienoli espressa in Tocoferolo Equivalente (T.E.) (Eldin & Appelquist, 1996; Sheppard *et al.*, 1993)

| Tococromanoli          | Attività vitaminica |                |
|------------------------|---------------------|----------------|
|                        | TE/mg               | UI/mg          |
| $\alpha$ -tocoferolo   | 1,0                 | 1,5            |
| $\beta$ -tocoferolo    | 0,5                 | 0,75           |
| $\gamma$ -tocoferolo   | 0,1                 | 0,15           |
| $\delta$ -tocoferolo   | 0,03                | 0,045          |
| $\alpha$ -tocotrienolo | 0,3                 | 0,45           |
| $\beta$ -tocotrienolo  | 0,05                | 0,075          |
| $\gamma$ -tocotrienolo | Non conosciuto      | Non conosciuto |
| $\delta$ -tocotrienolo | Non conosciuto      | Non conosciuto |

TE: Tocoferolo Equivalente; UI: Unità Internazionale

I tocoli proteggono l'integrità delle membrane cellulari grazie al mantenimento del normale contenuto di acidi grassi polinsaturi dei fosfolipidi, che sono suscettibili a perossidazione (Buttner, 1993). Infatti grazie alla loro struttura idrofobica, i tocoferoli si collocano all'interno delle membrane biologiche dei tessuti, oppure all'interno delle lipoproteine del plasma, vicino ai lipidi, e perciò in una posizione ideale per poter esercitare la loro azione antiossidante.

I tocotrienoli, inoltre, intervengono nel contenimento del colesterolo ematico agendo direttamente sulla sua sintesi nel fegato. In un lavoro condotto da Qureshi e Qureshi (1993), è stato evidenziato che i tocotrienoli contenuti nell'orzo sono in grado di abbassare il livello di colesterolo totale e del LDL-colesterolo sia in animali da laboratorio che nell'uomo, molto probabilmente perché tali composti vanno ad inibire l'idrossimetilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasi, enzima coinvolto nella biosintesi del colesterolo nel fegato a partire dall'acetil-CoA (Qureshi *et al.*, 1985 e 1991).

Per quanto riguarda il ruolo dei tococromanoli nella prevenzione delle malattie cardiovascolari, è stato visto che essi agiscono prevenendo l'aterosclerosi per mezzo della loro attività antiossidante dovuta essenzialmente ai tocoferoli. Più complessa e ancora non ben identificata è l'azione dei tococromanoli nella prevenzione del cancro. Probabilmente la loro azione è dovuta sia alle proprietà antiossidanti dei tocoferoli che riducono la formazione e la propagazione di radicali liberi (Bramley *et al.*, 2000; Thompson, 1994), fattori sicuramente coinvolti nello sviluppo del cancro, sia all'azione stimolante di questi composti sulle funzioni immunitarie, che provoca una maggiore sorveglianza e un migliore riconoscimento delle cellule tumorali (Liu, 2007; Meydani *et al.*, 1993 e 1997).

I cereali sono considerati fonti moderate di tocoli, pur apportando 50-80 mg di tocoli /Kg su sostanza secca (Panfili *et al.*, 2003). Anche se il contenuto in tocoli nei cereali è minore rispetto a quello degli oli vegetali e sottoprodotti, il consumo di cereali è molto più elevato, fornendo oltre ai tocoli altri composti bioattivi. Insufficienti sono le conoscenze relative alla biodisponibilità di tali composti dal frumento e dai prodotti derivati. Alcuni studi hanno dimostrato che il rilascio dei tocoli dal grano e dalle altre matrici cerealicole è difficoltoso ed inferiore alla biodisponibilità di tali composti nelle forme presenti negli oli vegetali (Lampi *et al.*, 2008).

Generalmente, i tocotrienoli sono gli isomeri maggiormente presenti, rappresentando più del 50% del contenuto totale di vitamina E in cereali come riso, orzo, grano e avena. In questi cereali i tocoferoli e il  $\beta$ -tocotrienolo sono principalmente localizzati nel germe, mentre gli altri tocotrienoli sono localizzati nel pericarpo, nello strato aleuronico e subaleuronico e nell'endosperma (Tiwari & Cummins, 2009).

Realtivamente al frumento duro, sono presenti solo gli isomeri  $\alpha$  e  $\beta$  dei tocoferoli e tocotrienoli; il  $\beta$ -tocotrienolo risulta essere il composto di gran lunga preponderante fra i tocoli (in media circa 30 mg/Kg) (Panfili *et al.*, 2003), pur presentando nell'ambito della stessa cultivar un'ampia variabilità a seconda della provenienza dei campioni. Relativamente alla localizzazione degli isomeri della vitamina E la tabella 1.3 riporta la distribuzione degli isomeri nei diversi strati della cariosside. Essendo i tocoli maggiormente concentrati nel germe e negli strati esterni della cariosside, i processi di molitura determinano un significativo impoverimento di tali composti bioattivi negli sfarinati (Tiwari & Cummins, 2009). Tuttavia un'altra importante causa di diminuzione di questi composti è data dalla loro suscettibilità ai trattamenti tecnologici e ai processi ossidativi che possono verificarsi durante i processi di trasformazione (Hidalgo *et al.*, 2009; Tiwari & Cummins, 2009).

**Tabella 1.3.** Contenuto in tocoli delle frazioni di molitura del frumento (mg/Kg) (Tiwari & Cummins, 2009)

|              | $\alpha$ -TP <sup>a</sup> | $\beta$ -TP <sup>a</sup> | $\gamma$ -TP <sup>a</sup> | $\delta$ -TP <sup>a</sup> | $\alpha$ -TT <sup>b</sup> | $\beta$ -TT <sup>b</sup> | $\delta$ -TT <sup>b</sup> |
|--------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| <b>Bran</b>  | 4,1-6,5                   |                          | 3,7-5,7                   | 0,2-0,4                   |                           |                          |                           |
| <b>Germ</b>  | 177,7-181,6               | 65,6                     | 6,2                       | 0,1                       | 2,6-3,0                   | 15,6                     | 0,1                       |
| <b>Hull</b>  | 20,1                      | 8,0                      | 26,5                      | 0,3                       | 9                         |                          | 0,2                       |
| <b>Flour</b> | 9,6                       | 4,5                      |                           |                           | 3                         | 15,7                     |                           |

<sup>a</sup>: TP=tocopherols; <sup>b</sup>: TT= tocotrienols

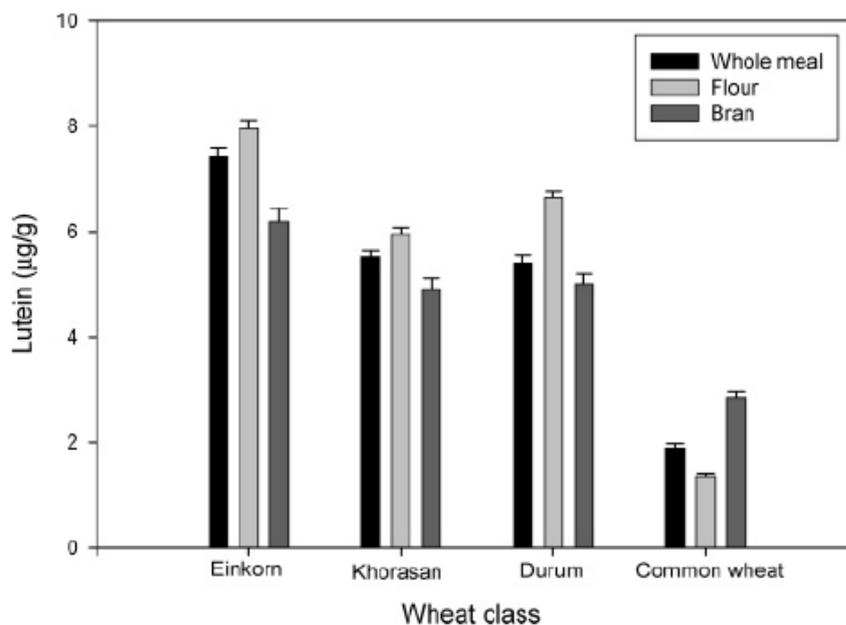
I carotenoidi sono un gruppo eterogeneo di pigmenti di colore giallo-arancio riscontrati nei principali sistemi biologici, che possono essere divisi in due classi generali: i caroteni e le xantofille. Sono composti ad attività pro-vitaminica A e sono rappresentati soprattutto dal  $\beta$ -carotene, dalla luteina e dalla zeaxantina. Essi sono convertiti in vitamina A nel nostro organismo e contribuiscono al colore dei prodotti cerealicoli. Sono pigmenti polienici appartenenti alla famiglia dei tetraterpeni.

Oltre a svolgere un ruolo come precursori della vitamina A, i carotenoidi sono anche antiossidanti (Palozza *et al.*, 1992). Essi infatti sono composti naturali che riducono il danno ossidativo delle membrane biologiche attraverso l'eliminazione dei radicali perossido, responsabili di alcune malattie umane e coinvolti nei processi di invecchiamento (Borrelli *et al.*, 2003).

Diverse matrici cerealicole e i loro sottoprodotti sono stati analizzati per il contenuto in singoli carotenoidi e carotenoidi totali da diversi autori (Panfili *et al.*, 2004). Tra tutti i cereali

il frumento duro è quello che mostra il maggior contenuto in luteina (2,65 mg/Kg s.s.), seguito dal dicocco (1,78 mg/Kg s.s.), dallo spelta (1,46 mg/Kg s.s.) e dal frumento tenero (1,31 mg/Kg s.s.); il suo rapporto con la zeaxantina è di circa 2.

La luteina, a differenza degli altri antiossidanti, è presente uniformemente nei diversi strati all'interno della cariosside (Figura 1.3).



**Figura 1.3.** Distribuzione della luteina nelle frazioni della cariosside di frumento

Valutando diversi genotipi di frumento duro e tenero Adom *et al.*, (2003) hanno osservato variazioni pari a 5,3 e 12 volte nel contenuto in luteina, zeaxantina e  $\beta$ -criptoxantina, rispettivamente. Borrelli *et al.* (2003) hanno osservato una significativa variabilità, sia genetica che ambientale, nel contenuto in  $\beta$ -carotene e luteina, anche se sono state individuate delle cultivar con maggiore stabilità nel contenuto in questi pigmenti nelle diverse zone di coltivazione. Inoltre è stato riscontrato un incremento nel contenuto in carotenoidi con il deficit idrico e la concimazione solfatica.

Come risultato della loro attività antiossidante, i carotenoidi sono soggetti ad ossidazione, fenomeno che viene accelerato da catalizzatori organici ed inorganici e da fattori fisici come radiazioni luminose e temperatura. Pertanto una perdita rilevante di questi composti nei derivati dei cereali può aver luogo durante le operazioni di trasformazione tecnologica, laddove intervengono trattamenti termici e condizioni favorevoli ai processi ossidativi. Al di là dei fattori chimico-fisici, altri fattori come quelli colturali, le caratteristiche del cereale di partenza e i parametri di processo tecnologico possono influire sull'entità della perdita e la quantità residua dei componenti antiossidanti nel prodotto finale.

Gli aminoacidi essenziali sono quegli aminoacidi che non possono essere sintetizzati dall'uomo o possono essere sintetizzati ad un tasso trascurabile, per cui devono essere necessariamente forniti con la dieta. Proteine di qualità sono quelle che contengono tutti gli aminoacidi essenziali in quantità uguali o superiori a quelle della proteina di riferimento indicata dalla FAO e una digeribilità equiparabile a quella delle proteine del latte e delle uova. Le proteine dei cereali sono carenti in lisina e ricchi in metionina, mentre i legumi sono generalmente carenti in metionina, ma contengono quantità adeguate di lisina. Gli aminoacidi essenziali la cui concentrazione nella proteina risulta inferiore a quella della proteina di riferimento prendono il nome di aminoacidi limitanti.

Quando il pattern aminoacidico di una proteina differisce da quello ottimale si ha una ridotta efficienza nell'utilizzazione degli aminoacidi, con depressione dell'accrescimento ed incremento della suscettibilità a malattie.

Il germe di frumento si presenta particolarmente ricco in aminoacidi essenziali, anche in lisina, il cui contenuto è di 5,4-5,5 g/100g di proteine (Tabella 1.4).

**Tabella 1.4.** Composizione aminoacidica del germe (MacMasters *et al.*, 1971)

| AMMINOACIDI  | g/100g di prodotto |
|--------------|--------------------|
| Alanina      | 1,34-1,71          |
| Arginina     | 1,77-2,09          |
| Aspartato    | 1,92-2,25          |
| Cistina      | 0,43-0,61          |
| Glutammato   | 3,65-4,59          |
| Glicina      | 1,32-1,58          |
| Istidina     | 0,59-0,82          |
| Isoleucina   | 0,77-0,94          |
| Leucina      | 1,50-1,75          |
| Lisina       | 1,30-1,77          |
| Metionina    | 0,39-0,58          |
| Fenilalanina | 0,86-1,01          |
| Prolina      | 1,13-1,52          |
| Serina       | 1,05-1,28          |
| Treonina     | 0,89-1,09          |
| Tirosina     | 0,65-0,78          |
| Valina       | 1,01-1,37          |

## ***1.1 Macinazione del frumento e recupero del germe***

La macinazione è ottenuta in più passaggi, attraverso i quali le cariossidi di grano vengono ridotte in frammenti via via più piccoli, fino a trasformarli in farina e crusconi. Il ciclo di lavorazione è del tutto automatico e al personale spetta quasi esclusivamente il compito della regolazione delle macchine.

Dei tre principali costituenti della cariosside, l'endosperma è quello che viene trasformato in sfarinato, mentre le restanti frazioni vanno a costituire i sottoprodotti della macinazione.

Fondamentalmente, il processo di macinazione deve:

- Aprire ogni chicco e toglierne l'endosperma;
- Rimuovere le particelle cruscellose dell'endosperma;
- Macinare l'endosperma per ridurlo in farina;
- Setacciare i prodotti intermedi della macinazione per separare ogni particella di granulometria grossa che richiede ulteriore macinazione, estrarre le particelle di crusca e germe e rimuovere la farina fine ad ogni stadio di stacciatura.

Ultimata la preparazione del grano nelle sezioni di pulitura e condizionamento, il cereale è pronto per la macinazione che si divide essenzialmente in 3 fasi: rottura, raffinazione e rimacina; la prima, con rulli rigati, separa la mandorla farinosa dalla parte corticale della cariosside, senza polverizzare la crusca; la seconda, con rulli lisci o finemente rigati, rimuove le particelle di crusca aderenti ai piccoli frammenti semolosi di endosperma; la terza, con rulli lisci, riduce gradualmente in farina la particella della mandorla farinosa.

In altri termini, si tratta di una macinazione ripetitiva durante la quale la mandorla, essendo friabile, si lascia aprire, frantumare, tritare, schiacciare, mentre le parti corticali, a causa della loro struttura fibrosa, oppongono maggiore resistenza all'azione meccanica dei rulli macinanti e, salvo venire tagliate, restano praticamente integre.

Il grano viene così trasformato in farine, semole, semolini e crusconi, attraverso una serie di passaggi di macinazione parziale, ognuno dei quali non può essere considerato a sé stante perché perfeziona i prodotti del passaggio precedente e condiziona quelli dei passaggi successivi.

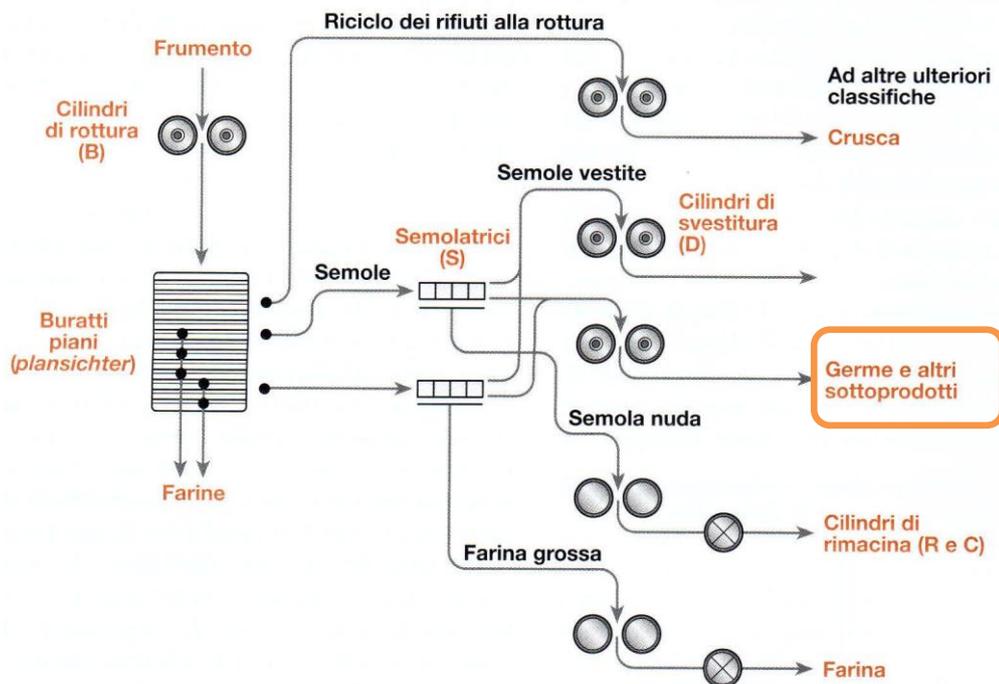
Col suo intreccio di passaggi macinanti intercalati da passaggi di stacciatura e di varie apparecchiature ausiliarie, il processo molitorio è piuttosto complicato anche se strutturato secondo rigorosi criteri matematici (Figura 1.4).

Sinteticamente, si può dire che in un mulino convenzionale la prima fase di macinazione si ottiene passando la partita di grano e i successivi prodotti tra due rulli in ghisa dura, con righe

elicoidali dal profilo appropriato e dall'angolo di inclinazione adeguato al tipo di materia prima, i quali ruotano con velocità periferiche differenti. Giocando sulla velocità differenziale, sulla inclinazione delle righe e sui profili delle stesse, nei punti di incontro si ottengono superfici di taglio diverse, in relazione alla granulometria e al tipo di prodotto da macinare e dei risultati che si vogliono ottenere.

La macinazione sui rulli rigati serve per assicurare che:

- le particelle dell'endosperma non risultino eccessivamente fini, perché una riduzione eccessiva impedirebbe la successiva purificazione e l'ottimale riduzione finale;
- le particelle di crusca non si riducano in frammenti di dimensioni molto ridotte, provocando così un incremento del contenuto in ceneri della farina;
- il germe di grano sia tenuto il più possibile intatto per permetterne la separazione.



**Figura 1.4.** Diagramma di molitura del frumento

La successiva separazione e purificazione del germe è raggiunta sfruttando due caratteristiche tipiche del germe che lo distinguono dal resto della cariosside, la prima è la sua plasticità dovuta senza dubbio al suo alto contenuto in olio, a causa della quale il germe tende a frammentarsi in particelle più grossolane rispetto a quelle della crusca o dell'endosperma. La seconda caratteristica distintiva del germe è rappresentata dalla sua elevata densità, più elevata rispetto alle altre componenti della cariosside, per questo motivo può essere anche isolato e recuperato sulla base del differente peso specifico.

La separazione inizia nel sistema di purificazione dopo le prime due rotture, insieme alle particelle di crusca provenienti dai setacci di rottura. Quando le materie prime passano attraverso il setaccio, i residui comprendono particelle di germe di grano altamente contaminate con particelle di crusca e piccole quantità di endosperma.

Date le maggiori dimensioni del germe, esso è prontamente separato dagli altri due costituenti di simili dimensioni su una tavola densitometrica, nota anche come separatore di germe. Il germe stoccato viene fatto cadere su un piano oscillatorio poroso e sottoposto ad un flusso d'aria dal basso verso l'alto, che consente di separare le particelle per differenza di peso specifico.

Le particelle di germe purificato, quindi, vengono sottoposte ad un passaggio su rulli lisci di riduzione dove sono ridotte in scaglie grossolane e piatte che caratterizzano il germe di alta qualità. Il prodotto ottenuto subisce quindi una setacciatura finale con setacci grossolani per rimuovere le frazioni più fini destinate ai mangimifici.

In generale, il germe, come alimento di qualità, viene recuperato dal terzo o quarto passaggio di rottura; quello ricavato da passaggi successivi è solitamente destinato ad un uso industriale.

In alcuni molini, per massimizzare la resa in germe di grano, il processo di recupero inizia effettivamente ancora prima della prima rottura. Il flusso del frumento entrante viene fatto passare attraverso una macchina ad urto, che rilascia quasi tutto il germe insieme ad una piccola quantità di fini, mentre la cariosside viene frantumata. La setacciatura separa i fini dal frumento spezzato, che viene mandato ai primi due rulli di rottura. Le particelle di endosperma amilaceo, il germe e la crusca passeranno ad un separatore dove il germe purificato emergerà dal lato superiore del piano inclinato. Seguono la rottura e la setacciatura.

Il germe recuperato nel passaggio di pre-rottura è, generalmente, caratterizzato da scaglie più grandi, da un contenuto di crusca più basso e da un colore più dorato rispetto a quello recuperato da un molino convenzionale.

## ***1.2 Caratteristiche chimiche del germe di frumento***

L'asse embrionico e lo scutello, che assieme vanno a rappresentare la frazione del germe, presentano una differente composizione chimica. Lo scutello infatti mostra elevate quantità di ceneri, manganese, fitati fosforici, tiamina ed è carente in proteine. La somma dei lipidi riportati per il germe totale è più bassa rispetto ai valori combinati dell'asse embrionico e dello scutello ed è più vicina a quella dell'asse embrionico. Studi di fluorescenza indicano una concentrazione relativamente alta sia di riboflavina che di tiamina.

### 1.2.1 Proteine del germe

Il fattore di conversione 6,25 comunemente utilizzato per convertire l'azoto totale in contenuto proteico, è considerato essere troppo elevato e per questo è raccomandato un fattore di conversione delle proteine del germe più basso pari a 5,7. Questo in seguito al contenuto di amminoacidi presenti nel germe e alla notevole quantità di azoto non proteico presente.

Il contenuto proteico del germe macinato con il 14% di umidità varia tra il 17,7-35%, l'ampio range riflette probabilmente la quantità di contaminati presenti, valori compresi tra 21,4-25,6% sono probabilmente i più rappresentativi per la gran parte dei campioni di germe analizzati. Le proteine maggiormente presenti all'interno del germe sono l'albumina (30,2% delle proteine totali), la globulina (18,9%), la gliadina (14%), glutenina (0,3-0,7%) mentre le proteine insolubili rappresentano circa il 30,2%.

Il contenuto di amminoacidi presenti nel germe e la percentuale rispetto al contenuto totale di proteine è riportata in tabella 1.5. Si è registrata una buona corrispondenza tra i dati ottenuti mediante differenti metodi di determinazione. Il contenuto di azoto non proteico è di circa 11,3-15,3% e comprende le seguenti sostanze: asparagina, allantoina, betaina, colina, lecitina e glutatione. Le poliammine spermidina, cadaverina e putrescina sono state inoltre rilevate nel germe. Il contenuto di acidi nucleici rilevato nel germe macinato è stato attorno al 3,5-4,2%.

**Tabella 1.5.** Contenuto proteico e amminoacidico presente nel germe di grano

| Amino Acid    | In Germ, 14% Moisture |                  |                  |                  | In Protein       |                  |
|---------------|-----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|               | (1) <sup>b</sup>      | (2) <sup>c</sup> | (3) <sup>c</sup> | (4) <sup>c</sup> | (5) <sup>c</sup> | (6) <sup>d</sup> |
| Alanine       | 1.34-1.71             | 1.3              |                  |                  |                  |                  |
| Arginine      | 1.77-2.09             | 1.71             | 2.25             |                  | 6.2              | 6.0              |
| Aspartic acid | 1.92-2.25             | 1.86             |                  |                  |                  |                  |
| Cystine       | 0.43-0.61             | 0.26             | 0.5              |                  | 1.37             | 0.8              |
| Glutamic acid | 3.65-4.59             | 3.48             |                  |                  |                  |                  |
| Glycine       | 1.32-1.58             | 1.3              |                  |                  |                  |                  |
| Histidine     | 0.59-0.82             | 0.56             | 0.7              | 0.72             | 3.03             | 2.5              |
| Isoleucine    | 0.77-0.94             | 0.84             | 1.91             | 1.27             | 5.23             |                  |
| Leucine       | 1.5-1.75              | 1.43             | 2.66             | 2.1              | 7.33             | 6.7              |
| Lysine        | 1.3-1.77              | 1.31             | 1.99             | 2.17             | 5.44             | 5.5              |
| Methionine    | 0.39-0.58             | 0.47             | 0.46             | 0.44             | 1.28             |                  |
| Phenylalanine | 0.86-1.01             | 0.84             | 0.9              |                  | 2.47             | 4.2              |
| Proline       | 1.13-1.52             | 1.25             |                  |                  |                  |                  |
| Serine        | 1.05-1.28             | 1.11             |                  |                  |                  |                  |
| Threonine     | 0.89-1.09             | 0.85             | 2.29             | 1.4              | 6.28             | 3.8              |
| Tryptophan    |                       | 2.44             | 0.31             |                  | 0.9              | 1.0              |
| Tyrosine      | 0.65-0.78             | 0.71             |                  |                  |                  | 3.8              |
| Valine        | 1.01-1.37             | 1.23             | 1.52             | 1.68             | 4.2              |                  |

\* Source: MacMasters et al (1971). Data from (1) Waggle et al (1967), (2) Andrews and Felt (1941), (3) and (5) Barton-Wright and Moran (1946), (4) Horn et al (1946-1949), and (6) Block and Mitchell (1946).

<sup>b</sup> Chromatographic determination, range of nine wheats.

<sup>c</sup> Microbiological determination.

<sup>d</sup> Chemical determination.

### 1.2.2 Lipidi del germe

I lipidi presenti nel germe di frumento sono riportati in tabella 1.6. Il metodo di estrazione utilizzato influenza particolarmente il contenuto di lipidi riscontrabile. La frazione non saponificabile del germe contiene in particolare steroli, tocoferoli e pigmenti; gli steroli sono costituiti principalmente da una miscela di idrositosteroli e quattro isomeri sitosterolici quali  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -sitosterolo. Il contenuto totale di steroli rappresenta circa il 70% della frazione non saponificabile presente nel germe (MacMasters *et al.*, 1971).

Il contenuto di  $\alpha$ - e  $\beta$ -tocoferoli si aggira rispettivamente attorno al 204-619 mg/kg di s.s. e 117-139 mg/kg di s.s. I tocotrienoli invece non sono stati riscontrati nel germe, ma si trovano principalmente nei tegumenti esterni e nell'endosperma. La composizione acidica del germe di grano è rappresentata principalmente da acido palmitico (18-19%), acido oleico (8-17%), acido linoleico (57-62%), acido linolenico (7-11%).

L'olio derivante dal germe di frumento presenta un indice di rifrazione tra 1,47-1,48, una gravità specifica pari a 0,9-0,93, un indice di iodio pari a 184-185, un contenuto di acidi grassi liberi superiore al 6%.

I trigliceridi rappresentano la classe di lipidi maggiormente presente nel germe di frumento. I due principali trigliceridi riscontrabili sono la 1-palmito-2,3-dilinoleina (29,3%) e la trilinoleina (16,2%). I fosfolipidi costituiscono circa il 15% dei lipidi del germe e la quantità di glicolipidi è trascurabile.

**Tabella 1.6.** Contenuto lipidico presente nel germe di grano

| Lipid           | Value <sup>b</sup><br>(%) |
|-----------------|---------------------------|
| Ether extract   | 5.05–18.8 (9.45)          |
| Alcohol extract | 7.7–14.14 (10.75)         |
| Acid hydrolysis | 8.27                      |
| Phospholipid    | 0.65–4.17 (1.55)          |
| Unsaponifiable  | 0.32–0.81 (0.49)          |

<sup>a</sup> Adapted from MacMasters et al (1971).

<sup>b</sup> Average values in parentheses.

### 1.2.3 Vitamine e sali minerali del germe

La tabella 1.7 mostra le quantità ed il tipo di vitamine che è possibile riscontrare all'interno del germe di frumento. I valori di vitamina E (tocoferoli totali) registrati nel germe macinato sono di 256-500 ppm; l' $\alpha$ -tocoferolo rappresenta il 49-59% delle vitamine totali mentre il  $\beta$ -tocoferolo il 28-29% e l' $\epsilon$ -tocoferolo l'1,5-9%. L'attività biologica degli isomeri, espressa in

termini di  $\alpha$ -tocoferoli, è pari a 100 per l'isomero  $\alpha$ -, 30 per l'isomero  $\beta$ - e 7,5 per l'isomero  $\epsilon$ - (MacMasters *et al.*, 1971). In tabella 1.8 inoltre sono riportati i principali minerali riscontrati nel germe di grano.

**Tabella 1.7.** Contenuto vitaminico del germe di frumento

| Vitamin                     | Content       |
|-----------------------------|---------------|
| Folic acid                  | 1.43-2.96 ppm |
| <i>p</i> -Aminobenzoic acid | 3.7 ppm       |
| Biotin                      | 0.174 ppm     |
| Inositol                    | 0.808%        |

\*Adapted from MacMasters et al (1971).

**Tabella 1.8.** Contenuto in minerali presente nel germe di grano

| Element    | %  | ppm                  |
|------------|--|----------------------|
| Potassium  | 0.47-1.3                                     |                      |
| Magnesium  | 0.14-0.36                                    |                      |
| Calcium    | 0.037-0.071                                  |                      |
| Phosphorus | 0.8-1.24 (av. 1.03<br>with 42-52% phytate P) |                      |
| Sodium     |  | 23.2; 130-370; 3,440 |
| Manganese  |  | 1-232 (av. 93)       |
| Zinc       |  | 100-140              |
| Molybdenum |  | 0.67                 |
| Selenium   |  | 0.01-0.77            |
| Aluminum   |  | 5-7.4; 2,150         |
| Nickel     |  | 40                   |
| Lead       |  | 1.1-1.8              |
| Silver     |  | 0.5-1.3              |
| Iron       |  | 39-240 (av. 94)      |
| Copper     |  | 7.2-11.8; 775-3,960  |
| Cobalt     |  | 0.09-0.017           |
| Strontium  |  | 0.5-3.6              |
| Boron      |  | 3.0-6.4              |
| Barium     |  | 3.4-9.8              |
| Tin        |  | 0.3-0.5              |
| Silicon    |  | 90                   |

\*Adapted from MacMasters et al (1971).

#### 1.2.4 Carboidrati del germe

I carboidrati costituiscono circa il 17-18% dell'intera frazione di germe, di questi l'amido ne rappresenta il 20% e deriva principalmente da contaminazioni dell'endosperma mentre una grande quantità di cellulosa ed emicellulosa (costituita per il 52% da xilani e il 41% da arabani) risulta proveniente dai tegumenti esterni.

#### 1.2.5 Enzimi del germe

Come si può facilmente intuire, il germe presenta innumerevoli enzimi, riportati in tabella 1.9. L'attività catalasica aumenta nel corso della crescita della cariosside di frumento e diminuisce durante la successiva maturazione (Kruger, 1981). Il picco massimo di attività catalasica si

registra nell'ultima fase di crescita del chicco di frumento e la maggiore presenza di questo enzima si registra nell'endosperma ma si trovano buoni livelli di catalasi anche nel germe. Metossi-idrochinone glicosidasi è presente in tutte le parti della cariosside, ma il 60-70% si ritrova nel germe, in particolare nello scutello.

**Tabella 1.9.** Enzimi presenti nel germe di grano

|   |  |
|---|--|
| Acetyl coenzyme A carboxylase                       | Peroxidase   |
| Adenosine triphosphatase                            | Peroxidase isoenzymes                                |
| Aldolase  | Phosphatase  |
| Amylase   | Phosphogluconatase                                   |
| Apyrase   | 2-Phospho-glycerol phosphatase                       |
| Ascorbic acid oxidase                               | Phytase  |
| Carboxylase   | Proteinase(s)  |
| Catalase  | Ribonuclease   |
| Cystine reductase                                   | Synthetase, glucosides                               |
| Dehydrases  | Synthetase, gentobioside                             |
| Dehydrogenase                                       | Synthetase, adenyl succinate                         |
| Dehydrogenase dihydroorotic NAD <sup>b</sup>        | Synthetase, oxalyl coenzyme A                        |
| Deoxyribonuclease                                   | Transaminase, glutamic-pyruvic                       |
| Esterase  | Transaminase, glutamic-oxalacetic                    |
| Glutamic acid decarboxylase                         | Transcarboxylase, acyl coenzyme A-malonyl coenzyme A |
| Glycerophosphatase                                  | Transgalactosidase                                   |
| Hexokinase  | TPNH <sup>c</sup> oxidase                            |
| Hexose phosphate isomerase                          | TPNH diaphorase                                      |
| Invertase   | Uridine diphosphate glucuronate carboxylase          |
| Lipase  | Uridine diphosphate D-glucuronic acid decarboxylase  |
| Lipoxygenase  | Uroporphyrinogen III cosynthetase                    |
| Methyl transferase S-adenosyl-methionine-methionine | D-Xylulokinase                                       |
| Orotidine-5-phosphate pyrophosphorylase             |  |
| Peptidases (acidic)                                 |  |

<sup>a</sup> Adapted from MacMasters et al (1971).

<sup>b</sup> NAD = nicotinamide adenine dinucleotide.

<sup>c</sup> TPNH = triphosphopyridine nucleotide, reduced form.

### ***1.3 Importanza del germe di grano dal punto di vista biologico e benefici sulla salute***

Le caratteristiche nutrizionali e i principi attivi presenti nel germe di grano lo rendono un ottimo alleato per la salute, in grado di offrire numerose sostanze benefiche per il nostro organismo. I suoi impieghi, di conseguenza, sono ampiamente sfruttati nell'ambito alimentare ma anche nell'estetica, dalla cura della pelle alle lozioni per capelli e in numerosi altri campi. Nel germe di grano sono contenute notevoli quantità di vitamine e sali minerali, oltre ad avere una composizione fenolica di elevato interesse tecnologico. Esso infatti rappresenta uno degli alimenti in assoluto più ricchi di vitamina E, un potente antiossidante naturale, che protegge l'organismo dalle aggressioni dei radicali liberi contrastandone lo sviluppo.

La vitamina E, scoperta nel 1922 proprio nel germe di grano e riconosciuta essenziale per l'uomo soltanto nel 1959, si comporta come un potente antiossidante impedendo l'ossidazione di sostanze fortemente insature; per questo esercita un'azione di risparmio nei confronti della vitamina A, degli acidi grassi poliinsaturi e della vitamina C. La vitamina E interviene anche nel metabolismo degli acidi nucleici e in diversi sistemi enzimatici basati su reazioni di ossidoriduzione (chinone-idrochinone, citocromi, etc).

La vitamina E è caratterizzata da una forte attività antiossidante e, soprattutto, mantiene efficienti le reazioni di ossidoriduzione che inattivano i radicali liberi, proteggendo le membrane biologiche dalla loro azione che andrebbe ad agire determinando i processi di invecchiamento (Traber & Sies, 1996). I radicali liberi ("reactive oxygen species" o ROS) sono composti chimici altamente reattivi, che possono danneggiare o inattivare molecole di importanza biologica e compromettere la funzionalità di diversi organi o tessuti. I ROS sono coinvolti nella fisiopatologia di molte patologie nell'uomo.

In condizioni normali, i ROS formati nel corso di reazioni biochimiche o in risposta a stimoli esterni, sono inattivati da specifici enzimi e sistemi antiossidanti, specificamente deputati al controllo dello stato ossidativo dell'organismo. Dati sperimentali e clinici suggeriscono che uno stress ossidativo, conseguenza di uno sbilanciamento fra produzione di ROS e sistemi antiossidanti, può rappresentare la base fisiopatogenetica di molte malattie acute e croniche ed è quindi fondamentale cercare di ridurre la produzione di ROS attraverso l'assunzione di sostanze capaci di impedirne l'accumulo (Van Acker *et al.*, 1993).

Inoltre l'effetto antiossidante della vitamina E porta ad un aumento dell'elasticità della pelle, rendendo l'olio estratto dal germe ideale per prevenire le smagliature in gravidanza. Sembra che, inoltre, la vitamina E, possa interagire con il colesterolo ematico, cooperando in associazione agli acidi grassi polinsaturi  $\Omega 3$  e  $\Omega 6$  presenti, alla riduzione del rischio di aterosclerosi.

Sono contenute inoltre vitamine del gruppo B (B1, B3, B5 e B6), lecitina, provitamina A e D. Il germe di frumento contiene inoltre i seguenti oligoelementi: calcio, potassio, silicio, fosforo, zolfo, zinco, rame, ferro, magnesio, manganese, selenio e molibdeno.

È proprio questa ricchezza in oligoelementi, coniugata con le vitamine e l'octacosanolo a rendere efficace e completo questo sottoprodotto di macinazione del frumento. In particolare è da sottolineare l'attività riequilibrante del metabolismo lipidico che contribuisce a ridurre significativamente i valori di colesterolo nel sangue. Inoltre, contiene tante proteine vegetali e grassi insaturi ed è proprio questa combinazione di nutrienti che lo rende un alimento ad

elevato valore nutrizionale ([http://www.ilsentiero.net/2010/05/germe-di-grano-benefici-e-proprieta\\_5005.html](http://www.ilsentiero.net/2010/05/germe-di-grano-benefici-e-proprieta_5005.html)).

Un'altra particolarità del germe di grano è la presenza di una sostanza chiamata octacosanolo, un alcool lipidico a lunga catena che, secondo le ricerche del fisiologo americano Thomas Cureton, migliorerebbe la prestazione atletica e la funzionalità dell'ipofisi, ottimizzando l'efficienza fisica e mentale (l'ipofisi è una ghiandola che, producendo diversi ormoni, regola la funzionalità di numerosi organi e apparati, come quello riproduttivo, osteomuscolare, endocrino e nervoso). Esso infatti migliora la resistenza fisica e favorisce lo smaltimento delle tossine prodotte dall'acido lattico (Kabir & Kimura, 1993).

Il suo meccanismo di azione nell'organismo non è ancora noto perfettamente, ma ricerche di farmacocinetica hanno dimostrato che l'octacosanolo, somministrato per via orale, si localizza selettivamente nel tessuto adiposo bruno, dove potrebbe in qualche modo stimolare la lipidosintesi e liberare acidi grassi per il tessuto muscolare<sup>370</sup>. È da notare però che, se lo studio viene ripetuto nell'animale allenato, il tessuto di accumulo preferenziale dell'octacosanolo è la muscolatura scheletrica e non più il tessuto adiposo: questo potrebbe indicare che l'octacosanolo agisce solo in presenza di una muscolatura ben allenata ed in soggetti che praticano già attività sportiva, ma non nei soggetti sedentari, e che l'effetto è dovuto ad una aumentata mobilitazione di acidi grassi all'interno della muscolatura scheletrica. Inoltre, attraverso una serie di effetti combinati su enzimi che regolano il metabolismo lipidico, l'octacosanolo riduce la trigliceridemia, aumenta la concentrazione e quindi la disponibilità periferica di acidi grassi liberi e, stimolando la lipoproteinlipasi periferica, aumenta l'ingresso di lipidi nella muscolatura scheletrica.

Proprio per questo, il germe di grano può essere un ottimo integratore anche per sportivi ed atleti professionisti che può essere assunto in qualunque formulazione.

L'octacosanolo ha anche importanti effetti sulla fertilità e sulla potenza sessuale dell'uomo in cui sembra aumentare la sintesi di testosterone producendo una più accentuata virilità, sia della donna in cui può avere un effetto antiabortivo e più in generale, sul vigore di molte funzioni vitali: ad esempio può rilasciare i muscoli contratti dalla tensione nervosa, diminuisce l'irritabilità, normalizza la pressione, aumentare l'efficienza degli organi di senso, l'acutezza visiva e la prontezza di riflessi; la forza e la resistenza alla fatica, può "rischiare" la mente offuscata dal superlavoro (Kabir & Kimura, 1993).

Altri benefici che possono derivare dall'assunzione o dall'utilizzo del germe di grano riguardano la sua efficacia nel ridurre gli effetti dell'acne persistente, anche in età adulta. In particolare, esercita le sue azioni sia in utilizzo topico che tramite ingestione, regolando la

produzione di sebo e scorie dall'interno. Inoltre l'olio di germe di grano è da sempre utilizzato per il trattamento dei piccoli problemi della pelle, dalla contenzione di cicatrici e smagliature, alla riduzione dei solchi delle rughe, al trattamento di blandi arrossamenti. Lenisce l'epidermide per le irritazioni più comuni, come i disturbi da abbronzatura o il bruciore post depilazione. Ha anche un'azione normalizzante del capello, sia in caso di cute grassa che, al contrario, di pelle secca. Può inoltre aiutare nel trattamento della forfora e ridona vitalità al capello dalle radici alla punta.

Inoltre la presenza di acidi grassi essenziali, rappresentati per il 55-62% da acido linoleico (omega 3), conferisce proprietà ipocolesterolemizzante, efficace nel controllo di colesterolo e trigliceridi nel sangue.

Pressando il germe di grano si ottiene un olio che rappresenta la migliore fonte alimentare di vitamina E (133 mg/100 g contro i 18.5 mg/100g dell'olio di oliva). L'olio di germe di grano è inoltre ricchissimo di acidi grassi essenziali, anch'essi alleati preziosi della salute, purché l'alimento venga consumato crudo (sconsigliato il suo impiego per fritti e soffritti). Se assunto sottoforma di integratore, l'olio di germe di grano va preso al termine del pasto (i grassi presenti negli alimenti favoriscono l'assorbimento della vitamina E), seguendo le indicazioni del produttore.

Consumato regolarmente, sostituendo una parte dei cibi raffinati con cereali integrali o ricorrendo ad integratori specifici, il germe di grano permette di colmare le numerose carenze della dieta occidentale, ipercalorica da un lato ma povera dei principi nutritivi essenziali per il nostro benessere dall'altro.

## Capitolo 2. I polifenoli

I polifenoli rappresentano un gruppo di oltre 8000 molecole naturali, seminaturali o sintetiche largamente presenti nel regno vegetale. Sono i più abbondanti antiossidanti presenti nella nostra dieta, considerando l'assunzione media giornaliera di circa 1 grammo, quantità 10 volte maggiore di quella della vitamina C, 100 volte della vitamina E e 500 volte dei carotenoidi (Georgé *et al.*, 2005); sono infatti i principali antiossidanti presenti in natura.

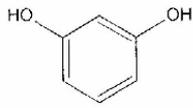
Numerosi studi epidemiologici, infatti, hanno dimostrato che i polifenoli esercitano un ruolo nella prevenzione di numerose patologie cronico-degenerative, in particolare il cancro, malattie neurodegenerative, diabete di tipo 2 e patologie cardiovascolari. Sono infatti dei forti antiossidanti che vanno a completare le funzioni di vitamine ed enzimi, dando un'efficace difesa contro lo stress ossidativo causato dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Da un punto di vista chimico, i composti fenolici sono caratterizzati da almeno un anello aromatico con uno o più gruppi -OH, che derivano dalla L-fenilalanina e tirosina (Petti & Scully, 2009; Naczki & Shahidi, 2006). La diversità e l'ampia distribuzione dei polifenoli in natura hanno portato a modi diversi di classificazione di questi composti, essi infatti possono essere classificati in base all'origine, alle funzioni biologiche e alla struttura chimica.

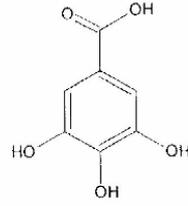
Una classificazione generale delle principali classi di composti fenolici prende in considerazione lo scheletro carbonioso che costituisce l'asse fondamentale per la loro differenziazione (Tabella 2.1 e Figura 2.1)

**Tabella 2.1.** Classi dei composti fenolici presenti nelle piante e scheletro carbonioso (Harborne, 1989)

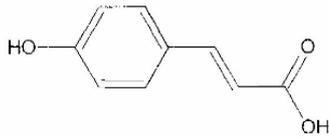
| Classi fenoliche   | Struttura  |
|--|--|
| Fenoli semplici, benzochinoni  | C <sub>6</sub>   |
| Acidi idrossibenzoici  | C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>                                 |
| Acidi fenilacetici   | C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>                                 |
| Acidi idrossicinnamici, fenilpropanoidi<br>(cumarine, isocumarine, cromoni, cromeni) | C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>                                 |
| Naftochinoni   | C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>                                 |
| Xantoni  | C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>                 |
| Stilbeni, antrachinoni   | C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>                 |
| Flavonoidi, isoflavonoidi  | C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>                 |
| Lignani, neolignani  | (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>6</sub>                 |
| Biflavonoidi   | (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> |
| Lignine  | (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>                 |
| Tannini condensati   | (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub> |



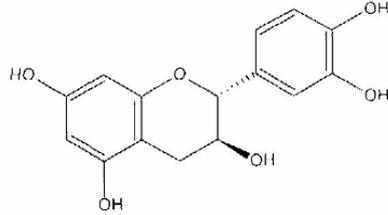
Simple phenols (e.g., resorcinol)



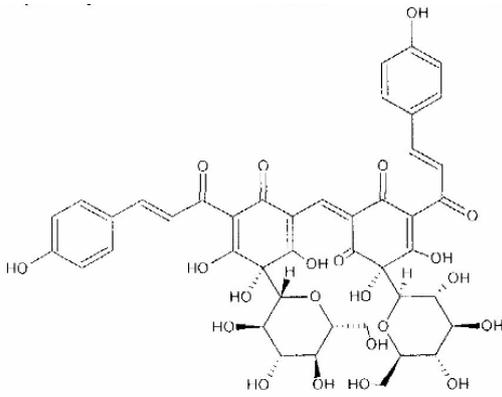
Hydroxybenzoic acids (e.g., gallic acid)



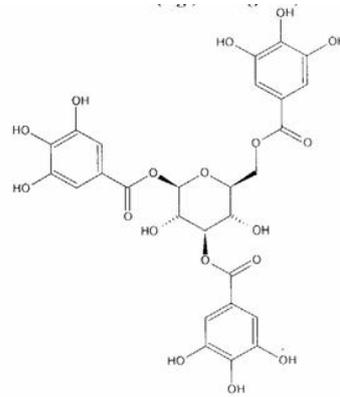
Hydroxycinnamic acids (e.g., p-Coumaric acid)



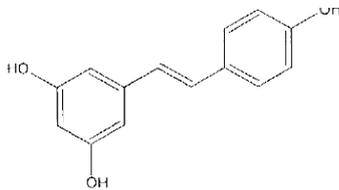
Flavanols (flavan-3-ols) (e.g., (+)-catechin)



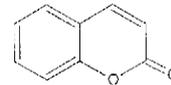
Chalcones (e.g., carthamine)



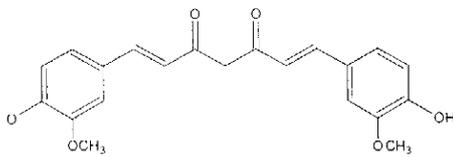
Tannins (e.g., Corilagin: monomeric ellagitannin)



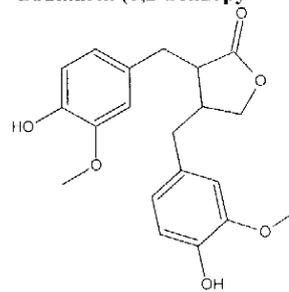
Stilbenes (e.g., resveratrol)



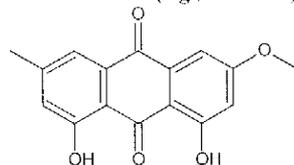
Coumarin (1,2-benzopyrone)



Curcuminoids (e.g., curcumin)



Lignans (e.g., matairesinol)



Hydroxyanthraquinones (e.g., Physcion)

Figura 2.1. Struttura chimica di base di fenoli

Sulla base del peso molecolare dei composti menzionati, le sostanze fenoliche si possono distinguere in composti a basso, intermedio ed alto peso molecolare (Tabella 2.2).

**Tabella 2.2.** Classificazione dei composti fenolici in base al peso molecolare

| Peso molecolare   | Struttura  | Classe fenolica        |
|-------------------|--|------------------------|
| <b>Basso</b>      | C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>                                 | Acidi idrossicinnamici |
|                   | C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>                                 | Acidi idrossibenzoici  |
| <b>Intermedio</b> | C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>                 | Flavonoidi             |
| <b>Alto</b>       | (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>                 | Tannini idrolizzabili  |
|                   | (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub> | Tannini condensati     |

**Fenoli semplici a basso peso molecolare.** Sono caratterizzati dalla presenza di un solo anello benzenico e pertanto, rappresentano le strutture più semplici dei polifenoli. Si trovano principalmente negli oli essenziali ricavati dalle piante.

**Acidi idrossibenzoici.** Sono così chiamati per la struttura di base derivata dall'acido idrossibenzoico. L'acido gallico e l'acido vanillico sono i composti idrossibenzoici maggiormente presenti e studiati per la loro distribuzione nel mondo vegetale. L'acido gallico, inoltre, è insieme all'acido ellagico il monomero base dei tannini idrolizzabili.

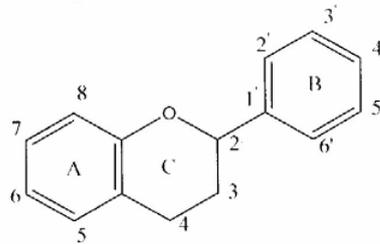
**Acidi idrossicinnamici.** Sono fenilpropanoidi derivanti dall'acido *p*-cumarico (o pidrossicinnamico). Sono comuni in natura quattro varianti della loro formula di base C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>: acido caffeico, cumarico, ferulico e sinapico. Si trovano nel regno vegetale legati chimicamente ad altri composti, dove svolgono azione antibiotica e varie funzioni connesse all'inibizione della crescita e della germinazione.

A livello generale è possibile classificare i polifenoli in due grosse categorie: flavonoidi e non flavonoidi.

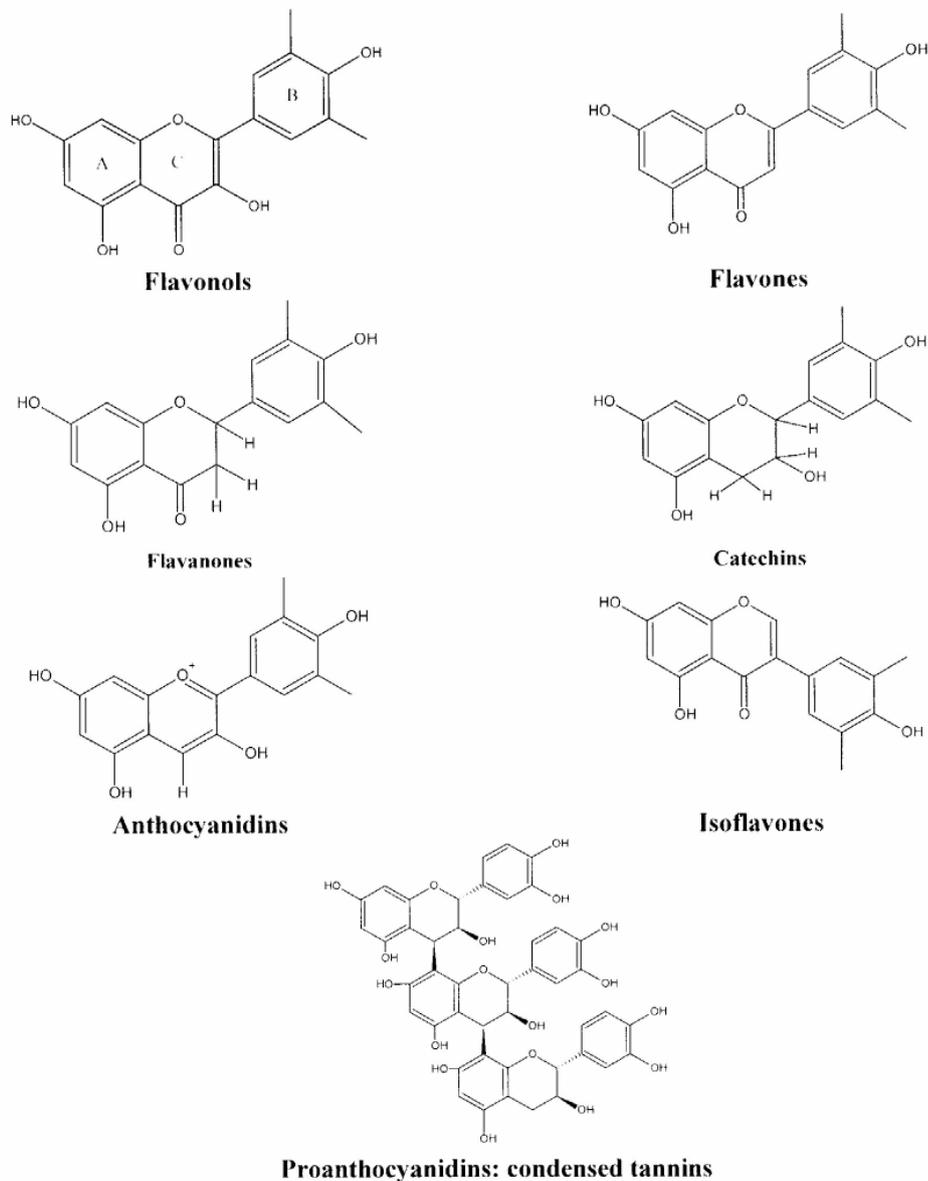
Fra i non flavonoidi vi sono l'acido gallico, gli idrossicinnammati quali l'acido *p*-cumarico, l'acido caffeico e l'acido caftarico e gli stilbeni quali il *trans*- e il *cis*-resveratrolo.

I flavonoidi sono un gruppo di composti polifenolici ubiquitari, presenti in frutta e vegetali, che costituiscono una categoria di sostanze polifunzionali ad elevata bioattività, che comprende più di 5000 composti, derivanti dal benzo- $\gamma$ -pirone e formati da due anelli aromatici (A e B) e un eterociclo di collegamento (C) (Figura 2.2). In base al tipo di eterociclo, allo stato di ossidazione, al numero e alla posizione dei vari sostituenti, la famiglia include flavani, flavanoni, antocianidine, flavoni, flavonoli, isoflavoni e tannini (Figura 2.3) (Apak *et al.*, 2007). Il grado di ossidazione dell'anello eterociclico, il numero e le specifiche

posizioni dei gruppi OH o la natura dei gruppi funzionali, determinano la funzione dei flavonoidi come agenti antiossidanti, agenti antinfiammatori, agenti citotossici e agenti mutageni *in vitro* o *in vivo*, a dimostrazione di come piccole differenze di struttura determinano grandi diversità nelle attività biologiche (Carratù & Sanzini, 2005).



**Figura 2.2.** Struttura generica dei flavonoidi



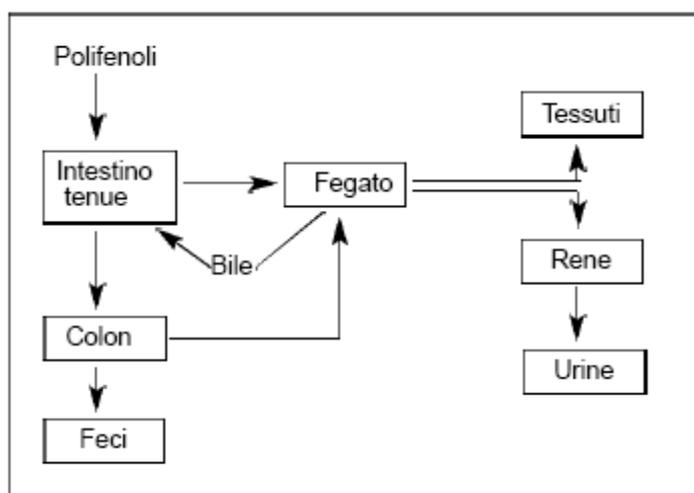
**Figura 2.3.** Classi rappresentative dei flavonoidi (Apak *et al.*, 2007)

***Tannini.*** I tannini sono considerati metaboliti fenolici dei vegetali con un peso molecolare più alto di 500 e con l'abilità di far precipitare gelatine o altre proteine da una soluzione, dando una tipica reazione con il  $\text{FeCl}_3$  con produzione di una colorazione blu. Non rappresentano una vera e propria classe di composti, ma piuttosto un gruppo di composti fenolici, variamente combinati tra loro, caratterizzati da alto peso molecolare e da proprietà colloidali. Si distinguono due tipologie di tannini: idrolizzabili e condensati. I tannini idrolizzabili sono poliesteri che, per idrolisi acida o alcalina, liberano acido gallico ed il suo dimero (acido diidrossifenoico), che per lattonizzazione forma l'acido ellagico. I tannini condensati sono, invece, oligomeri o polimeri derivanti dalla condensazione o polimerizzazione ossidativa dei flavan-3-oli e dei 3,4 flavan-dioli, uniti con legame covalente. I tannini condensati sono detti anche proantocianidine, in quanto tali sostanze, se ossidate in ambiente fortemente acido, liberano antocianidine.

## ***2.1 Biodisponibilità e metabolismo dei polifenoli***

Per biodisponibilità si intende la velocità e l'entità con la quale un nutriente viene ingerito, assorbito e metabolizzato attraverso un normale pathway. La biodisponibilità può essere influenzata da diversi fattori intrinseci all'alimento e all'organismo umano (Carratù & Sanzini, 2005).

I polifenoli generalmente sono poco assorbiti, largamente metabolizzati e rapidamente eliminati; il loro metabolismo avviene attraverso un pathway comune (Figura 2.4).



**Figura 2.4.** Ciclo metabolico dei polifenoli introdotti con la dieta (Carratù & Sanzini, 2005)

La maggior parte dei composti è presente negli alimenti come esteri, glucosidi o polimeri che non possono essere assorbiti nella loro forma originaria, ma devono essere idrolizzati dagli

enzimi intestinali e/o dalla microflora del colon ad agliconi. Questa microflora possiede una grande capacità di deglicosilazione che avviene molto rapidamente. L'assorbimento a livello gastrico è invece limitato sia per la ridotta area di scambio, confrontata con quella dell'intestino, sia per la resistenza all'idrolisi dovuta al pH e agli enzimi gastrici.

Quando è coinvolta la flora intestinale l'efficienza dell'assorbimento è spesso ridotta in quanto la flora può degradare anche gli agliconi e produrre acidi aromatici semplici. Ha inoltre in questa fase una funzione importante anche lo stato fisiologico dell'organismo, quando ad esempio vengono assunti farmaci.

L'aglicone libero può passare nella cellula epiteliale passivamente o per diffusione facilitata. Le forme acilate sembrano passare come tali attraverso la membrane e sono pertanto assorbite senza deconiugazione o idrolisi, mentre la forma glucosidica può essere trasportata anche intatta all'interno della cellula attraverso un carrier e poi essere idrolizzata dalle beta-glucosidasi presenti nel citosol. Nelle cellule dell'intestino tenue avviene la coniugazione a glucoronide e in minor misura a forme solfate e metilate.

Le antocianidine rappresentano una eccezione perché è stata riscontrata la presenza nel plasma e nelle urine della forma glicosilata imm modificata, fatto che implicherebbe il coinvolgimento di recettori di trasporto di glucosio durante l'assorbimento. Alcuni flavonoidi, come ad esempio la rutina, non vengono deglicosilati e raggiungono l'ileo terminale e l'intestino crasso. La quercetina è rapidamente idrolizzata dalla flora del colon in composti fenolici a basso peso molecolare pertanto viene assorbita meno efficientemente rispetto all'intestino tenue. Nel fegato i flavonoidi coniugati vengono deglucoronidati dalle beta-glucuronidasi e trasformati nelle forme solfate, mentre i glucuronidi intatti sono metilati; invece gli agliconi che raggiungono il fegato come tali vengono ivi coniugati. I coniugati sono secreti attraverso le vie biliari nel duodeno dove sono soggetti all'azione degli enzimi batterici e poi assorbiti (circolo enteroepatico).

La biodisponibilità ed il metabolismo dei tannini condensati sono invece ancora oscuri. Si ritiene che alcuni oligomeri siano assorbiti dall'organismo in maniera simile alle loro forme monometriche. Alcuni studi evidenziano che la permeabilità cellulare dei tannini condensati sia funzione inversa del grado di polimerizzazione (Carratù & Sanzini, 2005).

I polifenoli sono stati riscontrati in diversi tessuti, ma principalmente nella mucosa del tratto digestivo e soprattutto nella mucosa orale. I polifenoli maggiormente assorbiti sono gli isoflavoni e l'acido gallico, seguiti dai flavanoni, catechine e quercetina glicosidata (Petti & Scully, 2009).

L'assunzione con la dieta di flavonoli, flavoni e flavanoli monomerici è relativamente bassa e le concentrazioni plasmatiche raramente eccedono 1 mmoli/L a causa dell'assorbimento limitato e della rapida eliminazione. Invece i flavanoni ed isoflavoni, anche se sono contenuti solo negli agrumi e nella soia, sono i flavonoidi con il profilo di biodisponibilità migliore: infatti, la concentrazione plasmatica può raggiungere le 5 mmoli/L. Le proantocianidine e analogamente le antocianine non sono assorbite o assorbite molto poco e pertanto la loro attività è limitata all'enterocita. I bassi livelli di polifenoli riscontrati nel plasma rispetto ai 10-100 mg di ogni singolo composto assunti con la dieta mettono in evidenza i complessi meccanismi che regolano la biodisponibilità; si stima che l'emivita dei polifenoli in circolo sia compresa tra le 2 e le 6 ore. Sono necessarie, tuttavia, ulteriori informazioni sulla influenza della microflora intestinale, sulla natura dei metaboliti e sulla distribuzione nei tessuti (Carratù & Sanzini, 2005).

## **2.2 Ruoli funzionali dei polifenoli**

Lo studio della relazione struttura-funzione dei polifenoli ha evidenziato che le caratteristiche strutturali influiscono sulle loro proprietà biologiche, sulle biodisponibilità, sull'attività antiossidante e sull'interazione specifica con recettori cellulari.

Essendo metaboliti secondari, i polifenoli svolgono nelle piante diverse funzioni. Per esempio, sono responsabili della pigmentazione dei fiori, frutti e semi, attirando in questo modo gli impollinatori e i dispersori di semi; promuovono la fertilità della pianta e la germinazione del polline; agiscono come molecola-segnaletto nell'interazione tra pianta e microrganismo; proteggono contro la luce ultravioletta e altre funzioni difensive, tra cui la difesa contro i microrganismi patogeni (i polifenoli, interagiscono con le proteine di membrana, gli enzimi e i lipidi dei microrganismi, attraverso diversi modi, alterando la permeabilità delle loro cellule e determinando la perdita di protoni, ioni e macromolecole) e i predatori delle piante (i polifenoli disturbano la digestione, il metabolismo degli animali e l'assorbimento degli amminoacidi, amido e lipidi attraverso diversi meccanismi) (Petti & Scully, 2009).

Il ruolo protettivo esercitato dai polifenoli contro l'insorgenza delle patologie croniche degenerative è stato attribuito prevalentemente al loro ruolo come antiossidanti. Infatti studi *in vitro* hanno dimostrato che i polifenoli si comportano come antiossidanti e sono agenti riducenti, ed insieme ad altri composti introdotti con la dieta (come la vitamina C, vitamina E e carotenoidi) contribuiscono al potenziale antiossidante degli alimenti.

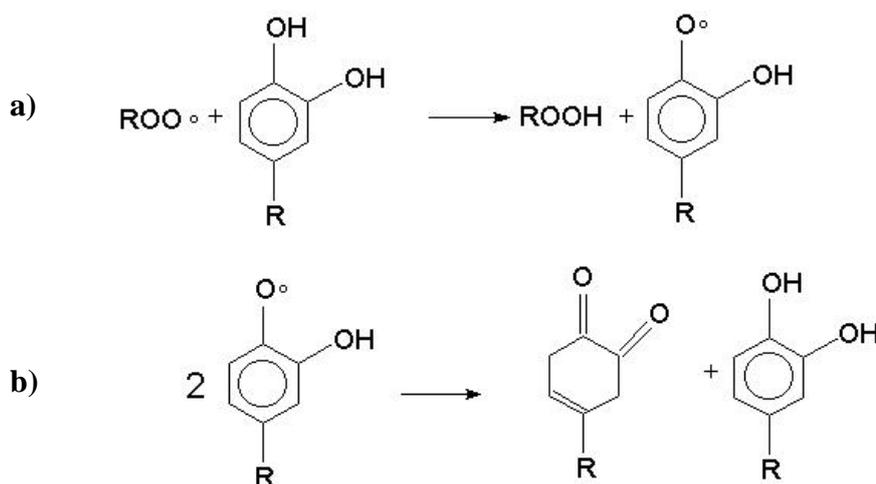
Non è stato evidenziato un accumulo di polifenoli, pertanto solo il consumo abituale e quotidiano di alimenti ricchi di questi composti può contribuire a prevenire le numerose patologie umane legate al danno ossidativo.

### 2.2.1 Attività Antiossidante

I polifenoli proteggono le cellule dai danni causati dai radicali liberi, che si sviluppano con il normale metabolismo cellulare e a causa di diversi fattori come radiazioni, fumo, agenti inquinanti, raggi UV, stress emotivo o fisico, additivi chimici, attacchi virali e batterici ecc.

Alcuni polifenoli sono altamente reattivi nel “spegnere” (quencer) l’ossigeno singoletto (Kahkonen *et al.*, 1999), neutralizzare i radicali liberi (R·) donando un atomo di idrogeno (RH) o un elettrone (R-) e nel chelare gli ioni metallici in soluzioni acquose (Petti & Scully, 2009). La loro attività antiossidante *in vitro* è considerata superiore a quella delle vitamine (Wang *et al.*, 1996).

L’efficacia antiossidante dei polifenoli è dovuta alla presenza di gruppi idrossilici legati alle strutture aromatiche ed alla geometria della molecola. Condizione fondamentale affinché sia esplicata l’attività antiossidante dei polifenoli è la formazione di radicali fenolici stabili, attraverso la delocalizzazione elettronica sulle strutture aromatiche ed alifatiche (Halliwell *et al.*, 1990) (Figura 2.5).



**Figura 2.5.** Reazione generica di un composto fenolico con un radicale libero (a); la delocalizzazione dell’elettrone dell’ossigeno sull’anello aromatico contribuisce alla stabilizzazione della nuova specie radicalica formata (b).

L’attività antiossidante dei flavonoidi ed il loro metabolismo *in vitro* dipendono anche dalla posizione dei gruppi funzionali del composto (Heim *et al.*, 2002). La configurazione

idrossilica dell'anello B è significativamente determinante per l'azione scavenging nei confronti delle specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto, in quanto gli idrossili di tale anello cedono idrogeno o un elettrone ai radicali idrossilici, perossilici e perossinitriti, stabilizzandoli e trasformandosi in un radicale flavonoide relativamente stabile. Tuttavia, gli ossidrili presenti sull'anello A hanno un'attività antiossidante decisamente più blanda rispetto a quelli dell'anello B. Anche l'eterociclo contribuisce all'attività antiossidante con la presenza di un gruppo ossidrilico in posizione 3, in quanto permette la coniugazione tra i due anelli aromatici A e B.

Le capacità chelanti dei flavonoidi e dei tannini contribuiscono all'attività antiossidante. In questo modo i flavonoidi inibiscono il danno ossidativo rimuovendo e neutralizzando gli ioni ferro negli epatociti. La chelazione dello ione bivalente non necessariamente neutralizza il flavonoide, che può mantenere la propria funzione di scavenger nei confronti delle specie reattive dell'ossigeno. All'interno delle varie classi di polifenoli, hanno maggiore attività antiossidante l'acido gallico, il resveratrolo e la (+)-catechina.

Oltre a contrastare i radicali liberi, i composti fenolici svolgono numerose attività biologiche come la protezione dei capillari sanguigni, l'azione antinfiammatoria, antibatterica, immunostimolante, antiallergenica, antivirale, estrogenica ed anticancerogena. È stata inoltre dimostrata la loro azione inibente nei confronti di alcuni enzimi, quali la fosfolipasi A2, la ciclossigenasi, la lipossigenasi, la glutatione reduttasi e la xantina ossidasi (Waladkhani & Clemens, 2001).

### **2.2.2 Attività Anticancerogena**

L'attività anticancerogena dei polifenoli è dovuta all'abilità di tali molecole di inibire gli enzimi coinvolti nella carcinogenesi e nello sviluppo dei tumori (Petti & Scully, 2009). In generale hanno influenza sullo step di iniziazione dello sviluppo del cancro, proteggendo le cellule contro l'attacco diretto da carcinogeni o alterando il loro meccanismo di attivazione (*in vitro*). Queste prove scientifiche spiegano la classica evidenza epidemiologica secondo cui esiste una correlazione tra consumo di vegetali freschi e ridotta incidenza di alcuni tipi di cancro (pelle, polmoni, stomaco, esofago, pancreas, fegato, seno e colon).

### **2.2.3 Attività Antiaterogena**

È ampiamente riportato come l'ossidazione dei lipidi ed in particolare delle LDL (low density lipoprotein) sia la causa dello sviluppo dell'aterosclerosi e delle malattie ad essa correlate (ictus, trombosi e malattie cardiovascolari in genere). Studi epidemiologici suggeriscono che

un elevato intake di flavonoidi decresce la mortalità dovuta alle malattie cardiovascolari di circa il 65% e generalmente diminuisce il rischio di ictus cerebrale, come pure il cancro al polmone e al retto (Petti & Scully, 2009).

Il primo meccanismo di azione è la riduzione della coagulazione delle piastrine e delle LDL; altri meccanismi sono l'inibizione dell'ossidazione delle lipoproteine, l'azione "radical scavenger" e la modulazione del metabolismo degli eicosanoidi. I flavonoidi, più che gli acidi fenolici, hanno un notevole effetto protettivo nei confronti delle LDL. Questo è dovuto sia all'azione diretta dei polifenoli come scavenger di radicali, sia alla rigenerazione della vitamina E nelle LDL a partire da un radicale  $\alpha$ -chromanossi (Zhou *et al.*, 2000).

#### **2.2.4 Attività Antinfiammatoria**

L'attività antiossidante dei flavonoidi potrebbe essere alla base dell'attività antinfiammatoria e antiplastrinica (Robak & Grygliwski, 1996), sia grazie alla struttura dei flavonoidi sia alla loro capacità di penetrare la membrana lipidica della cellula (Saiija *et al.*, 1995).

#### **2.2.5 Attività Antibatterica ed Antivirale**

Havsteen (2002) ha osservato che i polifenoli posseggono attività antivirali nei confronti dell'HIV, dell'Herpes Simplex, di vari virus influenzali e del Rhinovirus. La presunta attività anti-HIV potrebbe essere dovuta all'inibizione di enzimi, come la trascrittasi inversa, proteinasi e integrasi e del recettore CD4 (Petti & Scully, 2009). Mentre l'attività polifenolica contro virus influenzali umani e aviari sembra essere dovuta all'inibizione delle emagglutinine virali, l'azione contro il citomegalovirus è correlata all'inibizione del recettore del fattore di crescita epidermico (Petti & Scully, 2009).

Gli effetti benefici dei polifenoli condotti su animali o *in vitro* sono generalmente non confermati da studi condotti sull'uomo. Questa discrepanza potrebbe essere spiegata dal fatto che il meccanismo di azione dei polifenoli *in vivo* potrebbe essere differente dal meccanismo *in vitro*. Infatti, la classica attività antiossidante dei polifenoli non è molto probabilmente la principale spiegazione degli effetti benefici sugli uomini, ma piuttosto sono coinvolti meccanismi di modulazione e inibizione di proteine/enzimi, recettori e molecole di trascrizione (Petti & Scully, 2009). Sono necessari, quindi, studi ulteriori per confermare tali attività.

### 2.3 Composti antiossidanti nel grano duro

Fino ad ora le sostanze antiossidanti presenti nei cereali integrali non hanno ricevuto la stessa attenzione mostrata nei confronti dei prodotti fitochimici presenti in frutta e verdura. Negli ultimi anni studi epidemiologici hanno determinato che il consumo costante di cereali riduce l'incidenza di malattie cardiovascolari, diabete ed altre patologie. Inoltre si è avuta conferma che gli effetti salutari riscontrati sono da collegare ai composti biologicamente attivi (nutraceutici) tipici dei cereali e presenti nelle diverse parti della cariosside (pericarpo, germe ed endosperma), (Figura 2.6) che hanno la capacità di determinare un rafforzamento della barriera cellulare nei confronti dei fenomeni di ossidazione (Flagella *et al.*, 2006; Duthie *et al.*, 1996). Sembra che il principale effetto positivo della granella integrale di cereali sia la capacità antiossidante totale.

| Composti   | Principale Localizzazione                   | Funzione  |
|--|---|---|
| Composti fenolici<br>[ acidi fenolici e derivati<br>flavonoidi<br>lignani<br>lignina | Endosperma e<br>pericarpo                   | Ipocolesterolemica<br>Antitumorale<br>Antidiabetica<br>Riduzione del rischio di malattie<br>cardiovascolari e<br>degenerative |
| Tocoli<br>[ tocoferoli<br>tocotrienoli   | Germe<br>Strato aleuronico e sub-aleuronico |   |
| Carotenoidi<br>[ caroteni<br>xantofille  |   |   |
| Fibre<br>solubili<br>insolubili  |   | Attività prebiotica<br>Miglioramento peristalsi   |

**Figura 2.6.** Composti ad azione antiossidante e salustica presenti nel grano duro

La maggior parte dei composti antiossidanti dei cereali è costituita da antiossidanti idrofili come i composti fenolici e da composti lipofili, quali tocoli e carotenoidi (Adom & Liu, 2002). Uno studio condotto dagli stessi autori ha messo a confronto la capacità antiossidante totale della granella integrale di diverse specie cerealicole (mais, frumento, avena, riso) evidenziando che il frumento è al secondo posto preceduto dal mais e seguito da avena e riso. Oltre ai fenoli, tocoli e carotenoidi i cereali sono ricchi di lignani, potenti antiossidanti che esercitano un'azione anticancerogena, riducendo la produzione dei ROS. Anche i fitosteroli, seppur presenti in minima parte nei cereali, hanno un effetto benefico sulla salute, abbassando il livello di colesterolo ematico e riducendo il rischio di patologie croniche.

### 2.3.1 Polifenoli presenti nel frumento

La granella dei cereali è ricca in acidi fenolici le cui quantità totali possono arrivare a 800 mg/kg (Tabella 2.3), mentre i flavonoidi sono presenti in piccole quantità. Infatti gli acidi fenolici rappresentano la forma più presente dei composti fenolici, nonché il maggiore e più complesso gruppo di composti bioattivi presenti nei cereali.

**Tabella 2.3.** Contenuto in fenoli liberi e legati estratti con diversi metodi riportati in letteratura e dosati mediante HPLC e Folin-Ciocalteu in sfarinato integrale di grano duro

| Autori                     | Fenoli HPLC<br>(mg/Kg) |           | Fenoli (Folin-<br>Ciocalteu)<br>(mg catechina/Kg) |        |
|----------------------------|------------------------|-----------|---|--------|
|                            | liberi                 | legati    | liberi  | legati |
| Zhou <i>et al.</i> , 2004* | 55                     | /         | 2000  | /      |
| Adom and Liu, 2002**       | /                      | /         | circa 300   | 1020   |
| Moore <i>et al.</i> , 2005 | 0,5-1,5                | 400-500   | /   | /      |
| Ward <i>et al.</i> , 2008° | 7-22                   | 300-800   | /   | /      |
| Li <i>et al.</i> , 2008**  | Circa 20               | Circa 600 | /   | /      |

\*estratti con una soluzione acetone 50%, senza acidificazione

\*\*estratti con etanolo 80%

° estratti con etanolo/acqua ed esano etilacetato 8:2 (v/v), saponificazione a caldo

Adom & Liu (2002) e Carcea *et al.*, (2002) hanno riportato che l'acido ferulico è il principale composto fenolico presente nel frumento, presente in concentrazioni 50-70 volte maggiori nella porzione crusca/germe rispetto all'endosperma. Oltre all'acido ferulico sono presenti gli acidi *p*-cumarico, vanillico, siringico e caffeico (Okarter *et al.*, 2010; Liu, 2007; Naczk & Shahidi, 2006).

Questa classe di antiossidanti può essere presente sotto forma di *fenoli liberi solubili*, *solubili coniugati*, quest'ultimi esterificati a zuccheri e altri composti a basso peso molecolare e i *fenoli insolubili legati*. Quest'ultimi, che rappresentano 80-95% del contenuto totale, sono legati a polimeri della parete cellulare, in particolare arabinoxilani (Serpen *et al.*, 2008; Lampi *et al.*, 2008; Liu, 2007), ma anche a stanoli e steroli (Naczk & Shahidi, 2006). La crusca di frumento contiene anche diidrodimeri dell'acido ferulico (DiFA), che rafforzano le pareti dello strato aleuronico durante la maturazione del grano attraverso la formazione di ponti tra le catene di arabinoxilani, fornendo una barriera fisica contro l'attacco di insetti e microrganismi (Naczk & Shahidi, 2006). Inoltre, i dimeri dell'acido ferulico, potenti antiossidanti, sono legati ai polisaccaridi delle pareti cellulari della pianta e quindi non

assorbiti dall'intestino umano in questa forma, ma solo dopo idrolisi degli enzimi intestinali (Li *et al.*, 2008). Fino a pochi anni fa il contenuto di antiossidanti nei cereali veniva sottostimato, poiché le tecniche di estrazione utilizzate non testavano la porzione legata ma determinavano solo quella libera e coniugata. Ultimamente sono stati eseguiti numerosi studi che hanno valutato l'intero profilo di fitochimici nella forma libera, coniugata-solubile e legata-insolubile, e la capacità antiossidante di questi composti, in numerose specie di cereali. I risultati mostrano che nonostante ci sia variabilità tra una specie e l'altra, la maggior parte dei composti fenolici si trova nella forma legata (Tabella 2.4).

Il rapporto tra acido ferulico in forma libera, solubile-coniugata e legata nel mais e nel frumento è generalmente di 0,1:1:100 (Liu, 2007). I composti fenolici legati sono i principali responsabili dell'attività antiossidante totale della granella (90%) (Adom & Liu, 2002) mentre i fenoli liberi e coniugati contribuiscono in misura molto minore (meno dello 0,6% e 7%, rispettivamente) (Liu, 2007).

**Tabella 2.4.** Contenuto in singoli acidi fenolici di differenti specie di frumento (mg/Kg di sostanza secca) (Li *et al.*, 2008)

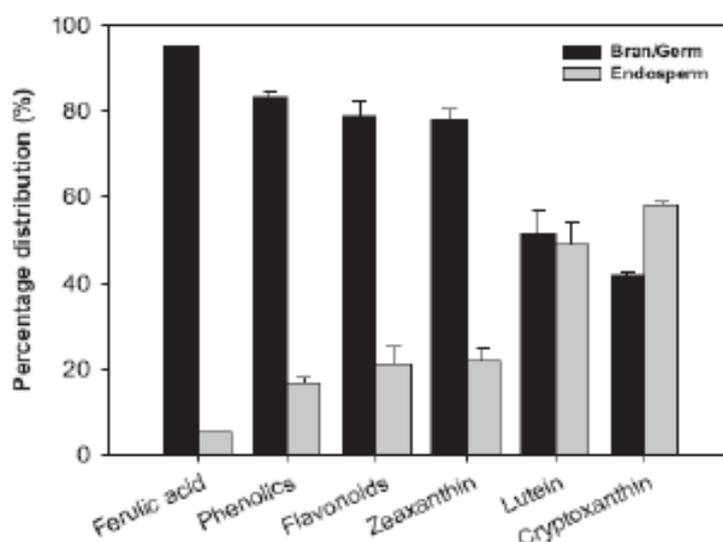
|                           | winter wheat (n = 130)<br><i>T. aestivum</i> var. <i>aestivum</i> |          | spring wheat (n = 20)<br><i>T. aestivum</i> var. <i>aestivum</i> |          | durum wheat (n = 10)<br><i>T. turgidum</i> var. <i>durum</i> |            |
|---------------------------|---|----------|--|----------|--|------------|
|                           | mean  | range    | mean   | range    | mean   | range      |
| 4-hydroxybenzoic acid     |   |          |  |          |  |            |
| free                      | 0.1 ± 0.024   | 0-1.8    |  |          |  |            |
| conjugated                | 5.4 ± 0.14ab  | 2.3-11.1 | 6.3 ± 0.34abd  | 3.6-9.6  | 10.9 ± 0.85c   | 6.0-16.2   |
| bound                     | 2.1 ± 0.12abc   | 0.2-8.3  | 2.8 ± 0.35ab   | 0.9-6.5  | 2.0 ± 0.76abc  | 0.4-8.6    |
| vanillic acid             |   |          |  |          |  |            |
| free                      | 2.3 ± 0.059ad   | 0-4.4    | 1.7 ± 0.076bcd   | 1.2-2.5  | 1.9 ± 0.13abcd   | 1.1-2.5    |
| conjugated                | 14.1 ± 0.29ab   | 8.8-24.5 | 14.0 ± 0.69abc   | 8.2-22.7 | 15.2 ± 0.77ab  | 11.6-18.3  |
| bound                     | 4.5 ± 0.10ab  | 2.1-9.0  | 3.8 ± 0.25abc  | 2.4-5.9  | 3.3 ± 0.56ac   | 1.8-8.1    |
| syringic acid             |   |          |  |          |  |            |
| free                      | 2.0 ± 0.072ac   | 0-4.0    | 2.4 ± 0.22ac   | 0.8-5.1  | 2.3 ± 0.32ac   | 1.0-4.1    |
| conjugated                | 10.9 ± 0.35ab   | 3.9-22.0 | 11.2 ± 0.71ab  | 6.7-18.8 | 5.8 ± 0.42ac   | 3.7-7.9    |
| bound                     | 4.7 ± 0.20abc   | 1-13.4   | 3.8 ± 0.35abcd   | 1.5-6.7  | 1.2 ± 0.20ade  | 0.6-2.8    |
| syringaldehyde            |   |          |  |          |  |            |
| free                      | 0.1 ± 0.027   | 0-1.6    |  |          |  |            |
| conjugated                | 0.4 ± 0.07  | 0-2.9    |  |          |  |            |
| bound                     | 0.4 ± 0.05  | 0-2.0    |  |          |  |            |
| caffeic acid              |   |          |  |          |  |            |
| free                      | 0.4 ± 0.080   | 0-3.3    |  |          |  |            |
| conjugated                | nq  | nq       | nq   | nq       | nq   | nq         |
| bound                     | nq  | nq       | nq   | nq       | nq   | nq         |
| 2,4-dihydroxybenzoic acid |   |          |  |          |  |            |
| free                      | 0.3 ± 0.055ab   | 0-4.6    | 0.2 ± 0.09ab   | 0-1.6    | 1.1 ± 0.33bc   | 0-2.5      |
| conjugated                | 50.6 ± 1.51ab   | 7.6-116  | 57.1 ± 6.59abc   | 5.2-119  | 108.4 ± 6.82c  | 80.5-153.0 |
| bound                     | 76.4 ± 3.64ac   | 0-197.9  | 24.8 ± 4.52ab  | 3.1-74.6 | 23.9 ± 6.47ab  | 9.0-65.6   |
| sinapic acid              |   |          |  |          |  |            |
| free                      | 2.2 ± 0.34a   | 0-12.3   |  |          | 3.6 ± 1.48a  | 0-9.2      |
| conjugated                | 55.5 ± 1.54ab   | 27.8-128 | 47.4 ± 3.5ab   | 21.5-83  | 86.6 ± 7.86ac  | 55.9-136.6 |
| bound                     | 23.2 ± 0.44a  | 12.9-40  | 20.3 ± 0.87a   | 15.1-30  | 23.8 ± 1.45a   | 18.4-34.7  |
| ferulic acid              |   |          |  |          |  |            |
| free                      | 3.3 ± 0.08ab  | 1.2-6.2  | 2.7 ± 0.132ac  | 1.9-4.1  | 2.9 ± 0.18abc  | 2.1-3.8    |
| conjugated                | 29.3 ± 1.02ab   | 9.4-62.3 | 28.5 ± 2.14ab  | 11.6-51  | 44.9 ± 5.65bcd   | 26.2-87.8  |
| bound                     | 366.2 ± 10.60a  | 162-721  | 375.0 ± 25.2a  | 252-628  | 355.5 ± 43.1a  | 241.0-701  |
| p-coumaric acid           |   |          |  |          |  |            |
| free                      | 0.6 ± 0.04ab  | 0-2.2    | 0.6 ± 0.14abc  | 0-2.2    | 1.1 ± 0.22ac   | 0-2.3      |
| conjugated                | 5.2 ± 0.14abc   | 3.0-12.1 | 6.3 ± 0.59ac   | 3.8-14.6 | 6.1 ± 0.52abc  | 4.9-10.5   |
| bound                     | 10.0 ± 0.30a  | 3.0-19.1 | 4.1 ± 0.49b  | 2.8-13.3 | 3.4 ± 0.074b   | 3.1-4.0    |
| 2-hydroxycinnamic acid    |   |          |  |          |  |            |
| free                      | 0.03 ± 0.01   | 0-0.8    |  |          | 0.2 ± 0.11   | 0-1.1      |
| conjugated                | 1.9 ± 0.09ab  | 1.3-3.6  | 2.2 ± 0.09ac   | 1.8-3.0  | 2.5 ± 0.10ac   | 2.0-3.1    |
| bound                     | 4.3 ± 0.09a   | 2.4-7.3  | 4.6 ± 0.22a  | 3.3-6.8  | 5.1 ± 0.36a  | 3.9-7.4    |

\* Values with the same letter in a row are not significantly different ( $P < 0.05$ ) from each other.

Nel riso, l'acido fenolico presente in maggiori quantità risulta essere il *p*-idrossibenzoico, nell'avena il siringico e nel mais il *p*-cumarico. Il livello di esteri solubili e glucosidi degli acidi fenolici nelle farine dei vari cereali è di circa 2-5 volte più alto degli acidi fenolici in forma libera, con il mais che presenta il livello massimo (Krygier *et al.*, 1982).

Durante la conservazione, gli acidi fenolici presenti nella farina di frumento subiscono una diminuzione, con possibilità di riduzioni in termini di concentrazione di circa un terzo rispetto ai valori di partenza (Sosulski *et al.*, 1982).

I composti fenolici, come gli altri composti fitochimici, sono maggiormente localizzati nella frazione germe/crusca (Figura 2.7). Infatti il contenuto fenolico è circa 15-18 volte più alto nella frazione germe/crusca piuttosto che nell'endosperma amilifero (Liu, 2007).



**Figura 2.7.** Distribuzione percentuale dei composti bioattivi nelle frazioni del grano (Liu, 2007)

Anche per i flavonoidi il contenuto nella crusca e nel germe è maggiore rispetto all'endosperma (10-15 volte in più). I flavonoidi nei cereali non sono molto abbondanti, i maggiori sottogruppi sono i flavanoli, i flavonoli e le antocianine. Come gli acidi fenolici, la maggior parte dei flavonoidi si trova in forma legata alle macromolecole della parete cellulare; sono comunque i maggiori polifenoli che si trovano in forma libera, soprattutto in cereali come orzo e avena (catechina, proantocianidina, quercitina).

Nella granella integrale di frumento duro, Pastore *et al.* (2009) hanno osservato un'attività antiossidante totale pari a 44 e 67  $\mu\text{mol}$  di equivalenti di Trolox/g in estratti acquosi e cloroformici rispettivamente, utilizzando un nuovo metodo basato sulla reazione fra lipossigenasi, LOX, e *p*-Nitrosodimetilanilina, RNO. Altri autori riportano una capacità

antiossidante nel frumento duro pari a 1,64  $\mu\text{molTrolox/g}$  di sostanza secca determinata con il metodo TEAC in seguito ad estrazione con metanolo (Menga *et al.*, 2010). Questo dimostra come i valori di capacità antiossidante come pure il contenuto in polifenoli totali variano da un autore all'altro dipendendo dalla metodica di estrazione e il metodo di dosaggio applicati (Tabella 2.5).

**Tabella 2.5.** Capacità antiossidante di estratti di sfarinato integrale riportate in letteratura e dosate con il metodo TEAC

| Autori                            | Capacità antiossidante<br>(TEAC) |        |
|-----------------------------------|----------------------------------|--------|
|                                   | (nmoli Trolox/g)                 |        |
|                                   | liberi                           | legati |
| Zhou <i>et al.</i> , 2004*        | 15000                            | /      |
| Pellegrini <i>et al.</i> , 2006** | 1990                             | 2500   |
| Moore <i>et al.</i> , 2005***     | 14000                            | /      |

\*estratti con una soluzione acetone 50% (v/v)

\*\*estratti metanolici

\*\*\*estratti con acetone-acqua-metanolo

## ***Capitolo 3. Utilizzo di cereali non convenzionali in pastificazione e panificazione***

### ***3.1 Pastificazione e produzione di pasta fresca***

La pasta rappresenta un prodotto alimentare che entra, ampiamente e frequentemente, nella nostra dieta e che incontra il favore del consumatore per facilità e semplicità d'uso, relativamente alle operazioni di manipolazione, trasporto, conservazione nonché per le caratteristiche nutrizionali e sensoriali.

Per i suddetti motivi, la pasta è un prodotto alimentare che si presta perfettamente ad essere utilizzato per incorporare materie prime non convenzionali. Secondo la legislazione italiana (DPR n.187 del 2001) il termine “pasta di semola” è riferito al prodotto ottenuto dalla trafilazione, laminazione e conseguente essiccamento di impasti preparati esclusivamente con semola di grano duro.

La semola di grano duro è infatti considerata la materia prima di elezione per la produzione di pasta, soprattutto per le peculiari proprietà delle sue proteine (glutine) e per l'alto contenuto di pigmenti carotenoidi. La pasta ottenuta con materie prime diverse dalla semola può prevedere la sostituzione parziale o totale della semola con altri prodotti cerealicoli, prodotti non cerealicoli e miscele di cereali e prodotti non cerealicoli.

La preparazione di pasta con ingredienti non convenzionali privi di glutine è di difficile ottenimento a causa dell'assenza/ridotta formazione del reticolo proteico che riveste la fondamentale funzione di impedire la disgregazione della pasta durante la cottura. La quantità di ingrediente non convenzionale che può essere aggiunto o sostituito alla semola rappresenta un compromesso tra la necessità/scopo dell'impiego della materia prima non convenzionale e il mantenimento di adeguate caratteristiche sensoriali e di cottura del prodotto finito.

Le principali motivazioni per l'utilizzo di materie prime non convenzionali sono essenzialmente riassunte in tabella 3.1.

Materie prime tipiche di particolari aree geografiche e non diffuse in tutto il mondo possono essere usate laddove la semola non è disponibile o se il costo di quest'ultima diventa un fattore limitante, come può succedere in Paesi in via di sviluppo.

Nel 1964, la FAO (Food and Agriculture Organization) lanciò il programma “Composite Flour” allo scopo di favorire l'uso di materie prime locali per la produzione di prodotti alimentari caratterizzati da elevati standard nutrizionali. Lo scopo principale del programma

“Composite Flour” è stato senza dubbio quello di ampliare l’uso di materie prime diverse dal frumento nella produzione di pane, pasta, biscotti e altri prodotti a base di farina.

**Tabella 3.1.** Motivazioni per l’utilizzo di materie prima non convenzionali

|  |  |
|--|--|
| Miglioramento delle proprietà nutrizionali   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Contenuto in proteine (dal 10-12% al 20%)</li> <li>- Qualità proteica (lisina = A.A. limitante) (indice chimico da 35 a &gt; 70)</li> </ul>   |
| Utilizzo di materie prime locali   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Disponibilità limitata e costo elevato della semola</li> <li>- Farine composite (Composite Flours)</li> </ul>   |
| Produzione di pasta apteica (priva di glutine)   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Morbo celiaco (pazienti affetti da)</li> <li>- Diete prive di glutine</li> <li>- Intolleranza alle proteine</li> </ul>  |
| Valorizzazione dei sottoprodotti   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sottoprodotti di lavorazione dei cereali               <ul style="list-style-type: none"> <li>macinazione (germe, aleurone, crusca)</li> <li>perlatura (aleurone, germe, crusca)</li> <li>produzione di malto/fabbricazione della birra (trebbie, radichette, colture di lieviti ecc.)</li> </ul> </li> <li>- Altri sottoprodotti (di origine animale)               <ul style="list-style-type: none"> <li>produzione del formaggio (proteine del siero)</li> <li>lavorazione del pesce (farina di pesce)</li> <li>lavorazione della carne (farina animale e farina d’ossa)</li> </ul> </li> </ul> |
| Utilizzo/recupero valorizzazione di specie nuove, obsolete e poco utilizzate e pseudocereali | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Farro (monococco, dicocco, spelta)</li> <li>- Triticale</li> <li>- Kamut</li> <li>- Grano saraceno</li> <li>- Quinoa</li> <li>- Amaranto</li> </ul>   |
| Produzione di pasta funzionale   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ingredienti funzionali               <ul style="list-style-type: none"> <li><math>\beta</math>-glucani</li> <li>tococromanoli (tocoferoli e tocotrienoli)</li> <li>acidi grassi <math>\Omega</math> 3 (DHA, EPA)</li> <li>fitosteroli</li> </ul> </li> <li>- Ingredienti prebiotici               <ul style="list-style-type: none"> <li>inulina</li> <li>fruttooligosaccaridi (FOS)</li> </ul> </li> </ul>   |

Materie prime non convenzionali possono derivare dai sottoprodotti della lavorazione dei cereali (germe, aleurone, crusca, trebbie, radichette, colture di lieviti) o come sottoprodotti di altre lavorazioni alimentari (proteine del siero, farina di pesce, farina animale, farina d’ossa). In particolare, sottoprodotti quali germe, strato aleuronico e crusca, derivanti dalla lavorazione dei cereali (macinazione, perlatura) possono essere impiegati nella produzione di

prodotti cerealicoli per aumentare il contenuto/qualità delle proteine, vitamine, fibra alimentare e composti con attività biologica.

L'impiego di ingredienti non convenzionali tuttavia, modifica in misura significativa le caratteristiche reologiche dell'impasto, con uno scadimento dell'attitudine alla trasformazione che deve essere ripristinata attraverso l'adozione di bilanciate formulazioni e adeguate tecnologie di trasformazione per ottenere prodotti con buone caratteristiche nutrizionali e sensoriali anche a partire da materie prime con scarsa attitudine alla trasformazione.

In merito al processo produttivo, il settore dell'industria di pastificazione, considerato in un contesto internazionale, si prefigge la produzione di pasta di svariati tipi e formati, attraverso un processo in cui una o più tipologie di sfarinati ed acqua sono impastati in presenza o meno di altri ingredienti. Di seguito l'impasto è estruso, trafilato e/o laminato e il prodotto formato è, infine, essiccato sino ad un'umidità tale da consentirne la conservazione.

L'idoneità a produrre una pasta con definiti attributi qualitativi non è uguale per tutte le semole. Le semole più pregiate sono quelle di colore giallo-ambrato, con tenore in ceneri e cellulosa inferiore al limite di legge (rispettivamente 0,90 e 0,20% su sostanza secca) e con elevata quantità di proteine di buona qualità.

La pasta fresca, alimento di primaria importanza per il consumatore italiano, è oggi sempre meno preparata in casa, ma, in compenso, è disponibile sul mercato in una miriade di diverse forme e presentazioni, dal prodotto sfuso casalingo-artigianale al confezionato sia artigianale che industriale.

Il processo di pastificazione prevede una serie abbastanza limitata di operazioni, la prima delle quali consiste nella miscelazione e nell'impastamento di semola ed acqua, con conseguente ottenimento di un impasto visco-elastico. Successivamente a tale impasto viene conferita la forma desiderata, mediante un ulteriore passaggio di estrusione o di laminazione. Il prodotto così ottenuto, caratterizzato da una propria forma, può, quindi, essere stabilizzato con un trattamento di pastorizzazione e venduto come "pasta fresca", oppure può essere essiccato per ottenere "pasta secca" (Carini *et al.*, 2009).

Il processo di pastificazione può essere considerato una "tecnologia matura", data non solo la sua diffusione a livello mondiale, ma anche la scarsa innovazione applicata a questo processo negli ultimi cinquanta anni. La letteratura inerente l'effetto del processo di lavorazione della pasta sulla qualità del prodotto è piuttosto scarsa e si concentra prevalentemente sul ruolo delle materie prime (D'Egidio *et al.*, 1990; Del Nobile *et al.*, 2005; Vignaux *et al.*, 2005), del procedimento di essiccazione (Sannino *et al.*, 2005; Berteli & Marsaioli, 2005) e delle condizioni di estrusione (Pagani *et al.*, 1989; Sarghini *et al.*, 2005; Zardetto *et al.*, 2005).

Ad uno stadio avanzato si trovano sicuramente le tecnologie per la produzione di paste fresche, mirate essenzialmente alla salvaguardia della freschezza e della genuinità.

Nel processo produttivo delle paste fresche, farcite e non, è possibile distinguere tre fasi fondamentali:

1. stoccaggio ed utilizzo di materie prime, ingredienti, ecc., per la formazione dell'impasto e la preparazione degli eventuali ripieni;
2. processo produttivo vero e proprio (formatura, pastorizzazione, raffreddamento);
3. eventuale confezionamento e stoccaggio refrigerato.

La figura 3.1 riporta in maniera più dettagliata un esempio di linea di produzione delle paste fresche, ripiene e non.

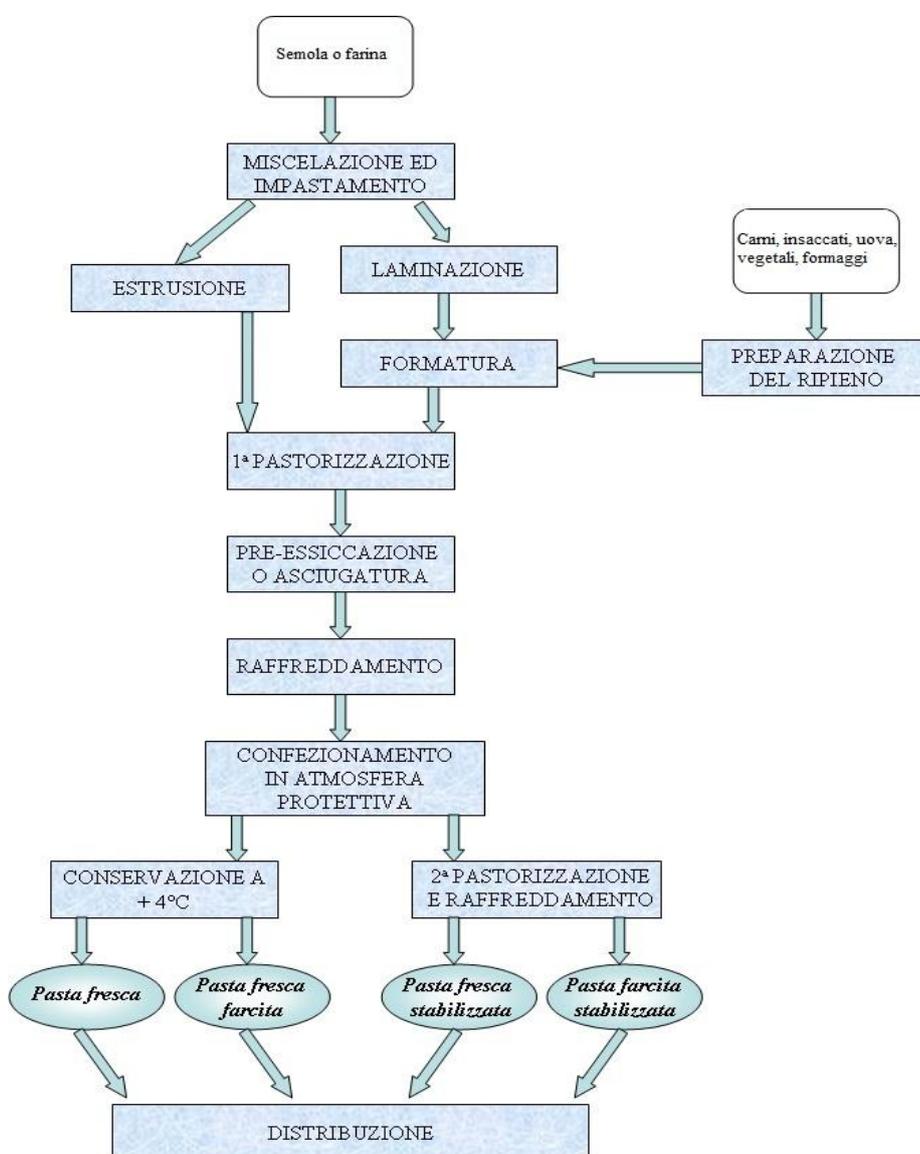


Figura 3.1. Linea di produzione della pasta fresca

### ***3.1.1 Dosaggio degli ingredienti e miscelazione***

La prima fase del processo di produzione delle paste fresche è il dosaggio degli ingredienti, che negli impianti di piccole dimensioni viene realizzato pesando direttamente le materie prime. Diversa è, invece, la situazione negli impianti industriali, all'interno dei quali è richiesto un sistema di dosaggio continuo dello sfarinato, realizzato mediante dosatori volumetrici, precisi e di facile pulizia.

Il sistema di dosaggio dei liquidi è realizzato con pompe volumetriche; in particolare, per l'acqua si impiega un sistema ad alta precisione di pompe a pistone. Nel caso di paste all'uovo, per le uova (prodotto liquido pastorizzato) si ricorre a pompe peristaltiche, abbinate a dispositivi di lavaggio automatici C.I.P. (Cleance In Place). Bisogna, infatti, considerare che il dosaggio delle uova è un procedimento molto delicato da un punto di vista microbiologico e richiede che tutto il sistema sia chiuso e perfettamente ed interamente pulibile.

L'acqua è dosata in funzione dell'umidità dello sfarinato e della sua temperatura; per uno sfarinato con umidità del 14% occorrono generalmente 28-30 litri di acqua ogni 100 kg di sfarinato.

Segue la fase di miscelazione, che normalmente si divide in due momenti: una premiscelazione rapida con centrifuga ed una miscelazione più lunga.

Le materie prime liquide e farinose, che escono dal dosatore, sono aspirate dal vuoto dell'impastatrice e precipitate in una piccola turbina ad alta velocità, il Turbo Spray, dove avviene la premiscelazione, la cui finalità è quella di garantire una distribuzione omogenea dei componenti. Tale macchina, infatti, consente una miscelazione rapida di sfarinati, acqua ed altri ingredienti per sprayzzazione dell'acqua sulla semola mescolata di continuo, in modo da assicurare che ciascuna particella riceva l'ammontare corretto di acqua. La massa, così omogeneamente idratata, giunge all'impastatrice vera e propria, dove avviene la miscelazione più lunga che porta alla formazione dell'impasto vero e proprio.

L'impastatrice è costituita da una vasca di forma cilindrica, all'interno della quale l'impasto è disposto in modo da occupare i due terzi del volume della vasca stessa, evitando che ristagni in angoli morti, dove potrebbe dare luogo a fermentazioni indesiderate. All'interno della vasca, realizzata in tutte le sue parti in acciaio inox, vi è un albero con lame di mescolamento lunghe all'incirca 15 cm, che si muovono a bassa velocità (70 giri/minuto).

Le operazioni di miscelazione ed impastamento avvengono sotto vuoto, ad una pressione di circa 70 mmHg; la pasta deareata è, infatti, più compatta, trasparente, con un colore più giallo e priva di bollicine di aria.

La formazione dell'impasto ha una durata che dipende dalla qualità della semola, dalla temperatura dell'acqua e dal formato di pasta da realizzare. In particolare, riveste fondamentale importanza la granulometria della semola: l'impiego di semole con granulometria ridotta determina l'aumento del rapporto superficie/volume, accelerando così l'assorbimento di acqua e riducendo conseguentemente il tempo di formazione dell'impasto. In queste condizioni, l'operazione ha durata media di 10-12 minuti.

### **3.1.2 *Formazione della sfoglia***

Una volta formato l'impasto, che presenta un'umidità del 32-35%, si passa alla formazione della sfoglia.

La sfogliatrice svolge un ruolo molto delicato, che può compromettere in modo significativo il prodotto nel colore e nella texture. Essa è dotata di alcune coppie di rulli che lavorano e laminano l'impasto fino ad ottenere una sfoglia dello spessore di 7 mm. La riduzione dello spessore è fondamentale per evitare stress meccanici a carico della sfoglia e formare una rete di glutine resistente ed allineata, mantenendo una bassa temperatura del prodotto.

Ottenuta la sfoglia continua si può passare alla fase di formatura. Per la pasta piana si ha una fase di laminazione che riduce gradualmente lo spessore fino ad 1 mm o meno, a seconda del tipo di prodotto richiesto. Nel caso delle lasagne, una serie di coltelli rotanti incidono la sfoglia prima del trattamento termico, in modo da favorirne la successiva separazione per il confezionamento.

Per la pasta ripiena si utilizzano macchine diverse a seconda dei formati e delle quantità richieste; ad esempio, nel caso specifico dei tortellini si ha un meccanismo molto delicato, che taglia la sfoglia, depone il ripieno, ripiega la sfoglia, chiude i lati ed alla fine chiude l'anello.

Nel caso delle paste fresche estruse, invece, si utilizzano presse e trafile in modo analogo a quanto avviene per la pasta secca. In questi casi, l'impasto, invece di essere laminato per ottenere una sfoglia, viene estruso attraverso una trafile assumendo diversi formati, sia di pasta lunga (spaghetti) che di pasta corta (fusilli, maccheroni, ecc.).

Ovviamente è anche possibile ottenere la sfoglia stessa per estrusione. I vantaggi e gli svantaggi di questo metodo sono da tempo argomenti di discussione tra gli addetti del settore. Appare comunque evidente che la scelta tra laminazione ed estrusione viene principalmente dettata dall'atteggiamento del mercato e dalle preferenze dei consumatori.

La pasta estrusa ha un contenuto di acqua del 28,5-29% ed una temperatura di circa 50°C.

Il prodotto formato nel suo aspetto finale è quello che si vende nelle botteghe artigianali, generalmente mantenuto refrigerato e con un tempo di conservazione di un paio di giorni. Per

la grande distribuzione è, invece, necessario sottoporre il prodotto ad un trattamento in grado di ridurre la carica batterica, eliminare muffe e lieviti ed evitare la proliferazione dei microrganismi per tempi lunghi senza alterare le caratteristiche del prodotto appena formato. Tale trattamento è, per lo più, di tipo termico.

### 3.1.3 *Pastorizzazione*

La deperibilità di un alimento può avvenire più o meno velocemente, a seconda delle tante variabili intrinseche ed estrinseche all'alimento stesso, quali, ad esempio, lo stato fisico e la composizione chimica, gli effetti prodotti da agenti interni (enzimi presenti nell'alimento) ed esterni (calore, luce, ossigeno atmosferico, contaminazioni di varia natura ed origine).

Le paste alimentari ovviamente non fanno eccezione a questo principio generale: la tecnica dell'essiccazione consente di ottenere il risultato migliore per la loro stabilità nel tempo, però con una modifica sostanziale delle caratteristiche organolettiche originarie.

Per le paste fresche le tecniche di conservazione sono necessariamente diverse, subordinate all'esigenza di non modificare in modo significativo, o di non modificarla affatto, l'umidità originaria dell'impasto e degli eventuali ripieni.

La disponibilità di acqua nelle paste fresche favorisce in particolare l'attività microbica e, dunque, il verificarsi di quei fenomeni biochimici che provocano instabilità, progressiva alterazione del prodotto, fino alla perdita completa della sua commestibilità. Le tecniche di conservazione delle paste fresche sono, pertanto, mirate all'eliminazione, riduzione e/o inattivazione dei microrganismi presenti nel prodotto protagonisti dei fenomeni biochimici citati e, conseguentemente, della deperibilità del prodotto stesso.

Nel caso delle paste fresche, il principale elemento di rischio è rappresentato dai microrganismi patogeni che possono trovarsi già nelle materie prime e negli ingredienti utilizzati, oppure contaminare il prodotto durante le varie fasi della lavorazione.

In generale, nella pasta fresca il pH ha un valore compreso tra 5,6 e 6,2, mentre l'attività dell'acqua è compresa tra 0,92 e 0,95. Con questi valori e considerando che la temperatura di confezionamento e distribuzione è inferiore ai 6°C, il trattamento deve essere concentrato prevalentemente su lieviti e muffe; altri microrganismi patogeni sono quelli riconducibili agli ingredienti della pasta ed, eventualmente, del ripieno, quali *Staphilococcus aureus*, *Salmonella* spp, Clostridi, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*.

Lo *Staphilococcus aureus* e la *Salmonella* spp sono i due soli agenti microbici fino ad oggi coinvolti in episodi di intossicazione o di infezione alimentare legati al consumo di paste (Zardetto *et al.*, 1999).

Attualmente, in tutti i Paesi che hanno una legislazione specifica in materia di prodotti freschi, è vietato o severamente regolamentato l'uso di sostanze antimicrobiche o batteriostatiche; ciò vale, ovviamente, anche per le paste fresche.

La normativa italiana sulla pasta stabilisce che il prodotto fresco, posto in vendita in imballaggi preconfezionati, deve essere stato sottoposto "ad un trattamento termico equivalente almeno alla pastorizzazione". La norma, contenuta nell'articolo 9, comma 5/c del DPR 9 febbraio 2001 n.187, impone, dunque, a tutti i produttori di pasta fresca confezionata in atmosfera protettiva o sotto vuoto, come pure in atmosfera normale, di pastorizzare il prodotto. La norma citata non indica alcuna tecnica specifica di trattamento termico, lasciando al produttore libertà di scelta, purché il trattamento applicato "sia equivalente almeno alla pastorizzazione".

L'obiettivo primario della pastorizzazione è quello di distruggere le forme patogene e la maggior parte di quelle vegetative dei microrganismi presenti nell'alimento e disattivare gli enzimi, garantendo la sicurezza igienica alla pasta confezionata e determinando il tempo di conservabilità del prodotto.

Per pastorizzazione si intende, come noto, il procedimento basato sull'applicazione di calore, idoneo a distruggere o a ridurre a livelli compatibili con la sicurezza igienica ed alimentare, i microrganismi termolabili eventualmente presenti nel prodotto prima del trattamento stesso. La pastorizzazione è, dunque, fondamentalmente mirata alla sicurezza alimentare e, quindi, alla distruzione dei batteri che possono provocare patologie anche gravi consumando un prodotto fresco, ma è chiaro che essa agisce anche sui microrganismi che, pur non essendo pericolosi per la salute, possono renderlo particolarmente deperibile. In parole semplici, con la pastorizzazione si sanifica la pasta ed, al tempo stesso, se ne prolunga la conservabilità (Mondelli, 2008).

La pastorizzazione non è una pratica semplice, dato che, a seconda di come la si conduce, può avere conseguenze diverse sulle caratteristiche organolettiche, nutrizionali e commerciali del prodotto. Le modalità di applicazione del trattamento termico non possono essere generalizzate, dal momento che la categoria merceologica delle paste fresche comprende una gamma molto ampia di prodotti, differenziati non solo per forma e dimensione, ma anche e soprattutto per composizione e formulazione. Si deve tener conto che tutto ciò comporta, dal punto di vista della pastorizzazione, un insieme altrettanto ampio e differenziato di variabili intrinseche (stato fisico, composizione chimica, ecc.), alle quali vanno aggiunte anche quelle estrinseche (modalità di preparazione, ambiente di lavoro, ecc.) (Mondelli, 2003).

I vantaggi introdotti dalla pastorizzazione, abbinata al confezionamento in assenza di ossigeno ed alla commercializzazione con catena del freddo positivo, hanno consentito alla pasta fresca, deperibile per natura e per definizione, di conservarsi più o meno a lungo e di acquisire un contenuto di servizio specifico molto gradito al consumatore, assecondando così le esigenze della distribuzione commerciale che ne ha promosso e decretato il successo. Tutto ciò ha favorito enormemente la sua diffusione in aree di mercato molto più vaste rispetto ai limiti territoriali tradizionalmente legati alla localizzazione del pastificio.

La pasta fresca confezionata ha imparato a viaggiare anche su percorsi internazionali, ampliando i propri orizzonti ed i propri mercati.

Gli effetti positivi della pastorizzazione sono controbilanciati da quelli negativi che, ovviamente esistono, anche se la prevalenza dei primi è certamente cospicua, non solo nell'ottica generale della produzione e della distribuzione commerciale, ma anche in quella della sicurezza alimentare.

Si è via via affermato il criterio di una conservabilità della pasta fresca collegata al mantenimento il più possibile a lungo delle sue caratteristiche organolettiche originarie anche nella fase commerciale, piuttosto che ad una loro radicale alterazione già nella fase produttiva iniziale. Se il fresco non lo si può conservare, si può comunque rallentare il decadimento. Per garantire anche al prodotto pastorizzato le caratteristiche di qualità organolettica specifiche del prodotto fresco non trattato, si sono affinate le tecniche di trattamento termico e, soprattutto, si è accorciata la conservabilità media richiesta dal mercato per la pasta fresca confezionata. La stessa normativa italiana, d'altronde, ha fatto chiarezza distinguendo con confini ben definiti il prodotto confezionato fresco da quello confezionato stabilizzato (Mondelli, 2008).

Nella filiera della pasta è possibile fare ricorso a due tipi di pastorizzazione:

- prima pastorizzazione, effettuata sul prodotto sfuso;
- pastorizzazione finale, eseguita dopo il confezionamento, a cui segue il raffreddamento.

La prima pastorizzazione è stata inserita nella filiera della pasta con una funzione estetico-funzionale o di tipo tecnologico ed è, di norma, un "trattamento flash". Il calore sulla pasta provoca un incartamento superficiale e questo fa sì che, nelle operazioni successive alla formatura, si eviti che i pezzi del prodotto si incollino gli uni agli altri; inoltre, il calore determina una gelatinizzazione superficiale degli amidi con un effetto di lucidatura del prodotto. Questo processo termico, se raggiunge temperature letali per i microrganismi, svolge anche una sanificazione microbica.

La pastorizzazione finale, invece, è un vero e proprio trattamento termico con durata maggiore, che permette di inattivare tutte le forme vegetative (Tebaldi, 2001).

Da un punto di vista tecnologico ed in riferimento alla conservabilità si distinguono, dunque, due diverse linee di prodotto:

- paste con un singolo trattamento termico, realizzato solo sul prodotto “nudo”;
- paste con doppio trattamento termico del prodotto, effettuato sia sul prodotto “nudo” che sul prodotto confezionato.

La tecnologia del doppio trattamento termico della pasta, prima sul prodotto sfuso e poi sul prodotto confezionato, è stata istituzionalizzata principalmente per incrementare la shelf life del prodotto.

Questa tecnologia ha contraddistinto l'avvio della produzione industriale e semi-industriale della pasta fresca confezionata ed ha certamente consentito di superare l'ostacolo iniziale della conservabilità del prodotto, fornendo un contributo determinante per la sua affermazione commerciale in ambiti di mercato sempre più vasti; ma è altrettanto vero che ha determinato molto spesso distorsioni anche macroscopiche sia nella natura intrinseca del prodotto che nella sua legittimità commerciale. La conservabilità della pasta fresca è stata, infatti, considerata generalmente prerogativa vincente da parte della maggioranza dei produttori, anche a scapito della natura reale del prodotto, troppo spesso e con troppa disinvoltura trasformato da “fresco” a “precotto umido”.

L'elemento comune a tutte le formulazioni della pasta fresca è certamente l'impasto di semola e/o farina con acqua, con o senza uovo liquido aggiunto, impasto sia laminato che estruso o lavorato con altri criteri. Ed è proprio l'impasto, cioè la struttura fondamentale della pasta fresca, il componente più esposto e sensibile agli effetti della pastorizzazione.

Nella pastorizzazione della pasta fresca sono fondamentali due condizioni fisiche, sia nell'ambiente di trattamento che nel prodotto: temperatura ed umidità. Il calore umido è, infatti, molto più efficace del calore secco nella distruzione delle cellule microbiche. L'effetto congiunto calore-umidità determina la coagulazione delle componenti proteiche all'interno delle cellule microbiche, distruggendole. Più rapida è la penetrazione del calore nella pasta, migliore è il rapporto tra il danno termico inflitto ai microrganismi e l'effetto termico a carico del prodotto e non solo per quanto riguarda la sua componente proteica.

Diversi, invece, gli effetti della combinazione calore-umidità per quanto riguarda la componente glucidica dell'impasto, cioè gli amidi. In questo caso, l'applicazione del calore e la contemporanea disponibilità di acqua libera provocano un progressivo rigonfiamento dei granuli di amido, fino a determinarne un loro cambiamento di stato.

La struttura originaria dell'amido si modifica da cristallina a geliforme, con acquisizione di nuove proprietà di aggregazione e perdita di birifrangenza.

Questo fenomeno di cambiamento di stato dell'amido è definito "gelatinizzazione" e la sua stabilità non è assoluta (Mondelli, 2008).

Il tempo di trattamento di pastorizzazione è calcolato in funzione del tempo di riduzione decimale dei microrganismi che si vuole distruggere, oltre che, ovviamente, delle caratteristiche specifiche del prodotto trattato.

Rispetto alla pasta secca, la pasta fresca presenta il limite della deperibilità, dovuto alla presenza nel prodotto di acqua in quantità tale da favorire tutte le attività biochimiche e microbiologiche che ne determinano alterazioni progressive, compromettendo le sue proprietà organolettiche iniziali, fino al limite estremo della perdita di commestibilità.

#### ***3.1.4 Pre-essiccazione e raffreddamento***

Alla fase di prima pastorizzazione e di asciugatura (lì dove necessario) segue quella di pre-essiccazione.

Tale fase è finalizzata a:

- ridurre l' $a_w$  in modo da favorire un aumento della conservabilità del prodotto;
- determinare l'essiccazione della superficie del prodotto che consenta di evitare l'incollamento tra i diversi pezzi e crei una barriera con l'esterno;
- favorire le operazioni di pesatura.

La pre-essiccazione viene eseguita in macchine continue a tappeti, a temperature di 65-70°C, per il tempo necessario a ridurre l'umidità complessiva entro i limiti di legge e per un leggero incarto superficiale della sfoglia.

Alla fase di asciugatura segue quella del raffreddamento, che risulta importante in quanto influisce direttamente sulle caratteristiche microbiologiche del prodotto e sulla sua conservabilità. Affinché esso sia condotto in maniera corretta, deve consentire un passaggio quanto più rapido possibile dalle condizioni di temperatura critiche per lo sviluppo della carica batterica alle condizioni di sicurezza.

È, inoltre, importante che l'aria utilizzata venga filtrata per evitare ricontaminazione microbica e che investa il prodotto in modo omogeneo.

Se la tecnologia non prevede ulteriori trattamenti termici, il prodotto viene portato alla temperatura di 4°C prima del confezionamento, altrimenti, in caso di seconda pastorizzazione, viene portato a 15°C, temperatura di compromesso tra la sicurezza microbiologica ed i costi energetici del successivo trattamento termico.

### **3.1.5 Confezionamento, trattamento post-packaging e stoccaggio**

Il processo produttivo si conclude con il confezionamento ed il trattamento post-packaging (pastorizzazione e raffreddamento del prodotto confezionato).

Il confezionamento ha lo scopo di mantenere il prodotto isolato dall'ambiente esterno per il maggior tempo possibile, proteggendolo meccanicamente e consentendone la visione al potenziale acquirente.

Il Food Protection Committee della National Academy of Science indica come scopo primario del confezionamento la “protezione dalla contaminazione da parte di sporcizia, di materiali estranei, di insetti, di roditori, di microrganismi e della perdita o acquisto di umidità, odori e sapori” (Domenichini, 1996).

Il prodotto sfuso viene portato al confezionamento, raffreddato già nei limiti di sicurezza ed in tali limiti deve rimanere fino a confezionamento concluso.

La tipologia di confezionamento inizialmente adottata era il sottovuoto; ben presto, tuttavia, si è potuto notare che tale confezionamento causava deformazione della confezione del prodotto, motivo per il quale questa tipologia è stata abbandonata.

A partire dalla fine degli anni '70 e con massimo impulso negli anni '80 si sono sviluppate e perfezionate varie tecniche impiantistiche di conservazione della pasta fresca, in particolare nuovi sistemi di pastorizzazione, sia primaria che secondaria, e la sostituzione del sottovuoto con il confezionamento in atmosfera di gas inerti come azoto e CO<sub>2</sub>, la cosiddetta “atmosfera protettiva” (Castelvetri, 2005).

La tecnologia di confezionamento in atmosfera protettiva (MAP-Modified Atmosphere Packaging) si basa sulla sostituzione della miscela gassosa che circonda l'alimento all'interno della confezione con un altro gas (Zardetto, 2005).

Vengono utilizzate a tal fine speciali miscele di gas, contenenti prevalentemente azoto ed anidride carbonica. In particolare, l'anidride carbonica rappresenta il gas più importante all'interno delle miscele; essa svolge azione sia batteriostatica che fungistatica (Daniels *et al.*, 1985).

Il confezionamento in atmosfera protettiva prevede in sintesi:

- eliminazione o drastica riduzione dell'ossigeno ambientale, principale responsabile delle alterazioni;
- confezionamento in imballaggi adeguati a permeabilità nota (molto bassa all'ossigeno);
- conservazione dell'alimento a basse temperature (4-8°C).

I microrganismi inibiti dall'anidride carbonica sono, in primo luogo, le muffe, *Salmonella* spp ed i batteri aerobi, in particolare del genere *Pseudomonas* e *Bacillus*. Meno o poco inibiti sono, invece, i batteri lattici, mentre non sono inibiti i batteri Gram-positivi, per lo più anaerobi, come i Clostridi. Inoltre, il MAP non offre di per sé alcun effetto inibitorio nei confronti dei lieviti e dei patogeni più comuni e/o pericolosi, come, ad esempio, *Clostridium botulinum* e *Listeria*, nei confronti dei quali la protezione del prodotto deve essere ottenuta con altri fattori sinergici (temperatura, pH,  $a_w$ ).

A differenza del confezionamento sottovuoto, quello in atmosfera protettiva consente una migliore presentazione visiva del prodotto al consumatore, non essendovi alcun aspetto di "maltrattamento" o schiacciamento del prodotto oltre, naturalmente, alla possibilità di escludere dalla formulazione del prodotto additivi e conservanti.

Riassumendo, il confezionamento in atmosfera protettiva rappresenta la fase finale per la pasta pastorizzata e confezionata. L'atmosfera protettiva, sostituendo all'interno della confezione aria ed ossigeno a contatto con la pasta, produce chiari vantaggi in termini di mantenimento della freschezza del prodotto. Ha, inoltre, come noto, un effetto secondario che spesso è ancora più importante: inibisce lo sviluppo delle muffe. Le muffe, infatti, sono i ricontaminanti più probabili nel percorso dalla pastorizzazione al confezionamento. Per contro, è bene ricordare che, a differenza di quanto a volte ritenuto, l'atmosfera protettiva non ha influenza nel rallentamento delle cariche microbiche ed anzi può favorire lo sviluppo di sporigeni anaerobi stretti, quali i Clostridi solfito-riduttori (Castelvetri, 2005).

Il materiale di confezionamento deve essere robusto, resistente ad un eventuale trattamento termico successivo e, soprattutto, impermeabile all'umidità ed ai gas. Queste caratteristiche non si trovano in un unico materiale e per tale motivo si impiegano film multistrato. Bisogna, inoltre, tenere presente che durante la termoformatura il film può diventare molto sottile in alcune zone, creando punti più fragili e facilmente permeabili.

La pastorizzazione del prodotto confezionato ricalca il principio classico del trattamento finale di un prodotto in confezione ermetica, comune a molte conserve alimentari. Anche in questo caso valgono le criticità base previste per la pastorizzazione della pasta sfusa:

- raggiungimento di temperature efficaci nel punto più freddo della confezione;
- raffreddamento immediato rapido ed uniforme (Castelvetri, 2005).

La pastorizzazione finale avviene trattando le confezioni con aria calda alla temperatura di 92-95°C, in modo da portare il cuore del prodotto alla temperatura di 84°C, mantenendola per almeno 10-15 minuti. In un tempo analogo si provvede, poi, a riportare il prodotto a temperature di 10-15°C.

Il trattamento termico post-packaging può essere effettuato anche mediante l'impiego delle microonde.

L'azione delle microonde sviluppa calore direttamente nel prodotto trattato, in seguito agli attriti generati dal movimento oscillante delle molecole di acqua in esso presenti.

Per le paste fresche, che hanno mediamente un discreto contenuto d'acqua, il rendimento termico delle microonde è molto buono: in pochi secondi si possono, infatti, ottenere, sia alla superficie che all'interno del prodotto, temperature molto elevate, tali da provocare la distruzione dei microrganismi.

Il principale vantaggio di questa tecnica consiste proprio nel fatto che le microonde attraversano la pellicola della confezione, senza riscaldarla in quanto priva di acqua libera, raggiungono il prodotto all'interno della confezione, provocano l'oscillazione delle molecole di acqua libera e gli attriti di cui si è detto e generano calore direttamente nel prodotto stesso.

Questa tecnica, pertanto, consente di non alterare il film della confezione ed allo stesso tempo di generare calore nella pasta, pastorizzandola.

Un limite delle microonde, oltre al costo eccessivo sia dell'impianto che della sua gestione, è quello di risentire delle caratteristiche del prodotto, non solo chimico-fisiche, ma anche strutturali, come, ad esempio, la forma della pasta, lo stato della sua superficie e l'eterogeneità della stessa.

Le ultime fasi della produzione di pasta fresca prevedono l'introduzione delle confezioni in cartoni, successivamente trasferiti nelle celle frigorifere di stoccaggio, dove la temperatura deve essere mantenuta costantemente a  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$  (DPR 187/2001) per rallentare lo sviluppo della microflora sopravvissuta alla pastorizzazione durante la vita residua del prodotto.

La refrigerazione della pasta fresca è fondamentale per limitare la proliferazione microbica e le attività enzimatiche che, inevitabilmente, determinano la degradazione del prodotto, fino alla completa alterazione delle sue caratteristiche organolettiche.

Dal punto di vista commerciale, la refrigerazione della pasta fresca ha grande importanza perché ne prolunga non solo la durata, ma anche l'aspetto e la qualità organolettica originaria. Comunque, la refrigerazione da sola non sembra garantire la sicurezza delle paste fresche sia per l'emergenza di patogeni in grado di crescere a basse temperature (psicrofili) sia, più frequentemente, perché gli alimenti refrigerati vengono sottoposti a sbalzi di temperatura durante la commercializzazione mantenuta a temperature superiori a quelle previste. Si rende, dunque, necessaria l'associazione di più barriere, in modo che sia possibile prevenire la crescita di germi patogeni anche in condizioni di conservazione non ottimali (Lucisano, 1993).

In conclusione, possiamo dire che la produzione di pasta fresca confezionata avviene tramite una serie di processi complessi ed irti di criticità. Le criticità sono sostanzialmente univoche, ma molto influenzate dagli impianti utilizzati, dal loro assemblaggio in filiera e dalle caratteristiche chimico-fisiche del prodotto finale.

Le pastorizzazioni, il confezionamento in atmosfera protettiva, la bassa temperatura, sono le “risorse” disponibili con cui ottenere sicurezza sanitaria e la durata prevista. Queste ultime, tuttavia, saranno garantite se le predette risorse saranno correttamente gestite ed applicate (Castelvetri, 2005).

### ***3.2 Panificazione e tecnologia tradizionale di produzione del pane***

Nella tradizione gastronomica italiana, gli sfarinati di frumento possono essere utilizzati anche per la produzione di pane e di prodotti da forno lievitati. La legislazione italiana che regola il settore dei prodotti da forno (Legge 4 Luglio 1967, n.580 e successive modifiche; DPR 30 Novembre 1998 n.502) ha per lungo tempo riportato solo la definizione di pane, il prodotto più conosciuto e consumato di questa categoria merceologica, definendolo il prodotto ottenuto dalla cottura totale o parziale di una pasta convenientemente lievitata, preparata con sfarinati di grano, acqua e lievito, con o senza aggiunta di sale comune.

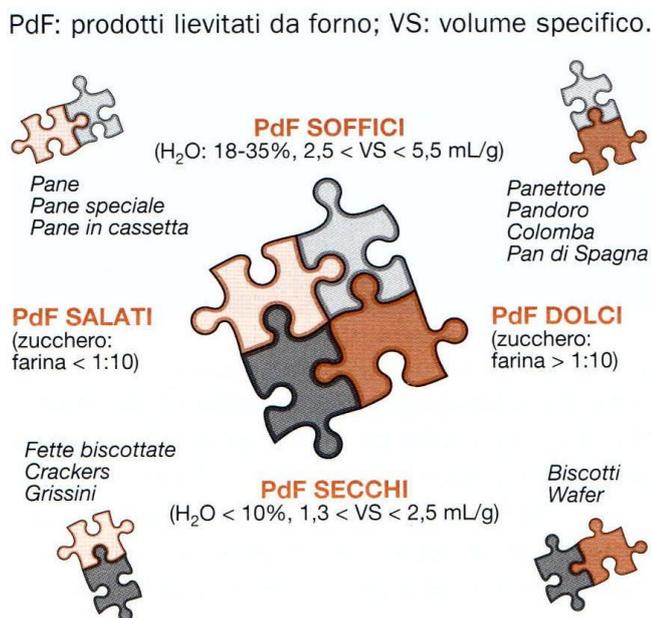
Solo nel 2005, è stata emanata una specifica normativa a tutela di alcune tra le più note specialità della tradizione dolciaria italiana, che disciplina sia la produzione che la vendita di questi prodotti da forno (Decreto 22 Luglio 2005; G.U. n.177, 1 Agosto 2005).

Il contenuto in acqua del pane a cottura completa, con la sola eccezione del pane prodotto con farina integrale, per il quale è consentito un aumento del 25%, è stabilito come appresso:

- pezzature sino a 70 grammi, massimo 29%;
- pezzature da 100 a 250 grammi, massimo 31%;
- pezzature da 300 a 500 grammi, massimo 34%;
- pezzature da 600 a 1.000 grammi, massimo 38%;
- pezzature oltre i 1.000 grammi, massimo 40%.

La classificazione dei prodotti da forno può seguire diversi criteri (Lucisano & Pagani, 1997). Una prima modalità, largamente utilizzata a livello merceologico ma non codificata da norme, discrimina i prodotti sulla base della loro formulazione, in particolare della presenza di zuccheri. Un secondo criterio di classificazione invece si basa sulla diversa consistenza dei prodotti lievitati da forno, facendo riferimento alla loro sofficietà/morbidezza o

friabilità/secchezza (Figura 3.2). La sofficità è strettamente connessa al volume specifico, mentre la morbidezza è correlata all'umidità.



**Figura 3.2.** Criteri di classificazione dei prodotti lievitati da forno

Sulla base di questi criteri di classificazione si possono dunque identificare quattro categorie di prodotti da forno (soffici, secchi, dolci, salati).

### **3.2.1 Processo produttivo di panificazione**

Il processo di panificazione è caratterizzato dalla semplicità degli ingredienti.

Molti tipi di pane, soprattutto se di piccole dimensioni (<200 g), sono generalmente caratterizzati da una shelf life limitata, generalmente non superiore alle 24 ore. Il veloce raffermaimento di questi prodotti è senza dubbio favorito anche dalla mancanza di confezionamento in materiali a forte barriera verso l'umidità, in quanto il 98-99% del pane commercializzato in Italia è venduto come prodotto sfuso. Un'ulteriore caratteristica che contraddistingue la quasi totalità del pane prodotto in Italia è rappresentata dall'assenza dello stampo in cui porre l'impasto per la lievitazione e cottura.

Il processo tecnologico di panificazione può essere schematizzato come una sequenza di operazioni che richiedono tempi lunghi e hanno l'obiettivo primario di aerare e rendere porosa la massa dell'impasto. Tutti le diverse tipologie di pane prodotte e consumate in Italia, sono caratterizzate da una particolare struttura fisica in cui è facile riconoscere una crosta molto

aromatica e generalmente croccante che racchiude la parte interna alveolata, generalmente morbida e soffice, a causa dell'elevata porosità.

Il diagramma di produzione del pane è schematizzato nella tabella 3.2 in cui sono riportate tutte le operazioni effettuate nel corso del processo produttivo, con gli obiettivi da raggiungere e le principali modificazioni indotte da ciascun passaggio tecnologico.

**Tabella 3.2.** Operazioni di panificazione: obiettivi e principali modificazioni indotte

| Operazione                     | Obiettivi   | Modificazioni  |
|--------------------------------|---|--|
| Impastamento                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- distribuire in modo omogeneo gli ingredienti (anche quelli presenti in piccola quantità)</li> <li>- formare una struttura uniforme e "coerente"</li> <li>- includere aria sotto forma di bolle</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- idratazione e solubilizzazione dei composti idrofili</li> <li>- formazione del glutine</li> </ul>   |
| Lievitazione/<br>fermentazione | <ul style="list-style-type: none"> <li>- aumentare il volume dell'impasto</li> <li>- produrre precursori e sviluppare caratteristiche aromatiche tipiche</li> <li>- migliorare le caratteristiche nutrizionali (<i>lievito naturale</i>)</li> <li>- migliorare la conservabilità microbiologica e chimico-fisica (<i>lievito naturale</i>)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- formazione di gas (CO<sub>2</sub>)</li> <li>- produzione di metaboliti della fermentazione che influenzano la solubilità/conformazione dei vari componenti e danno precursori dell'aroma</li> </ul>   |
| Formatura                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>- dare forma all'impasto</li> <li>- suddividere l'impasto a seconda delle pezzature finali</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- suddivisione delle bolle di gas e inclusione nuova aria</li> </ul>  |
| Cottura                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- diminuire il contenuto di acqua</li> <li>- stabilizzare l'impasto lievitato e formato</li> <li>- rendere l'impasto appetibile e digeribile</li> <li>- completare lo sviluppo in volume</li> <li>- dare al prodotto la tipica colorazione</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- aumento di volume a causa dell'evaporazione dei gas di fermentazione. Il 20-30% del volume si ottiene in fase di cottura (<i>oven-spring</i>)</li> <li>- differenziazione della crosta e della mollica</li> <li>- denaturazione delle proteine</li> <li>- gelatinizzazione dell'amido</li> <li>- sviluppo di aroma</li> <li>- evaporazione di acqua e di etanolo</li> </ul> |
| Raffreddamento                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>- permettere l'eventuale confezionamento del prodotto</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- cambiamento della solubilità degli zuccheri</li> <li>- solidificazione dei grassi</li> </ul>  |

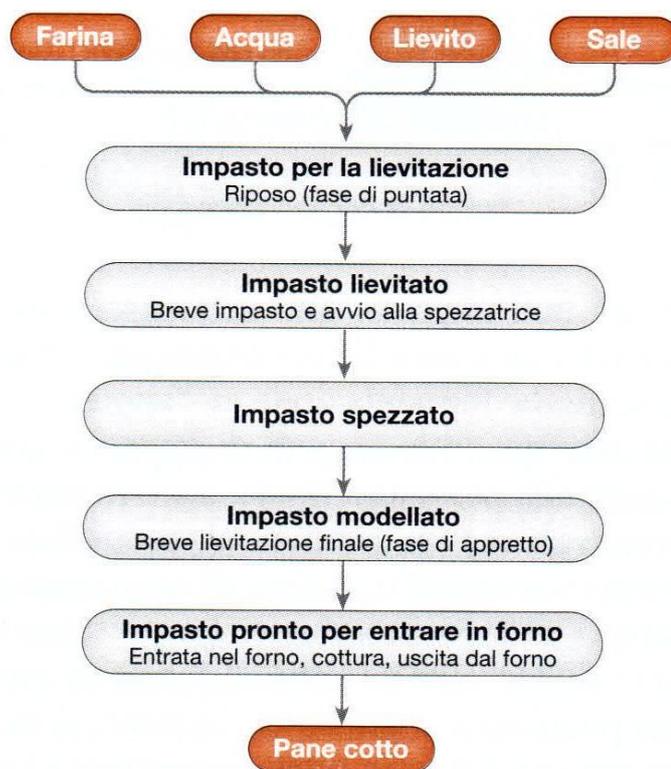
Tali fasi di produzione del pane possono essere effettuate mediante metodo continuo o con metodo discontinuo.

### 3.2.1.1 Processi discontinui (metodo diretto-indiretto)

La quasi totalità della produzione italiana di pane è un processo discontinuo in quanto le diverse fasi di impastamento, lievitazione/fermentazione e cottura sono condotte su quantità discrete di materiale e in impianti separati. I processi di panificazione possono essere

realizzati adottando il cosiddetto “metodo diretto”, oppure il “metodo indiretto” mediante biga.

Nel metodo diretto, il più rapido e semplice da gestire, tutti gli ingredienti sono miscelati contemporaneamente per formare l’impasto che viene fatto lievitare (Figura 3.3).



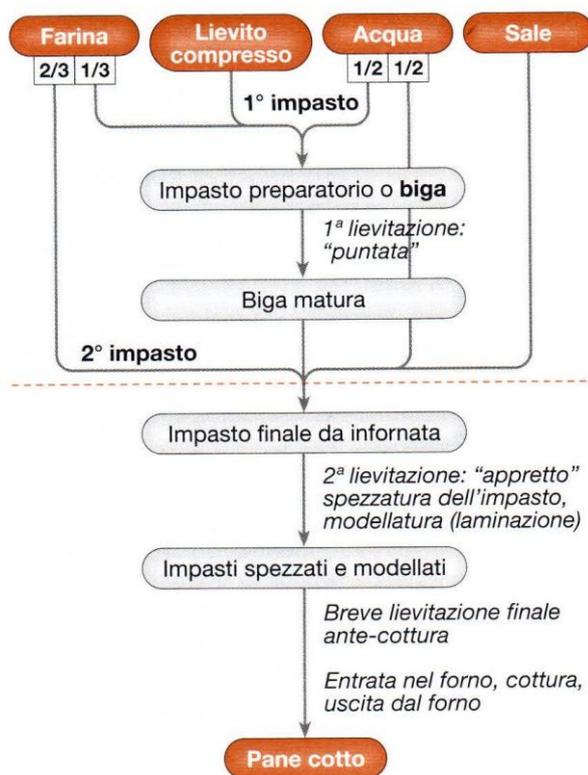
**Figura 3.3.** Diagramma di panificazione con metodo diretto

La fermentazione mediante lievito di birra deve essere comunque condotta in almeno due fasi. La prima lievitazione, denominata fase di puntata, è generalmente effettuata su quantitativi elevati di impasto, per tempi variabili a seconda del processo, da circa 30 minuti a 3 ore. L’obiettivo primario di questa operazione non è ottenere l’aumento di volume della massa, bensì quello di indurre importanti modificazioni delle proprietà reologiche dell’impasto (Chargelegue *et al.*, 1994).

La prima lievitazione porta ad una migliore lavorabilità dell’impasto, che acquisisce così la capacità di mantenere la forma assegnata durante la seconda fermentazione o “appretto”. In questa fase quantità discrete di impasto, corrispondenti alla pezzatura finale, sono mantenute per circa un’ora in condizioni controllate di temperatura e umidità al fine di raggiungere il massimo sviluppo in volume.

La presenza sul mercato di rilevanti quantità di farine di media qualità panificatoria giustifica, in parte, il ricorso sempre più diffuso a processi con metodo diretto. Il loro minor tempo di lievitazione permette, infatti, di ottenere prodotti accettabili anche da materie prime modeste, la cui standardizzazione è oggi possibile grazie ai numerosi preparati enzimatici e ai miglioratori disponibili per i panificatori.

Nel processo indiretto gli ingredienti sono aggiunti a più riprese, durante i cosiddetti rinfreschi dell'impasto (Pagani *et al.*, 2007). Nel caso di lavorazioni mediante lievito di birra, si parte da un impasto preparatorio, la biga, ottenuto miscelando il lievito compresso con una parte della farina e dell'acqua previste nella formulazione. Dopo un periodo di lievitazione di diverse ore (da 3-4 fino a 20 h), in funzione della tipologia di pane che si vuole produrre, si aggiunge la rimanente parte di farina e acqua e, eventualmente, gli altri ingredienti (Figura 3.4).



**Figura 3.4.** Diagramma di panificazione con metodo indiretto mediante biga

Durante la lunga sosta, definita “maturazione”, il lievito si adatta al sistema-impasto, raggiungendo così capacità fermentative ottimali nel momento in cui tutti gli ingredienti saranno aggiunti. Se la fermentazione è lunga (12-20 h) anche i batteri lattici endogeni della

farina possono sviluppare la fermentazione lattica. L'impasto finale è spezzato, modellato, lasciato ancora lievitare per circa un'ora e infine cotto.

I lunghi tempi di lievitazione necessari per ottenere la biga assicurano, nel prodotto finito, un'alveolatura caratterizzata da numerose bolle, alcune di dimensioni rilevanti (Brown, 1993). Questa organizzazione garantisce un'elevata sofficità, come indicato dalla bassa consistenza della mollica nel prodotto appena sfornato; inoltre questa proprietà è mantenuta per tempi più prolungati rispetto al prodotto ottenuto dalla stessa farina ma con metodo diretto (Fessas & Schiraldi, 1998).

### *3.2.1.2 Processi continui*

Si tratta di processi apparsi verso gli anni '50 in USA (Pylar, 1988), ma che non hanno applicazione nel nostro Paese. Le due tipologie più note sono il processo Do-Maker del 1954 e il processo Amflow, sviluppato nel 1960 dalla AMF Incorporated (Millar, 2003). L'affermazione di queste tecnologie risale, tuttavia, agli anni '70. Attualmente si stima che più del 60% del pane commercializzato negli Stati Uniti e in Gran Bretagna sia ottenuto con questa tecnologia. Rispetto alla lavorazione discontinua, il processo continuo è caratterizzato da una netta riduzione dei tempi di lavoro e manodopera, da una maggior compattezza delle apparecchiature e da una maggior costanza delle caratteristiche del prodotto (Pylar, 1988).

In breve, questi processi sono basati sulla possibilità di eliminare le lunghe fasi di lievitazione necessarie affinché il lievito di birra si adatti alla matrice farina, mediante l'impiego di colture di lievito, o preferenti, ottenute separatamente in fermentatori, in presenza o meno di piccole quantità di farina. Con particolari adattamenti tecnologici i processi in continuo sono in fase di applicazione per i processi di fermentazione mediante lievito naturale.

La successiva operazione di impastamento ad alta velocità, con l'aggiunta simultanea di tutti gli ingredienti della formulazione, permette di ottenere un discreto sviluppo del volume, anche in assenza dei lunghi tempi di lievitazione. L'intenso stress meccanico indotto con la fase di impastamento ad alta velocità può essere sopportato dall'impasto solo se la farina è addizionata di miglioranti con forte attività ossidante, alcuni dei quali vietati dalla nostra legislazione.

## ***Capitolo 4. Shelf life dei prodotti alimentari***

Come riportato in precedenza, un ruolo fondamentale delle sostanze fenoliche è rappresentato dalla loro attività antiossidante, che permette di ritardare significativamente o inibire l'ossidazione di un substrato. L'ossidazione può produrre radicali liberi, responsabili dell'avvio di una reazione a catena che danneggia la funzionalità delle cellule; gli antiossidanti terminano queste reazioni intervenendo sui radicali intermedi ed inibendo le successive reazioni di ossidazione facendo ossidare se stessi.

Per questi motivi tali sostanze vengono utilizzate nella produzione di un alimento, per estenderne la shelf life ed allungarne quindi il periodo di conservazione.

La shelf life di un prodotto può essere definita generalmente come il periodo di tempo successivo alla raccolta, produzione o trasformazione, oltre il quale un alimento mantiene la qualità richiesta. Alla fine della sua vita commerciale, il prodotto sarà giudicato inaccettabile per la vendita o il consumo in base a criteri di qualità sensoriale, nutrizionale, o microbiologica. Modificazioni della composizione e della forma del prodotto alimentare, l'ambiente a cui è esposto, o il sistema di confezionamento può portare ad alterazioni della shelf life.

Essa non corrisponde obbligatoriamente alla reale vita del prodotto, perché la perdita di alcune caratteristiche (in particolare quelle organolettiche) corrisponde con la fine della commerciabilità di un prodotto (per esempio la "presa di massa" dello zucchero, la perdita di croccantezza di un prodotto secco, modificazioni di colore, sapore o odore, il deterioramento dell'imballaggio) ma non necessariamente alla perdita delle caratteristiche merceologiche fondamentali o di quelle igieniche di sicurezza o, ancora, di efficacia nutrizionale di un prodotto alimentare.

La shelf life di un prodotto alimentare infatti è un concetto complesso che dipende dalla natura del prodotto alimentare in esame, dalle tecnologie di conservazione applicate, dalla capacità di assorbimento di acqua, dal packaging e dalle condizioni ambientali a cui il prodotto alimentare è esposto.

Approcci specifici per le procedure di previsione della shelf life sono stati descritti a fondo da numerosi autori. In generale, l'approccio chiave ai test è in primo luogo quello di identificare le modalità ed i meccanismi di deterioramento per un prodotto. La previsione della shelf life diventa molto complessa quando un sistema alimentare ha varie cause di deterioramento, che possono avere ciascuna una propria sensibilità alla temperatura.

Tuttavia, la shelf life ad una data temperatura sarà determinata dal meccanismo che procede più rapidamente rispetto agli altri, causandone la riduzione del tempo di conservazione. Approcci tradizionali ai test di shelf life generalmente prevedono test in cui i prodotti sono mantenuti in condizioni controllate (temperatura e umidità relativa specifica) o non controllate (cioè di magazzino).

Tuttavia, una sopravvalutazione della shelf life è probabile quando solo alcuni degli agenti che un prodotto può incontrare durante la distribuzione siano presi in considerazione. Le condizioni ambientali possono anche accelerare un fattore noto in modo tale che il prodotto si deteriora più velocemente rispetto al normale.

La shelf-life di un alimento, intesa come tempo limite per il suo consumo mantenendo una qualità sensoriale e nutrizionale accettabile (o secondo un determinato livello di qualità), può quindi essere influenzata da molti fattori, i quali possono venir categorizzati in fattori intrinseci ed estrinseci.

I fattori intrinseci si riferiscono alle proprietà del prodotto finale ed includono i seguenti parametri (Kilcast & Subramaniam, 2000):

- Attività dell'acqua ( $a_w$ ) e assorbimento di acqua;
- pH e acidità totale;
- Potenziale di ossidoriduzione (Eh);
- Ossigeno disponibile;
- Nutrienti;
- Microflora naturale e microrganismi sopravvissuti a trattamenti sanificanti parziali;
- Enzimi e reagenti presenti nel prodotto o nella formulazione;
- Uso di elementi di stabilizzazione (antimicrobici, elementi compositivi come ad esempio sali e umettanti) utilizzati nella formulazione/trattamento;

I fattori intrinseci sono influenzati da variabili come il tipo di materie prime, la formulazione del prodotto e la sua struttura.

I fattori estrinseci invece sono quelli che il prodotto finale incontra in fase di processo o in post produzione, come i seguenti parametri:

- Profili tempo-temperatura durante il processo;
- Pressione nello spazio di testa dell'alimento confezionato;
- Umidità relativa (% U.R.) durante il processo, lo stoccaggio e la distribuzione;
- Esposizione alla luce (UV o IR) nel corso del processo, dello stoccaggio e della distribuzione;

- Presenza di microrganismi nell'ambiente durante il processo, lo stoccaggio e la distribuzione;
- Composizione dell'atmosfera nell'imballaggio e sua evoluzione nel corso dello stoccaggio e distribuzione;
- Trattamenti termici seguenti il processo (come rinvenimenti o cottura prima del consumo) e relativi profili tempo-temperatura fino al consumo;
- Manipolazione da parte del consumatore.

Tutti i fattori citati possono operare in modo interattivo e spesso imprevedibile e quindi la possibilità di interazione (in modo da individuare fattori/ostacoli sinergici o addizionali) deve essere studiata.

Un parametro di fondamentale importanza che influenza la shelf life dei prodotti alimentari è la capacità di assorbimento di acqua durante la loro conservazione. La perdita di qualità a causa dell'assorbimento di umidità è la causa principale del rifiuto di un prodotto da parte dei consumatori (Katz & Labuza, 1981). Le conseguenze di uno scambio di umidità tra il prodotto e l'ambiente esterno, sono sempre molto importanti per la conservazione della qualità di un prodotto, sia in caso di perdita di umidità che in caso di idratazione.

Le proprietà di assorbimento di umidità dei cibi sono fondamentali per la loro stabilità. Ciò è particolarmente vero per prodotti da forno secchi come biscotti o cracker che sono vulnerabili ad uno shock termico o di umidità. Questi prodotti possono assumere una grande quantità di acqua, diventando molli e friabili rendendoli quindi non più commercializzabili.

Anche la temperatura gioca un ruolo importante per il mantenimento della shelf life di un prodotto ed è strettamente collegata all'assorbimento di acqua. Come regola generale, la quantità di acqua adsorbita si riduce ad una costante attività d'acqua quando la temperatura è aumentata.

Questa tendenza può essere spiegata usando l'equazione dell'energia libera di Gibbs:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

- dove:
- $\Delta G$  è la variazione dell'energia libera;
  - $\Delta H$  è la variazione dell'entalpia;
  - $T$  è la temperatura;
  - $\Delta S$  è la variazione dell'entropia.

Poiché l'adsorbimento è un fenomeno spontaneo,  $\Delta G$  è negativo e l'acqua adsorbita è meno libera di scappare nell'atmosfera, il che implica  $\Delta S < 0$ , allora,  $\Delta H < 0$ . Un aumento di

temperatura quindi non è favorevole all'adsorbimento di acqua. Questa regola prevede delle eccezioni come nel caso di piccoli zuccheri che diventano più igroscopici quando la temperatura è aumentata.

Un'altra considerazione da tener presente è che in campo alimentare la maggior parte degli alimenti prodotti sono rappresentati da sistemi multifase. Per sistema alimentare multifasico viene inteso un sistema in cui sono presenti due o più regioni distinte, caratterizzate da diverso contenuto in acqua.

I prodotti alimentari multifasici sono sistemi dinamici: il guadagno o la perdita di umidità da un dominio all'altro si verifica in continuazione fino a quando l'equilibrio termodinamico tra i componenti alimentari e il gas circostante è raggiunto (Labuza & Hyman, 1998). Fenomeni di migrazione dell'acqua e il cambiamento del contenuto di umidità nei prodotti alimentari influenzano la shelf life attraverso modificazioni indesiderate delle loro caratteristiche fisiche, sensoriali e microbiche di qualità.

Se tali sistemi possiedono nelle condizioni iniziali (nel momento in cui sono preparati) differenti valori di potenziale chimico e quindi di attività dell'acqua, andranno incontro nel tempo a cambiamenti del contenuto di umidità fino al raggiungimento dell'equilibrio, per migrazione di acqua dalla regione a maggior potenziale chimico a quella che presenta un valore inferiore o minore del contenuto in acqua.

Idealmente, lo sviluppo di un prodotto alimentare dovrebbe considerare il valore di umidità tale da ottenere un prodotto sicuro, con una shelf life ottimale (Fu & Labuza, 1993). Il controllo del contenuto iniziale di umidità e delle migrazioni di umidità è un aspetto critico nel determinare la sicurezza di un prodotto alimentare.

Cambiamenti nel contenuto di umidità di un prodotto alimentare conducono a:

- Modificazione della consistenza del prodotto;
- Diversa velocità di crescita microbica;
- Variazione della velocità delle reazioni di degradazione;
- Cambiamenti al livello organolettico.

L'assorbimento di acqua quindi determina, oltre alla parziale perdita delle qualità organolettiche, un aumento dell'attività microbica con maggiori rischi di reazioni anomale che possono portare alla produzione di sostanze indesiderate.

Di fondamentale importanza quindi per il mantenimento della stabilità, è il contenuto di "acqua libera" presente all'interno del prodotto alimentare espressa come attività dell'acqua.

Con il termine di acqua libera ci si riferisce a quella parte di acqua, contenuta nell'alimento, non impegnata in legami con altre molecole e trattenuta negli spazi interstiziali solamente grazie alla tensione superficiale.

Tali molecole, nonostante diano origine, insieme a tutte le altre, ad un impasto eterogeneo, hanno un comportamento molto prossimo a quello di molecole di acqua pura e costituiscono il substrato ideale per la proliferazione dei microrganismi specie le muffe dei generi *Penillium* e *Aspergillus*. Il contenuto di acqua "libera", espresso come attività dell'acqua può essere calcolato dalla formula:

$$a_w = \frac{P_v}{P^*}$$

dove:

- $p_v$  è la tensione di vapore dell'acqua all'interno dell'alimento;
- $P^*$  è la tensione di vapore dell'acqua pura alla stessa temperatura;

È allora evidente che quanto più elevato è il valore di  $a_w$  tanto più sarà favorito lo sviluppo dei microrganismi e come sia, pertanto, necessario adottare opportune strategie per contenere  $a_w$  entro intervalli che limitino tale possibilità.

Un'attività dell'acqua ( $a_w$ ) superiore a 0,35-0,5 (Hsieh *et al.*, 1990; Katz & Labuza, 1981; Li *et al.*, 1998;. Van Hecke *et al.*, 1998) o un contenuto di umidità di circa 8 al 12% (Roudaut *et al.*, 1998) è considerata una soglia critica negli alimenti a base di cereali oltre la quale le loro proprietà acustiche, meccaniche e sensoriali vengono alterate.

Da quanto detto quindi, si può affermare che svariati fattori influenzano il grado e la velocità della migrazione dell'umidità in un alimento. Per il controllo di questa migrazione e quindi per inibire il cambiamento di umidità, possono essere utilizzati, diversi principi tra cui, l'applicazione di un film edibile tra i diversi domini, la modificazione dell'attività dell'acqua utilizzando degli ingredienti, oppure cambiando l'effettiva diffusività dell'acqua modificando la viscosità e quindi la mobilità molecolare.

I fattori critici che influenzano le migrazioni di umidità tra regioni a diversa attività dell'acqua, di un sistema alimentare, coinvolgono i seguenti aspetti:

- Termodinamici
- Strutturali
- Dinamici

- **Aspetto termodinamico**: la forza che guida le migrazioni di acqua è descritta dal valore della differenza di attività dell'acqua tra le regioni coinvolte, direttamente correlata alla differenza di potenziale chimico. Questo suggerisce un approccio per prevenire le migrazioni di acqua, eliminando le differenze di attività dell'acqua tra le diverse regioni che costituiscono un sistema alimentare.

- **Aspetto strutturale**: in questo caso vengono considerati alcune caratteristiche fisiche, del sistema alimentare, come ad esempio la distanza tra le regioni e le possibili limitazioni alla diffusione, dovute alle dimensioni dei pori.

- **Aspetto dinamico**: la velocità di diffusione e la velocità di reazione dipende dalla scala temporale di osservazione.

Come detto in precedenza, una delle strategie più comunemente utilizzate al fine di contenere l'assorbimento di acqua da parte dei prodotti alimentari nel corso della conservazione è il confezionamento ed in particolare il tipo di packaging utilizzato a tale scopo.

Il packaging svolge spesso un ruolo chiave nel mantenimento della qualità e della shelf life degli alimenti che funge da parte integrante del sistema di conservazione utilizzato. Garantire prodotti di qualità elevata è essenziale per la soddisfazione del consumatore e la qualità può dipendere fortemente dalle prestazioni del packaging.

Di solito, quando i prodotti sono confezionati, l'attività dell'acqua all'interno della confezione è generalmente la più bassa possibile. In seguito, durante la distribuzione e lo stoccaggio del prodotto, a causa della differenza tra l'attività dell'acqua all'interno e all'esterno della confezione, le molecole di acqua penetrano attraverso l'imballaggio portando ad un aumento dell'attività dell'acqua interna. Questo provoca un aumento del contenuto d'acqua del prodotto e di conseguenza una diminuzione della sua qualità.

Il coefficiente di permeabilità della confezione generalmente, non dipende dal livello di umidità all'interno e all'esterno di essa. Questo è vero per la maggior parte dei film (generalmente strutture multistrato) destinati ad applicazioni di imballaggio. Tuttavia, quando il film multistrato include un polimero moderatamente idrofilo (quali poliammidi o cellophane), è stato dimostrato che le proprietà di barriera all'acqua della confezione dipendono dall'attività dell'acqua dentro e fuori del film (Hernandez, 1994).

Funzionalmente, il packaging è stato progettato per contenere e proteggere gli alimenti, fornendo un valore aggiunto per i consumatori. Nel mercato al dettaglio di oggi, l'imballaggio è un importante veicolo di comunicazione verso i consumatori. Nuovi sviluppi nei materiali di imballaggio e nelle tecnologie di lavorazione hanno creato il potenziale per nuovi prodotti

alimentari in grado di fornire maggiore shelf life rispetto ai tradizionali prodotti alimentari freschi.

Il materiale di imballaggio e la sua preparazione quindi possono fare molto per evitare fenomeni indesiderati e prolungare la vita del prodotto, impedendo gli scambi di umidità (in ingresso ed in uscita).

Con poche eccezioni, la qualità degli alimenti si riduce con il tempo di conservazione, indipendentemente dai metodi di conservazione impiegati e dal controllo delle condizioni di conservazione, anche per gli alimenti congelati. Cambiamenti di qualità indesiderati che si verificano durante la conservazione possono influenzare consistenza, sapore, colore, aspetto generale, valore nutritivo e la sicurezza dei prodotti alimentari. Tuttavia, il tasso e la grandezza di molti di questi cambiamenti di qualità può essere minimizzato con sistemi di confezionamento adatti, progettati per il controllo dei maggiori fattori deteriorativi, vale a dire, umidità, ossigeno, luce, temperatura e il trasferimento di aromi.

Un'importante considerazione sul packaging negli studi di shelf life sono i cambiamenti che avvengono nell'effetto barriera dei materiali di imballaggio in plastica a causa di elevate temperature e umidità relativa. I cambiamenti nelle caratteristiche di barriera, come ad esempio un aumento della permeabilità all'ossigeno, potrebbero avere un'influenza sostanziale sulla shelf life di alcuni prodotti confezionati.

La stabilità del prodotto durante la distribuzione è influenzata anche dal mantenimento dell'integrità della confezione. Vibrazioni ed urti durante il trasporto e la manipolazione possono causare rottura per flessione delle confezioni di plastica e la perdita dell'effetto barriera dei materiali, provocando un aumento delle reazioni di degradazione ed una maggiore esposizione alla perdita delle sue caratteristiche sensoriali.

Altro fattore di fondamentale importanza nella determinazione della shelf life, correlato anch'esso al contenuto di umidità presente nell'alimento, è la crescita di microrganismi indesiderati che possono modificarne le caratteristiche organolettiche e provocare l'insorgenza di sostanze sgradevoli che vanno ad alterare l'odore, il colore ed il sapore dell'alimento fino a renderlo non più commestibile.

Tra questi i più diffusi sono quelli appartenenti alle famiglie Klebsiella, Micrococcus, Enterobacter, Escherichia, Pseudomonas, Aeromonas, Chromobacterium, Proteus, Flavobacterium, lieviti e muffe dei generi Aspergillus, Penicillium, Rhizopus, Botrytis, Fusarium.

Un altro problema chiave, associato alla perdita di qualità, che va ad influenzare la shelf life è rappresentato dall'ossidazione della componente lipidica presente nell'alimento.

L'ossidazione lipidica è un processo attraverso il quale l'ossigeno reagisce con molecole lipidiche insature presenti nell'alimento. Questo processo quindi è strettamente correlato alla presenza di ossigeno disponibile per innescare tali trasformazioni, infatti un elevato livello di ossigeno disponibile può facilitare la possibilità di alterazioni in seguito a tale processo. Sebbene l'ossidazione lipidica è termodinamicamente favorita, la reazione tra l'ossigeno e le molecole lipidiche insature è ostacolata cineticamente.

Quindi per l'attivazione di questa reazione è necessario l'innescamento di reazioni a catena che portano alla formazione di radicali liberi, tali reazioni sono promosse da un certo numero di meccanismi che includono la produzione di ossigeno singoletto, la sintesi enzimatica e non enzimatica di specie dell'ossigeno parzialmente ridotte o libere (ad es. perossido di idrogeno, idrossi- radicali).

La complessità del processo di ossidazione comporta la produzione di tutta una serie di possibili sostanze la cui concentrazione e tipologia variano a seconda delle reazioni che entrano in gioco durante il processo. Il risultato netto dell'azione dell'ossigeno sui lipidi è la produzione di idroperossidi lipidici che reagiscono ulteriormente per generare componenti volatili ad alto peso molecolare, come aldeidi e chetoni, che conferiscono un odore ed un sapore sgradevole all'alimento rendendolo inaccettabile da parte del consumatore.

Questa brusca modificazione delle caratteristiche organolettiche è definita con il termine di rancidità. La sensazione dello stato di rancidità è una misura soggettiva della qualità di un alimento, infatti una persona potrebbe definire un prodotto sgradevole per i suoi gusti mentre per altri lo stesso prodotto può essere considerato accettabile. Tali differenze nella percezione delle sensazioni organolettiche possono derivare dalla propria cultura culinaria, dall'età, dalla variazione genetica individuale o da diversi altri fattori.

Pertanto si è riscontrata l'esigenza di poter misurare la rancidità in maniera oggettiva attraverso un metodo analitico in grado di fornire risultati precisi ed attendibili, eliminando così i possibili errori soggettivi riscontrati in passato. Nel corso degli anni quindi sono stati messi a punto tutta una serie di tecniche e di strumenti utili alla definizione dell'effettivo grado di rancidità delle sostanze grasse presenti all'interno di un alimento e stabilire l'origine di tale fenomeno.

Pertanto risulta fondamentale ridurre al minimo i rischi di ossidazione lipidica nel corso della conservazione al fine di evitare una perdita di qualità dell'alimento garantendone una shelf life prolungata nel tempo. Tutti i fattori sopra citati quindi concorrono simultaneamente alla determinazione della shelf life di un prodotto alimentare, influenzandola e definendone la durata.

## ***Capitolo 5. Materiale e Metodi***

### ***5.1 Campionamento***

Il campione di germe di grano è stato fornito dalla F. Divella S.p.A, Rutigliano (BA).

### ***5.2 Trattamento del campione***

Il campione tal quale (Figura 5.1) è stato suddiviso in diverse aliquote ed è stato conservato sottovuoto ad una temperatura di 4°C al riparo da fonti di luce e di volta in volta macinato per effettuare le diverse analisi. La macinazione è stata effettuata con un macinino da laboratorio dotato di un sistema di raffreddamento ad acqua (IKA A10-IKAWERKE GmbH &CO. KG. Staufen, Germania) al fine di evitare che ci sia un innalzamento della temperatura del campione che potrebbe provocarne una sua alterazione.



**Figura 5.1.** Germe di grano oggetto di analisi

### ***5.3 Caratterizzazione chimica del germe di frumento***

#### ***5.3.1 Determinazione del contenuto di umidità (G.U.R.I. del 21/06/1985 n.145)***

In un pesafiltro precedentemente condizionato in stufa a 130°C, è stato pesato esattamente circa 1g di campione macinato. Successivamente i pesafiltri sono stati inseriti in stufa termostata a 130°C per 90 minuti. Al termine dei 90 minuti il campione è stato estratto dalla stufa e collocato in un essiccatore. Infine, una volta raffreddato il campione, si è proceduti con la misurazione delle peso mediante bilancia analitica e al calcolo dell'umidità.

### **5.3.2 Determinazione del contenuto di ceneri (Metodo ICC 104/1-1995)**

Il contenuto in ceneri di un campione rappresenta la quantità di costituenti minerali che residuano dopo la carbonizzazione e la calcinazione di una matrice alimentare.

È ottenuta mediante carbonizzazione e successiva calcinazione del campione posto in muffola a 525°C per tutta la notte, fino all'ottenimento di un residuo bianco.

In questo caso sono stati pesati 0,5g di campione all'interno di crogiuoli in porcellana precedentemente condizionati in muffola a 525°C per un'ora. In seguito il campione è stato carbonizzato bagnandolo con alcol etilico assoluto e bruciandolo con una fiamma prima di essere posto per una notte in muffola a 525°C.

Successivamente il campione è stato messo a raffreddare in essiccatore e in caso di un residuo bianco si è proceduto alla registrazione del peso finale, mentre nel caso in cui il residuo presentasse ancora una colorazione scura si è effettuata un'ulteriore calcinazione in muffola per una notte pretrattando il campione con acqua ossigenata.

### **5.3.3 Determinazione del contenuto di proteine (Metodo G.U.R.I. del 10/08/1994 n. 114 supplemento n. 4)**

La determinazione è stata eseguita con il metodo Kjeldhal che prevede tre fasi: la mineralizzazione, la distillazione ed infine la titolazione.

Si è posto circa esattamente 0,5 g di campione all'interno di tubi di mineralizzazione in vetro.

Il campione viene sottoposto a mineralizzazione con acido solforico concentrato, in presenza di solfato di rame (catalizzatore). Durante tale fase l'azoto organico, presente nel campione, viene trasformato in azoto inorganico come solfato di ammonio. Successivamente il campione è stato sottoposto a distillazione in corrente di vapore in presenza di idrossido di sodio al 40%, ottenendo la liberazione dell'ammoniaca dal solfato in rame. L'ammoniaca viene raccolta in acido borico, ottenendo borato d'ammonio.

Successivamente l'azoto ammoniacale viene titolato con acido solforico 0,1 N.

Il contenuto di azoto proteico si ottiene moltiplicando l'azoto totale per un fattore di conversione pari a 5,70 per semole e farine e 6,25 per un alimento in generale.

### **5.3.4 Determinazione del contenuto in grasso**

Per la determinazione del contenuto in grassi del campione è stato utilizzato sia il metodo dell'idrolisi acida modificata (Caboni *et. al.*, 2000) che il metodo Soxhlet.

L'idrolisi acida modificata prevede rispetto al metodo ufficiale (Metodo G.U.R.I. del 10/08/1994 supplemento n. 4) la sostituzione dell'alcol etilico con acqua distillata, sia nella fase di idrolisi che nella fase di estrazione.

In un apposito tubo munito di tappo a vite, sono stati pesati 6 g di campione macinato e ad esso è stato aggiunto 6 mL di acqua distillata e 30 mL di acido cloridrico al 25%, i tubi sono stati poi posti a bagnomaria alla temperatura di 70-80°C per 30 minuti fino a completa idrolisi della matrice organica. Trascorso il tempo di idrolisi i tubi sono stati lasciati a raffreddare in un bagno di ghiaccio e successivamente sono stati aggiunti 10 mL di acqua distillata e 25 mL di etere etilico. La soluzione ottenuta è stata agitata per un minuto e in seguito si è andati ad aggiungere 25 mL di etere di petrolio agitando nuovamente per un minuto. Quindi con una pipetta pasteur una volta effettuata la separazione delle due fasi si è andati a recuperare la frazione eterea (fase superiore) e si è trasferita in un pallone precedentemente condizionato e pesato; è stata poi ripetuta l'estrazione con 25 mL della miscela etere etilico-etere di petrolio 1:1 (v:v) andando a recuperare nuovamente la frazione eterea. Infine sono stati aggiunti altri 25 mL di miscela etere etilico-etere di petrolio 1:1 (v:v) alla soluzione che è stata poi agitata per un minuto e filtrata mediante imbuto Buchner provvisto di carta da filtro Whatman n. 5 e la fase liquida è stata posta all'interno di un imbuto separatore da 250 mL. La fase eterea ottenuta è stata poi trasferita nel pallone dal quale è stato poi allontanato il solvente attraverso un evaporatore rotante in bagnomaria a 40 °C sottovuoto. Il pallone quindi è stato posto in stufa da vuoto a 105°C per 60 minuti al fine di allontanare l'umidità in essa presente, poi raffreddato in essiccatore e quindi pesato con bilancia analitica.

#### *5.3.4.1 Determinazione del contenuto in grasso mediante metodo Soxhlet*

Per la determinazione del contenuto in grasso mediante metodo Soxhlet è stato utilizzato il metodo NGD B4 1976. L'analisi è stata effettuata su 10 g di campione finemente macinato, miscelati con solfato di sodio anidro in modo da ottenere un miscuglio omogeneo che viene posto in un ditale di cellulosa.

Il ditale è stato introdotto nel corpo estrattore del Soxhlet alla cui base è stato sistemato il pallone di vetro da 250 mL, pesato in precedenza. Dall'alto del corpo estrattore, è stato aggiunto etere di petrolio in quantità tale da provocare il sifonamento. Si è andati quindi a regolare il riscaldamento del bagnomaria in modo da provocare un sifonamento ogni 15 minuti per 8 ore.

Terminata la fase di estrazione, il solvente è stato allontanato mediante ausilio dell'evaporatore rotante e il pallone è stato posto in stufa per 1 ora a 105 °C, raffreddato in essiccatore e pesato.

#### *5.3.4.2 Estrazione della frazione lipidica mediante metodo Folch*

Un'altra estrazione dei lipidi è stata effettuata con il metodo messo a punto da Folch (Folch *et al.*, 1957) con alcune modifiche. Tale determinazione è utile sia per determinare il contenuto di lipidi totali presenti all'interno del campione e sia come analisi preliminare per la determinazione degli acidi grassi mediante corsa gascromatografica.

Al campione di germe macinato (15 g) sono stati addizionati 200 mL di una miscela solvente costituita da cloroformio:metanolo 1:1 (v/v), il tutto è stato omogeneizzato per 2 minuti. Ciascuna bottiglia chiusa, è stata posta in stufa a 60 °C per 20 minuti. Successivamente sono stati aggiunti 100 mL di cloroformio; il campione è stato nuovamente omogeneizzato per 1 minuto e filtrato con imbuto Buchner su carta da filtro, sfruttando il vuoto della pompa ad acqua.

Il filtrato è stato raccolto in una beuta codata e trasferito in un'altra bottiglia dove sono stati aggiunti 50 mL di KCl 1M e in seguito conservato in frigo per una notte. Il mattino successivo il contenuto della bottiglia è stato trasferito con delicatezza in un imbuto separatore, per fare separare le due fasi. La frazione organica è stata trasferita in un pallone in precedenza tarato e il solvente è stato allontanato mediante un evaporatore rotante sotto vuoto. Il grasso ottenuto è stato ripreso con 10 mL di una miscela esano:isopropanolo 4:1 (v/v), e conservato in freezer fino al momento dell'analisi.

### ***5.4 Preparazione degli esteri metilici e analisi gas cromatografica degli acidi grassi***

Per la valutazione degli acidi grassi è stato necessario trasformare i composti di interesse ai corrispondenti metili. La transmetilazione alcalina (G.U.R.I n. 198 del 21/7/1981) è stata realizzata mediante trattamento di 10-15mg di grasso estratto, posto in una provetta a fondo conico essiccato sotto flusso di azoto, con 50 µL di soluzione di KOH 2N in metanolo e successiva solubilizzazione dei metil derivati con esano. Si è quindi proceduto al prelievo di un'aliquota della fase esanica che è stata iniettata nel gascromatografo (1 µL).

L'analisi cromatografia è stata realizzata mediante GC (Clarus 500 Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), dotato di rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID). Di seguito sono riportate le condizioni operative adottate:

- colonna capillare in silice fusa Rtx 2330 rivestita di fase stazionaria polare di 10%fenil-cianopropil-polisilossano-90%dicianopropil (Restek-Bellefonte PA, USA), lunghezza 30 m, 0,25 mm ID, 0,2 µm df;
- temperatura del forno: da 120 °C a 230 °C con un incremento di temperatura di 5 °C al min;
- temperatura iniettore e rivelatore 240 °C;
- flusso del carrier gas (He): 2mL/min.

L'identificazione degli acidi grassi è stata effettuata mediante confronto dei tempi di ritenzione dei composti rivelati con quelli di una miscela standard di acidi grassi. Per la quantificazione degli acidi grassi è stato utilizzato l'acido tridecanoico (C 13:0) come standard interno.

### ***5.5 Valutazione dello stato di ossidazione: Determinazione del numero di perossidi***

Il metodo consiste nel valutare il contenuto dei prodotti primari dell'ossidazione (idroperossidi) di sostanze grasse mediante titolazione iodometrica.

La valutazione del numero di perossidi è stata realizzata sugli estratti lipidici ottenuti con il metodo Folch. In una beuta contenente 1 g di grasso sono stati aggiunti 25 mL di una miscela di acido acetico glaciale-cloroformio (3:2 v/v) e 0,5 mL di una soluzione satura di KI. Dopo energica agitazione per 1 minuto, la beuta è stata lasciata a riposo per 5 minuti e al riparo dalla luce, la reazione è stata quindi arrestata mediante l'aggiunta di 75 mL di acqua bidistillata. Successivamente si è proceduto alla valutazione dello iodio liberato mediante titolazione con una soluzione 0,01 N di sodio tiosolfato, impiegando la salda d'amido come indicatore.

## 5.6 *Analisi del contenuto di Vitamina E (tocoferoli, tocotrienoli, attività vitaminica E)*

La determinazione della vitamina E nelle materie prime e nei prodotti finiti è stata effettuata attraverso un sistema cromatografico liquido ad alta prestazione (HPLC), previa estrazione dei tocoli, come descritto da Panfili *et al.* (2003).

Per la procedura di estrazione è stato pesato esattamente 2,0 g di campione in provette Pyrex con tappo a vite. A quest'aliquota è stato aggiunto:

- 5mL di pirogallolo etanolic al 6%, per evitare l'ossidazione dei componenti vitaminici;
- 2mL di NaCl all'1%, per non far formare emulsioni;
- 2mL di etanolo al 95%;
- 2mL di KOH al 60%;
- 10 palline di vetro, per evitare un'ebollizione tumultuosa.

Si è insufflato azoto per eliminare l'ossigeno presente e le provette sono state poste a bagnomaria a 70-80°C per 45 minuti, per favorire la saponificazione del campione. Dopo la saponificazione i tubi sono stati lasciati a raffreddare in un bagno di ghiaccio. Si è poi proceduto con l'estrazione aggiungendo 15mL di NaCl all'1%, per prevenire la formazione di emulsioni, e due porzioni di 15mL di una soluzione di n-esano:etilacetato 9:1 (v/v). Il campione è stato portato a secco con evaporatore rotante la fase superiore estratta, poi ripresa con 2 mL di una soluzione di esano-isopropilico al 1%.

Per la determinazione della vitamina E è stato utilizzato un HPLC Dionex, dotato di una pompa HPG3200SD, un rilevatore RF2000 Fluorescence Detector, un loop da 50 µL e di una colonna C<sub>18</sub> Kromasil Phenomenex (5µm I.D., 4,6 \* 250 mm) gestiti da un computer provvisto di software Chromeleon, versione 6.60. La determinazione dei tocoli è stata effettuata in condizioni isocratiche, con un flusso di 1,6 mL/min, utilizzando come fase mobile una soluzione di n-esano-etilacetato-acido acetico 97,3/1,8/0,9 (v/v/v) per una durata di 25 minuti, impostando al fluorimetro una lunghezza d'onda di eccitazione di 285 nm e una di emissione di 325 nm (Panfili *et al.*, 2003).

L'analisi quantitativa dei tocoferoli è stata effettuata utilizzando il metodo dello standard esterno, mentre quella dei tocotrienoli riferendosi, per ciascun tocotrienolo, all'area del rispettivo standard di tocoferolo, dal momento che l'intensità di fluorescenza e, cioè l'area del picco di ciascun tocotrienolo è identica a quella del corrispondente tocoferolo a parità di concentrazione.

## 5.7 Estrazione dei composti fenolici liberi e legati da germe di grano

### 5.7.1 Estrazione di composti fenolici liberi

• **Estrazione solido/liquida:** Nello schema è riportato il metodo di estrazione dei composti fenolici da germe (Figura 5.2). Un aliquota di campione pari a circa 5 grammi di germe è stata estratta mediante sonicazione con 40 mL di una miscela di estrazione solvente organico/acqua per 10 minuti per estrarre i composti fenolici liberi. Le miscele di estrazione utilizzate sono le seguenti:  $s_1$ , 4/1 di etanolo/acqua (v/v) (estratto EtH<sub>2</sub>O);  $s_2$ , 4/1 metanolo/acqua (v/v) (estratto MetH<sub>2</sub>O); e  $s_3$ , 4/1 acetone/acqua (v/v) (estratto AcH<sub>2</sub>O) al fine di valutare la miscela di estrazione più performante. Dopo centrifugazione a 1000g per 10 minuti, il surnatante è stato rimosso e l'estrazione è stata ripetuta ancora una volta. I surnatanti sono stati riuniti, evaporati a 40 °C con un evaporatore sotto vuoto e ricostituiti con 5 mL di miscela acqua/acido formico 99,7/0,3 (v/v) (estratto A).

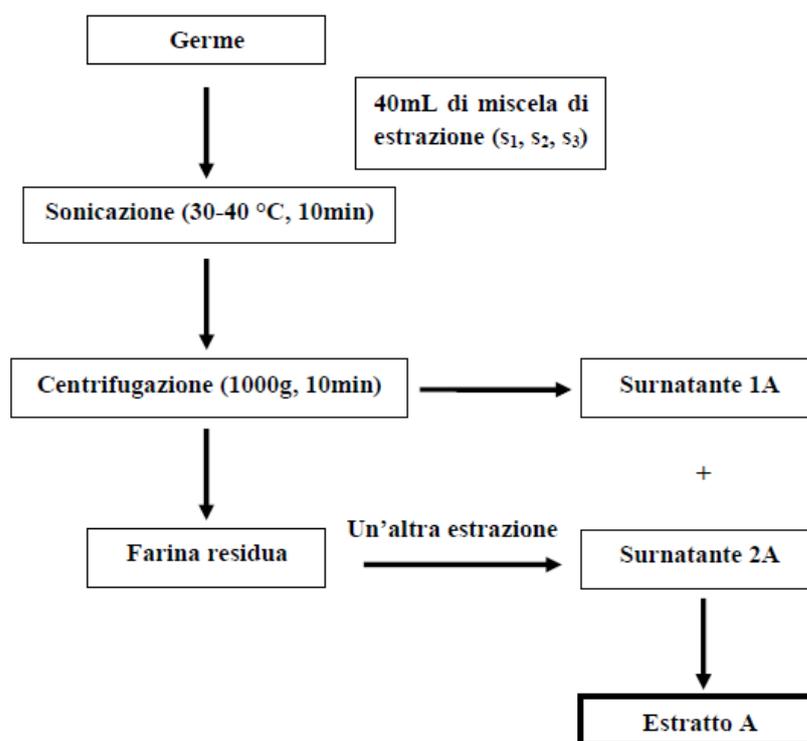


Figura 5.2. Piano di estrazione dei composti fenolici liberi da germe.

### 5.7.2 Estrazione di composti fenolici legati

• **Idrolisi alcalina:** Un grammo di germe è stato digerito con 100 mL di NaOH 2 M a temperatura ambiente per 4 ore mediante agitazione sotto gas di azoto. La miscela è stata quindi portata a pH 2-3 aggiungendo acido cloridrico 10 M in un bagno di ghiaccio ed estratta con 500 mL di esano per rimuovere i lipidi. La soluzione finale è stata estratta cinque volte

con 100 mL di miscela acetato dietil etere/etile 1/1 (v/v). Le frazioni organiche sono state riunite ed evaporate tramite essiccamento. I composti fenolici sono state ricostituiti con 5 mL di miscela 99,7/0,3 acqua/acido formico (v/v).

- **Idrolisi acida:** Un grammo di germe è stato agitato con 6 mL di etanolo al 96% e 30 mL di acido cloridrico al 25% a 65°C per 30 min. Poi, 10 mL di etanolo al 96% e 50 mL di miscela 1/1 etere dietilico/etere di petrolio 40-60°C (v/v) sono stati aggiunti ai campioni digeriti. La frazione organica è stata scartata e il residuo è stato lavato due volte con 25 mL di miscela 1/1 etere dietilico/etere di petrolio 40-60°C (v/v). Infine, la frazione acquosa è stata lavata per cinque volte con 100 mL di miscela 1/1 etere dietilico/acetato di etile (v/v) per rimuovere i lipidi. Le frazioni organiche sono state riunite ed evaporate tramite essiccamento. I composti fenolici sono stati ricostituiti con 5 mL di miscela acqua/acido formico 99.7/0.3 (v/v).

### ***5.7.3 Identificazione composti fenolici con analisi RP-HPLC con detector di assorbimento-UV Diode Array e Spettrometria di Massa (MS)***

L'analisi RP-HPLC è stata eseguita da un 1100 HP series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), dotato di un sistema di erogazione della pompa binaria, un sistema di degasser, un auto campionatore, un DAD UV-vis e un MSD. Per l'identificazione è stata utilizzata una colonna C<sub>18</sub> Luna, 5 µm, 250 × 3,00 mm ID (Phenomenex, Torrance, CA) con una precolonna filtro C<sub>18</sub>. Tutti i solventi erano specifici per l'utilizzo in HPLC e sono stati filtrati attraverso un disco filtro 0,45 micron. Il gradiente di eluizione è stato ottenuto utilizzando il seguente sistema di solventi: fase mobile A, acqua/acido acetico (99:1, v/v); fase mobile B, fase mobile A/acetonitrile (60:40, v/v). Il sistema di eluizione in gradiente lineare è stato riportato da Verardo *et al.* (2008). Lo spettro UV è stato registrato tra 210-600 nm.

Il volume di iniezione è stato di 10 µL. L'analisi HPLC è stata condotta a temperatura ambiente. L'analisi con MS è stata eseguita usando una ionizzazione elettrospray ad interfaccia (ESI) (usando sia polo positivo che negativo) alle seguenti condizioni: flusso di gas (N<sub>2</sub>), 9,0 L/min; pressione nebulizzatore, 50 psig; temperatura del gas, 350 °C; tensione capillare, 4000 V; tensione del frammentatore e range di scansione variabili. Il range del frammentatore e m/z utilizzati per l'analisi HPLC-ESI/MSD sono stati i seguenti: modalità positiva, 60 V e m/z 50-1000; 100 V e m/z 50-1000; modalità negativa, 80 V e m/z 50-1000, 140 V e m/z 50-1000.

## ***5.8 Determinazione del contenuto di polifenoli totali da estratto di germe di grano mediante metodo Folin-Ciocalteu***

I fenoli liberi e legati estratti dal germe di frumento sono stati quantizzati con il saggio colorimetrico del Folin-Ciocalteu. Questo metodo sfrutta la reazione redox in ambiente basico tra composti fenolici e il reattivo di Folin-Ciocalteu, che è una miscela di acido fosfotungstico e fosfomolibdico. Da tale reazione si formano complessi blu di ossidi di  $W_8O_{23}$  e  $Mo_8O_{23}$  che presentano un massimo di assorbimento nel visibile a 725 nm.

Questo prevede la preparazione del campione, precedentemente filtrato attraverso un disco filtro 0,45 micron, diluendone 0,25 mL in 4 mL di acqua distillata e ad essi sono aggiunti 0,25 mL del reattivo Folin-Ciocalteu (diluito 1:1 in acqua distillata) a temperatura ambiente e 0,5 mL di carbonato di sodio saturo; i campioni sono stati posti al buio per 30 minuti ed infine sono state allestite le letture allo spettrofotometro a 725 nm contro il bianco e lette le rispettive assorbanze. Il contenuto in fenoli è espresso come mg di acido ferulico/Kg di campione.

## ***5.9 Analisi microbiologiche sul germe di frumento***

### ***5.9.1 Caratterizzazione microbica del germe di grano***

Al fine di stabilire le specie microbiche presenti all'interno del campione utilizzato per le varie prove analitiche sono state effettuate delle prove di crescita microbica sul campione di germe macinato.

Per la caratterizzazione del campione 10 grammi di germe di grano macinato rappresentativi dell'intero campione sono stati prelevati in maniera "asettica" e sospesi in 90 mL di soluzione fisiologica sterile ( $H_2O + NaCl$  9g/L) ed omogeneizzati per 3 minuti (intervallando un minuto di agitazione con un minuto di pausa) in Lab-blender 400 Stomacher (Seward Laboratory, London, U.K.).

A partire dalla sospensione in soluzione fisiologica (che rappresenta la prima diluizione decimale del campione 1/10) sono state allestite diluizioni decimali in tubi di soluzione fisiologica (9 mL) sino ad arrivare alla diluizione  $10^{-5}$ .

Da ciascuna diluizione è stata prelevata un'aliquota per eseguire l'inoculo in piastra; aliquota pari ad 1 mL, per l'inoculo per inclusione, e a 0,1 mL per l'inoculo per spatolamento superficiale (Tabella 5.1).

#### *5.9.1.1 Determinazione carica microbica totale (ISO 4833)*

In piastra Petri sono stati versati 1 mL di ciascuna diluizione + 15 mL di substrato Plate Count Agar standard (Oxoid, Milano). Le piastre sono state realizzate in doppio. Dopo solidificazione del substrato le piastre sono state incubate a 28°C per 72h e successivamente sono state contate le colonie considerando le piastre con un numero di colonie compreso tra 30 e 300. È stato preso come valore la media aritmetica nel caso di conta di due piastre a due diluizioni differenti. Il risultato è stato espresso come numero di microrganismi formanti colonie (UFC) per grammo.

#### *5.9.1.2 Determinazione batteri lattici*

La presenza di batteri lattici mesofili di forma bastoncellare è stata valutata inoculando 1 mL di ogni diluizione in piastre Petri e aggiungendo successivamente 15 mL di terreno colturale MRS agar (Oxoid). Una volta solidificato il terreno, le piastre sono state incubate a 28°C per 48 h in microaerofilia (gas pack anaerobic System, BBL, Becton Dickinson). Sono state considerate le piastre con uno sviluppo di colonie compreso tra 30 e 300 e i risultati sono stati espressi come numero di batteri lattici presenti (UFC) per grammo.

#### *5.9.1.3 Determinazione coliformi totali e fecali (ISO 4832 :1991)*

Metodo: Tecnica per inclusione

In piastra Petri è stato versato 1 mL di ciascuna diluizione + circa 12 mL di substrato VRBL (Violet Red Bile Lactose) agar (Oxoid). A solidificazione avvenuta è stato realizzato un doppio strato aggiungendo altri 4 mL di VRBL agar a ciascuna piastra. Le piastre per il rilevamento dei coliformi totali sono state quindi incubate a 37°C per 24-48h mentre quelle per il riconoscimento di quelli fecali sono state incubate a 44°C per 24-48h.

Sono state considerate le piastre con uno sviluppo di colonie compreso tra 15 e 150. Sono state contate le colonie violacee di 0,5 mm di diametro ed è stato preso come valore la media aritmetica nel caso di conta di due piastre a due diluizioni differenti. Il risultato è stato espresso come n. di coliformi (UFC) per grammo.

#### *5.9.1.4 Determinazione enterobacteriaceae (ISO 7402)*

Metodo : Tecnica per inclusione

In piastra Petri sono stati versati 1 mL di ciascuna diluizione + circa 15 mL di substrato VRBG (Violet Red Bile Glucose) agar (Oxoid). A solidificazione avvenuta è stato realizzato

un doppio strato aggiungendo altri 5 mL di VRBG agar a ciascuna piastra. Le piastre sono state quindi incubate a 37°C per 24-48h.

Sono state contate le colonie tipiche per piastra (rosa/rosse, con/senza alone di precipitazione, oppure mucoidi incolori). È stato preso come valore la media aritmetica nel caso di conta di due piastre a due diluizioni differenti. Il risultato è stato espresso come n. di *Enterobacteriaceae* (UFC) per grammo.

#### 5.9.1.5 Determinazione lieviti e muffe (ISO 7954:1987)

È stato inoculato 1 mL di sospensione iniziale e/o sue diluizioni in doppio in piastre Petri. In ciascuna piastra sono stati versati circa 15 mL di substrato specifico Rose Bengal Agar (Biolife, Milano) più supplemento (cloramfenicolo) ed incubati a 28°C per 5 giorni controllando il numero di colonie dopo 3, 4 e 5 giorni prima dell'eventuale sovracrescita di muffe.

#### 5.9.1.6 Determinazione di *Bacillus cereus* (ISO 7932:1993)

0,1 mL di ciascuna diluizione decimale è stato inoculato in doppio (in superficie) su substrato *Bacillus cereus* agar base (Biolife, Milano) addizionato di supplemento a 28°C per 18-24 h (più eventuali altre 24h di incubazione). Sono state considerate per la lettura le piastre con non più di 150 colonie.

Le colonie tipiche di *B. cereus* appaiono dentate di circa 5 mm di diametro e di colorazione blu turchese, circondata da un precipitato di tuorlo d'uovo dello stesso colore.

**Tabella 5.1.** Gruppi microbici ricercati nei campioni analizzati e metodiche ufficiali utilizzate per le analisi microbiologiche

| <b>Gruppi Microbici ricercati</b>                | <b>Metodiche impiegate</b> |
|--|----------------------------|
| Carica Microbica totale (aerobi mesofili a 30°C) | UNI ISO 4833:1988          |
| Coliformi totali e fecali                        | UNI ISO 4832: 1991         |
| <i>Enterobacteriaceae</i>                        | ISO 7402:1993              |
| Lieviti e Muffe                                  | ISO 7954:1987              |
| <i>Bacillus cereus</i> .                         | ISO 7932:1993              |

#### 5.9.2 Microrganismi oggetto di studio e condizioni di crescita

I ceppi microbici oggetto di studio sono ascrivibili al genere *Pseudomonas*, che costituisce il gruppo microbico principalmente responsabile del deterioramento durante la conservazione di diversi alimenti. I ceppi di *P. putida* e *P. fluorescens P. fragi* sono stati utilizzati come ceppi

target per misurare l'azione inibente dell'estratto presente nel campione. Oltre a questi, sono stati utilizzati ceppi di altre 3 specie batteriche (*Listeria innocua*, *Clostridium sporogenes* *Brochothrix thermosphacta*).

Sono stati utilizzati le specie microbiche sopracitate in quanto rappresentano le specie alteranti che si riscontrano maggiormente durante la conservazione di un alimento e che portano quindi ad un'alterazione del prodotto con conseguente perdita di shelf life.

Tutti i ceppi microbici sono stati conservati a 4°C, riattivati in opportuni substrati colturali quando necessario e, per i differenti saggi, sono state utilizzate esclusivamente colture overnight. In tabella 5.2 sono riportate le condizioni di crescita e la fonte di isolamento dei ceppi.

**Tabella 5.2.** Caratteristiche dei ceppi microbici oggetto di studio, temperatura ottimale di crescita, substrato impiegato per la coltivazione.

| Ceppo microbico                            | Condizione di crescita |                      |
|--|------------------------|----------------------|
|  | Temperatura            | Medium               |
| <i>Pseudomonas putida</i> DSM 291          | 28°C                   | Mueller Hinton Broth |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> DSM 50090   | 28°C                   | Mueller Hinton Broth |
| <i>Pseudomonas fragi</i> DSM 3456          | 28°C                   | Mueller Hinton Broth |
| <i>Listeria innocua</i> DSM 20649          | 37°C                   | Mueller Hinton Broth |
| <i>Clostridium sporogenes</i> DSM 795      | 37°C                   | Mueller Hinton Broth |
| <i>Brochothrix thermosphacta</i> DSM 20171 | 28°C                   | Mueller Hinton Broth |

### 5.9.3 Valutazione della crescita microbica delle colture standard oggetto di studio

Sono state effettuate dopo 24 ore dall'inoculo delle colture di interesse, in terreno MH agarizzato fresco, delle prove di crescita microbica su piastra, con relativo conteggio del numero di colonie presenti, al fine di stabilire l'effettiva carica microbica della coltura al momento dell'inoculo per le prove antimicrobiche (Agar Well Diffusion Assay).

#### **5.9.4 Valutazione dell'attività antimicrobica degli estratti *in vitro***

La valutazione dell'attività antimicrobica *in vitro* degli estratti di polifenoli ottenuti dal germe di grano è stata eseguita mediante la tecnica dell'Agar Well Diffusion Assay che permette di valutare la presenza di un alone di inibizione e la sua dimensione, come descritto da Tremonte *et al.* (2007).

In dettaglio, 20 mL di un opportuno substrato colturale Mueller Hinton semi-agarizzato (agar 0,8%) sono stati inoculati con il 2% (200 µL) del ceppo da saggiare impiegando una brodocoltura overnight e successivamente è stato distribuito in piastra. Sulla superficie del substrato di coltura presente in piastra sono stati realizzati pozzetti circolari con diametro pari a 8 mm nei quali sono stati introdotti 75 µL dei vari estratti, più un controllo negativo rappresentato da acqua bistillata sterile o il dimetilsolfossido (DMSO) e un controllo negativo rappresentato dal Cloramfenicolo. Infine quindi le piastre sono state incubate alle rispettive temperature ottimali di crescita e sono stati valutati i risultati dopo 24 e 48 ore.

Inoltre sono state effettuate valutazioni dell'attività antimicrobica anche dei singoli acidi fenolici acquistati presso Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) e riscontrati all'interno dell'estratto di polifenoli di germe in seguito alla loro identificazione, seguendo la stessa procedura sopra descritta.

La totalità delle prove è stata condotta almeno in triplo; la presenza e le dimensioni degli aloni di chiarificazione sono stati considerati come indice del grado di inibizione dell'estratto.

Il diametro dell'alone d'inibizione è stato rilevato mediante calibro di precisione. In particolare, i rapporti di interazione, in funzione degli aloni osservati, sono stati così classificati:

- Neutralismo (mancata inibizione): assenza di qualsiasi alone
- modesta inibizione: alone di chiarificazione con diametro < 5 mm
- moderata inibizione: alone di chiarificazione con diametro >5 mm e <8 mm
- elevata inibizione: alone di chiarificazione con diametro > 8 mm.

I risultati sono stati espressi come valori medi riportando la deviazione standard.

#### **5.9.5 Valutazione della MIC (Minima Concentrazione Inibente)**

La MIC è definita come la più bassa concentrazione alla quale un agente antimicrobico inibisce la crescita visibile di un microrganismo dopo una notte di incubazione. La MIC è utilizzata nei laboratori diagnostici per ottenere una conferma sulla resistenza di un agente

antimicrobico, ma può essere usata anche come strumento di ricerca al fine di determinare l'attività *in vitro* di nuovi composti di cui non si conosce il potere inibente.

Grazie a questa tecnica infatti è possibile determinare in maniera accurata la suscettibilità dei microrganismi alla sostanza antimicrobica e giudicarne quindi le performance.

Il saggio è stato eseguito utilizzando il metodo descritto nel documento EUCAST 3.1 (2000) con piccole modifiche.

È stata determinata la MIC per gli estratti che nell'Agar Well Diffusion hanno dato potere inibente ed inoltre è stata anche determinata la MIC per ogni singolo acido fenolico presente nell'estratto che ha dato una discreta attività antimicrobica.

Le diverse concentrazioni di estratto di polifenoli da germe di grano e dei singoli acidi fenolici sono state aggiunte in modo asettico al terreno Mueller-Hinton (MH) sia agarizzato che liquido, in modo tale da poter confrontare i risultati ed eliminare eventuali errori riconducibili alla solubilità del composto in differenti sistemi.

Per quanto riguarda la prova MIC in piastra (terreno agarizzato) si è proceduti applicando la procedura dell'Agar Well Diffusion inserendo, nel caso dell'estratto, all'interno di ciascun pozzetto 75 µL di una soluzione a concentrazione nota, diluita con acqua distillata sterile; mentre nel caso dei singoli acidi fenolici, a ciascun pozzetto sono stati aggiunti 75 µL di una soluzione a concentrazione nota dell'acido fenolico di interesse, diluita con una soluzione di DMSO (DiMetilSolfOssido, purezza: 99%) sterile, che è risultato essere il miglior solvente per poter sciogliere i rispettivi standard di acidi fenolici e, allo stesso tempo, non dare aloni di inibizione.

In entrambe le prove, un pozzetto è stato riempito con 75 µL di acqua bidistillata sterile o DMSO che serviva da controllo negativo.

Per quanto riguarda la prova MIC in brodo a 19 mL di MH liquido, è stato addizionato un 1 mL della sostanza di cui si vuole determinare la MIC, in tal caso l'estratto di polifenoli di germe differentemente diluito e i singoli acidi fenolici a concentrazione nota, in modo tale da ottenere una gamma di concentrazioni note comprese in un range di 1-20 g/L. In seguito ciascun ceppo microbico è stato inoculato asetticamente a concentrazione di  $10^6$  UFC/mL e incubato alla rispettiva temperatura ottimale di crescita. Al termine del periodo d'incubazione è stata valutata la presenza/assenza di crescita, inoltre, al fine di valutare la persistenza dell'evento inibitorio, le colture sono state osservate dopo 7 giorni di incubazione.

## ***Capitolo 6. Risultati e discussione***

### **6.1 Caratterizzazione chimico-nutrizionale di germe di grano**

Mediante opportuni diagrammi di macinazione presso il mulino della F. Divella S.p.a., il germe di frumento tenero è stato separato dalle altre frazioni della cariosside. Successivamente, il germe ottenuto da diverse lavorazioni è stato caratterizzato nella sua composizione al fine di stabilire le percentuali delle diverse componenti presenti al suo interno (Tabella 6.1).

**Tabella 6.1.** Composizione centesimale del germe di frumento

| <b>Campione</b>                | <b>Umidità<br/>%</b> | <b>Proteine<br/>(% s.s.)</b> | <b>Grassi<br/>(% s.s.)</b> | <b>Ceneri<br/>(% s.s.)</b> | <b>Fibra<br/>(% s.s.)</b> | <b>Carboidrati*<br/>(% s.s.)</b> |
|--------------------------------|----------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| <b>Germe di<br/>frumento 1</b> | 13,6±0,11            | 21,0±0,18                    | 7,3±0,23                   | 4,44±0,07                  | 26,0±0,26                 | 41,1                             |
| <b>Germe di<br/>frumento 2</b> | 14,1±0,08            | 27,7±0,15                    | 10,2±0,12                  | 4,89±0,05                  | 21,9±0,21                 | 35,3                             |
| <b>Germe di<br/>frumento 3</b> | 11,9±0,03            | 19,3±0,14                    | 5,9±0,18                   | 5,14±0,07                  | 23,2±0,19                 | 34,6                             |
| <b>Media</b>                   | 13,2                 | 22,7                         | 7,8                        | 4,82                       | 23,7                      | 37,0                             |
| <b>CV %</b>                    | 0,89                 | 13,15                        | 3,21                       | 0,08                       | 2,93                      | 8,49                             |

\*Calcolati per differenza

Come evidenziato dalle analisi effettuate, il germe analizzato oltre a presentare un elevato contenuto medio in proteine (22,7% s.s.), presenta un elevato contenuto in fibra alimentare (23,7% s.s.) ed una percentuale consistente di grassi (7,8% s.s.). In realtà, il germe di frumento che si trova in commercio generalmente presenta un tasso ancora più elevato di proteine e grassi con un forte abbattimento della frazione in fibra. Nell'ottica di produrre prodotti innovativi, nutrizionalmente validi e funzionali, la presenza di fibra a concentrazioni elevate potrebbe rappresentare un elemento favorevole.

### ***6.1.1 Valutazione della frazione lipidica***

La composizione in acidi grassi dei grassi alimentari riveste una notevole importanza sia sotto il profilo tecnologico sia sotto quello chimico-nutrizionale.

Oli e grassi svolgono numerose ed importanti funzioni tecnologiche nelle preparazioni alimentari, grazie all'instaurarsi di interazioni chimiche e fisiche con gli ingredienti utilizzati. Nel corso dei processi di trasformazione degli alimenti, i lipidi possono subire delle trasformazioni indesiderate: alterazioni chimiche che comportano perdita del valore nutrizionale ed organolettico.

La composizione lipidica è un fattore fondamentale per la buona conservazione del prodotto, infatti il processo di irrancidimento ossidativo del grasso dipende in larga misura dal grado di insaturazione degli acidi grassi e, in particolare, dal tenore in acidi polinsaturi, oltre che dalle condizioni di trattamento.

Sul germe è stata effettuata la valutazione del contenuto degli acidi grassi (Tabella 6.2). Dal punto di vista qualitativo la frazione lipidica del germe di frumento si caratterizza per la presenza di acidi grassi polinsaturi che complessivamente rappresentano circa l'82,35% degli acidi grassi totali. L'acido linoleico (C18:2) è il principale acido grasso insaturo (60,57%), seguono l'acido palmitico (C16:0) (16,41%) e l'acido oleico (C18:1) (14,48%).

L'alto contenuto lipidico e la presenza di acidi grassi insaturi della serie n-6 e n-3, conferisce al prodotto proprietà ipocolesterolemizzante, efficace nel controllo di colesterolo e trigliceridi nel sangue (Traber & Sies, 1996).

In figura 6.1 è riportata una corsa cromatografica degli acidi grassi presenti all'interno del germe di frumento con i rispettivi tempi di ritenzione.

Quando i prodotti alimentari contenenti sostanze grasse vengono sottoposti a trattamenti tecnologici oppure vengono conservati per periodi più o meno lunghi, possono subire, oltre alla reazione di Maillard altre trasformazioni indesiderate (chimiche, nutrizionali ed organolettiche).

Tali alterazioni vengono indicate col nome di "irrancidimento" e possono suddividersi in tre categorie:

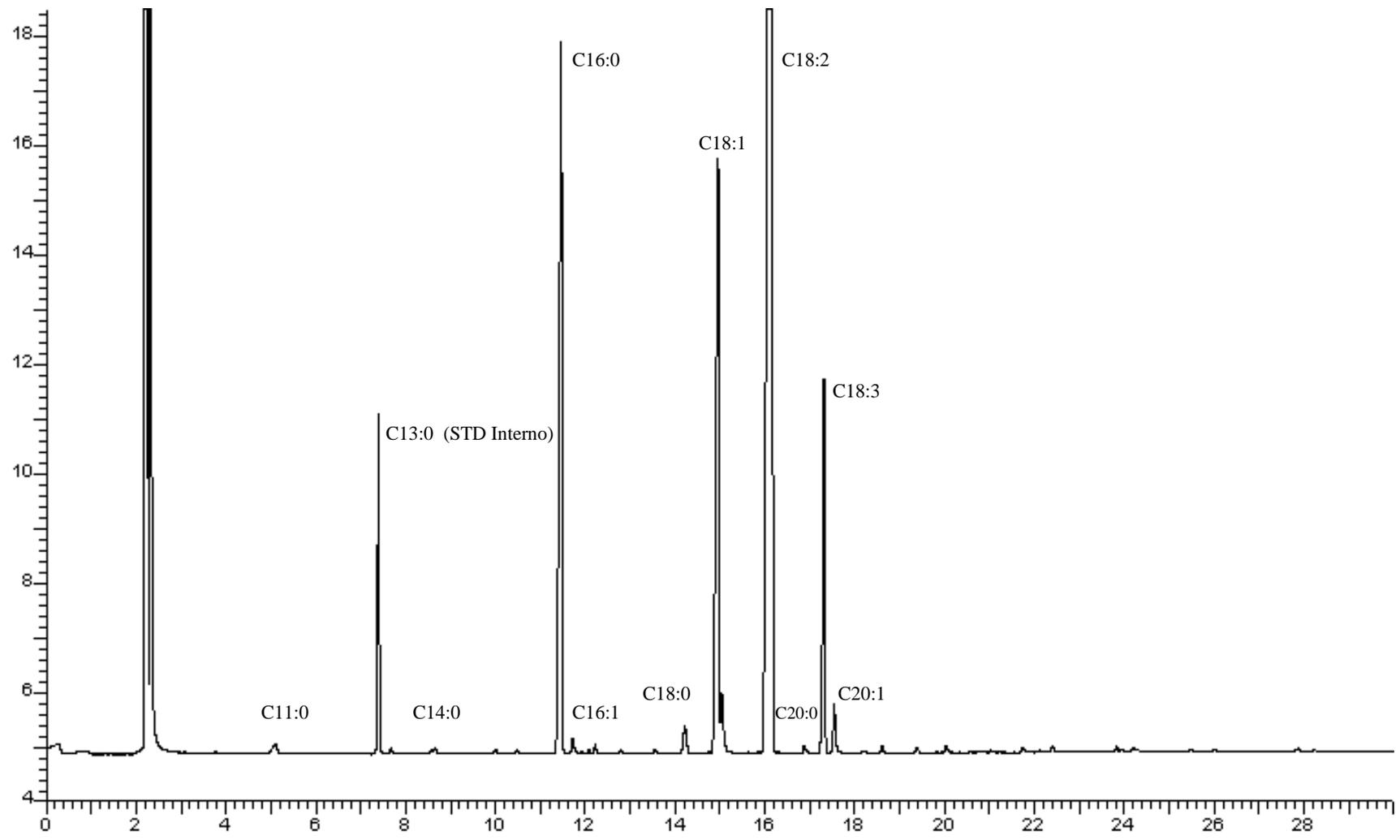
- irrancidimento idrolitico
- irrancidimento chetonico
- irrancidimento ossidativo

Queste reazioni sono favorite da alcuni fattori preponderanti, quali:

- pressione parziale dell'ossigeno;
- grado di insaturazione della sostanza grassa;

**Tabella 6.2.** Valore medio in acidi grassi del germe di frumento di diverse lavorazioni

| <b>mg/g grasso</b>                   |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |                      |                        |
|--------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------------|------------------------|
| <b>Acidi grassi</b>                  | <b>11:0</b> | <b>14:0</b> | <b>16:0</b> | <b>16:1</b> | <b>18:0</b> | <b>18:1</b> | <b>18:2</b> | <b>20:0</b> | <b>18:3</b> | <b>20:1</b> |                      |                        |
| <b>Germe di frumento (Media±STD)</b> | 4,0± 0,01   | 0,63± 0,01  | 173,8±0,88  | 1,46±0      | 8,3± 0,07   | 170,1±1,0   | 696,7±4,01  | 1,0± 0,01   | 73,6± 0,47  | 9,9± 0,07   |                      |                        |
| <b>distribuzione %</b>               |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |                      |                        |
| <b>Acidi grassi</b>                  | <b>11:0</b> | <b>14:0</b> | <b>16:0</b> | <b>16:1</b> | <b>18:0</b> | <b>18:1</b> | <b>18:2</b> | <b>20:0</b> | <b>18:3</b> | <b>20:1</b> | <b>Totale saturi</b> | <b>Totale insaturi</b> |
| <b>Germe di frumento (Media±STD)</b> | 0,36± 0,03  | 0,11± 0,01  | 16,41±0,08  | 0,17± 0,01  | 0,71± 0,03  | 14,48±0,01  | 60,57± 0,04 | 0,06± 0,05  | 6,70± 0,04  | 0,43± 0,01  | 17,65                | 82,35                  |



**Figura 6.1.** Tracciato gas cromatografico degli acidi grassi presenti nel germe di frumento

- presenza di metalli;
- irraggiamento, in particolare quello con luce UV o con luce visibile in presenza di sensibilizzatori (clorofille, feofitine, emoglobina, ematoporfirine, ecc.);
- temperatura.

Le insaturazioni sono coinvolte nei processi di alterazione dei grassi alimentari poiché è noto che l'insaturazione degli acidi grassi insieme alla presenza di antiossidanti (naturali e addizionati) e alle condizioni di conservazione (temperatura, ossigeno e luce) influenzano la stabilità all'ossidazione (Caboni, 1994).

L'irrancidimento ossidativo avviene per reazione dell'ossigeno con gli acidi grassi insaturi (esterificati e liberi), ma anche con altre sostanze associate ai lipidi, come il colesterolo. Il processo ossidativo, da un punto di vista biologico, risulta fondamentale per la biosintesi di molecole essenziali alla vita, come ad esempio ormoni steroidei e prostaglandine. Al contrario, se l'ossidazione delle sostanze grasse avviene a carico della frazione lipidica degli alimenti è invece una reazione che porta ad una perdita di qualità del prodotto, conferendo odori e sapori sgradevoli all'alimento, caratteristici della "rancidità". Ma il problema non si ferma soltanto ad una pessima sensazione organolettica in quanto la mancata disponibilità di nutrienti si accompagna alla formazione di composti potenzialmente dannosi per la salute.

Questo processo è strettamente correlato alla presenza di ossigeno disponibile per innescare tali trasformazioni, infatti un elevato livello di ossigeno disponibile può facilitare la possibilità di alterazioni in seguito a tale processo.

L'ossidazione è l'alterazione più importante dei grassi e, nel caso specifico dei lipidi, è una reazione di natura chimica. L'autossidazione è indotta dalla presenza di radicali liberi e procede concludendosi con la formazione di sostanze volatili e non volatili: i composti volatili sono responsabili degli off-flavour che determinano gli odori ed i sapori caratteristici delle sostanze grasse alterate, mentre i prodotti non volatili sono invece coinvolti nelle alterazioni di tipo nutrizionale. La reazione ha un andamento radicalico autocatalitico caratterizzato da una fase di induzione nella quale si formano i prodotti primari dell'ossidazione, gli idroperossidi. Quando la concentrazione dei prodotti primari raggiunge certi valori si entra nella fase di propagazione, contraddistinta da un innalzamento dell'assorbimento dell'ossigeno.

Visto l'elevato contenuto in grasso costituito per lo più da acidi grassi insaturi, sul campione di germe di frumento sono state effettuate valutazioni atte a definire il suo stato di ossidazione mediante la valutazione del numero di perossidi. Le analisi sono state eseguite sul campione conservato a 4°C e al buio, dopo opportuna macinazione, al fine di evitare fenomeni di

ossidazione della componente grassa. In tabella 6.3 è riportato il contenuto di perossidi espresso come meq O<sub>2</sub>/kg di grasso. Il valore medio di 6,37 denota una leggera ossidazione, strettamente legata alle caratteristiche intrinseche del grasso del germe.

**Tabella 6.3.** Determinazione del numero di perossidi presenti nel germe di frumento.

| Campione         | meq O <sub>2</sub> /Kg di grasso |
|------------------|----------------------------------|
| Germe di grano 1 | 6,60±0,11                        |
| Germe di grano 2 | 6,59±0,05                        |
| Germe di grano 3 | 5,92±0,14                        |
| Media            | 6,37                             |
| CV%              | 0,1                              |

### 6.1.2 Valutazione delle componenti antiossidanti

#### 6.1.2.1 Caratterizzazione della componente vitaminica E

È stata, inoltre, valutata la componente vitaminica E del germe. Il contenuto di tocoli e l'attività biologica della vitamina E, espressa come Unità Internazionale (U.I.), del germe di frumento sono riportati in tabella 6.4.

Il germe di frumento nella composizione chimica presenta elevate concentrazioni di tocoferoli e tocotrienoli (8,76% s.s. e 0,73% s.s.). La differente distribuzione dei singoli vitameri risulta più evidente se si considera il rapporto T3/T che nel caso del germe risulta pari a 0,31. La presenza rilevante di tocoferoli e tocotrienoli risulta più evidente se riportata in termini di attività vitaminica E cioè tocoferolo equivalente (TE) che risulta pari a 9,34.

Considerando l'attività vitaminica E del germe il suo apporto di vitamina E rispetto alla dose giornaliera raccomandata (RDA) è del 78%.

**Tabella 6.4.** Valutazione di tocoli in germe di frumento (mg/100g s.s.)

| Campione          | TOCOFEROLI |          |     | TOCOTRIENOLI |          |      |      | Totale<br>T+T3 | ΣT    | ΣT3  | T3/T | TE   | %<br>RDA |
|-------------------|------------|----------|-----|--------------|----------|------|------|----------------|-------|------|------|------|----------|
|                   | α-T        | β-T      | γ-T | α-T3         | β-T3     | γ-T3 | δ-T3 |                |       |      |      |      |          |
| Germe di frumento | 8,76±0,22  | 3,37±0,1 | 0   | 0,73±0,03    | 3,02±0,4 | 0    | 0    | 15,33          | 12,13 | 3,74 | 0,31 | 9,34 | 78       |

### 6.1.2.2 Caratterizzazione della componente polifenolica

Diversi studi scientifici hanno rivelato la presenza di numerosi composti bioattivi (fitochimici) nei cereali, in grado di svolgere una fondamentale azione protettiva sulla nostra salute (Adom *et al.*, 2003). Nei cereali, la classe più abbondante di fitochimici è rappresentata dai polifenoli ed in particolare dagli acidi fenolici (800mg/kg). Derivati degli acidi idrossicinnamici e idrossibenzoici, la letteratura riporta un'ampia varietà di acidi fenolici riscontrati nel frumento (acido gallico, protocatecuico, *p*-idrossibenzoico, gentisico, clorogenico, vanillico, caffeico, siringico, *p*-cumarico, ferulico, sinapinico e trans-cinnamico) (Wu *et al.*, 1999; Abdel-Aal *et al.*, 2012; Irakli *et al.*, 2012).

Possono trovarsi sia in forma libera che legata a polimeri della parete cellulare, in particolare arabinoxilani (Serpen *et al.*, 2008; Lampi *et al.*, 2008; Liu, 2007), ma anche a stanoli e steroli (Naczki & Shahidi, 2006).

Pertanto è stata effettuata l'estrazione delle componenti fenoliche libere e legate presenti nel germe ed è stato determinato il contenuto di polifenoli totali mediante saggio colorimetrico di Folin-Ciocalteu. Successivamente gli acidi fenolici presenti sono stati identificati e quantizzati mediante corsa HPLC-Massa.

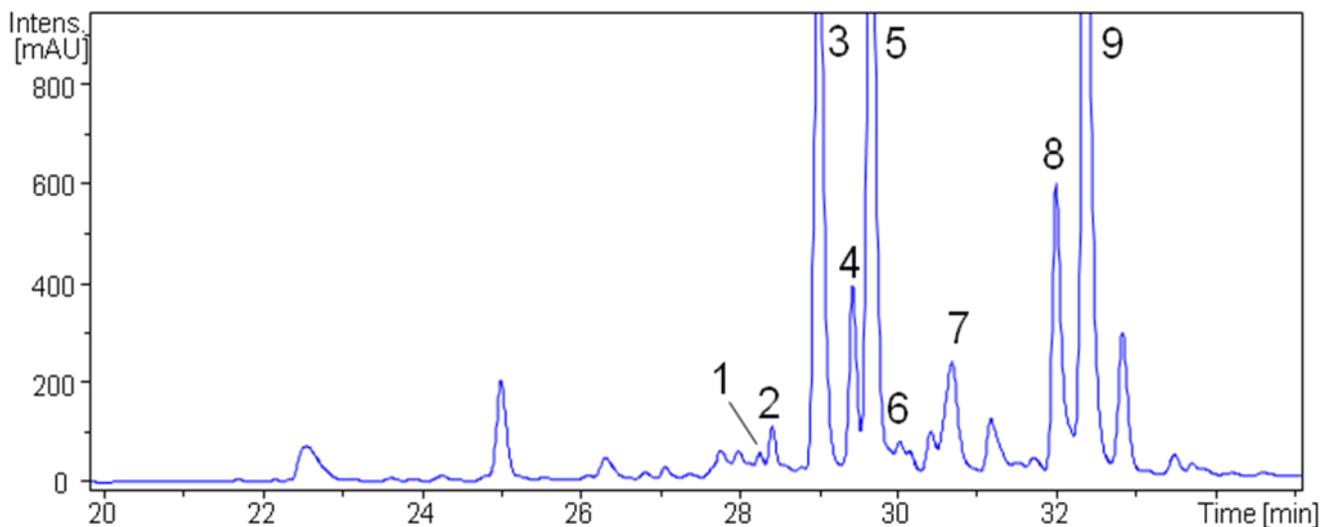
Il metodo di Folin-Ciocalteu permette di misurare la concentrazione di composti riducenti, tra cui i polifenoli, attraverso una variazione di colore. Nella presente attività di ricerca si è deciso di esprimere il contenuto di fenoli totali come acido ferulico equivalente, in quanto l'acido ferulico è il fenolo presente in maggior quantità nella granella dei cereali.

**Tabella 6.5.** Contenuto di fenoli totali ottenuto mediante saggio colorimetrico di Folin-Ciocalteu

|   | <b><i>Contenuto di fenoli totali<br/>(mg/Kg di Acido ferulico)</i></b> |
|---|--|
| <b><i>Fenoli Liberi (Media±STD)</i></b> | 726,47±0,26  |
| <b><i>Fenoli Legati (Media±STD)</i></b> | 1204,9±0,43  |

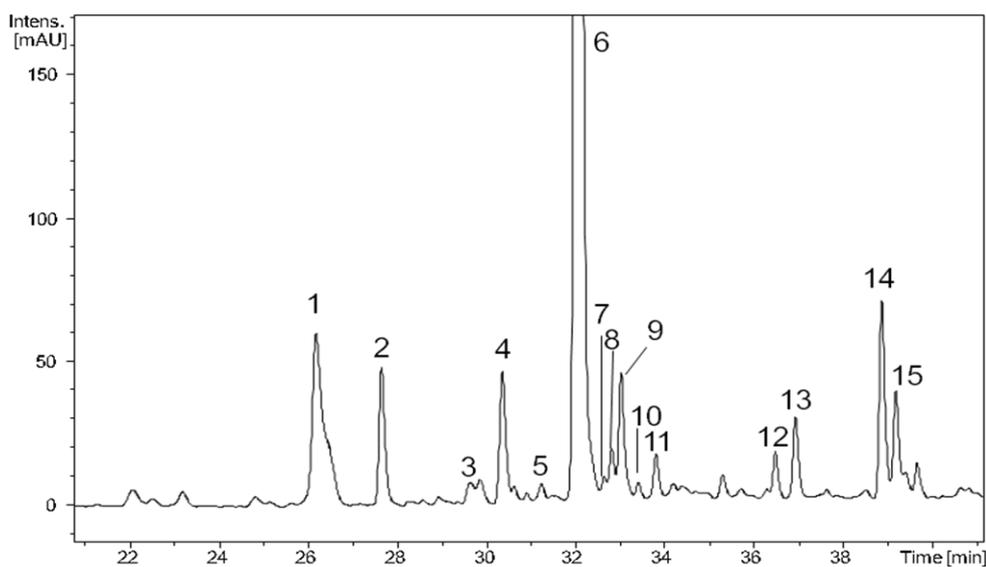
I risultati ottenuti (tabella 6.5) hanno evidenziato un maggior contenuto in fenoli legati rispetto ai liberi, confermando quanto riportato in letteratura (Liu, 2007). I composti fenolici legati infatti sono i principali composti ad attività antiossidante nella granella (90%), mentre i fenoli liberi contribuiscono in misura molto minore (meno dello 0,6%) (Adom & Liu, 2002).

L'identificazione delle componenti fenoliche libere e legate è riportata in figura 6.2, 6.3.



**Figura 6.2.** Identificazione HPLC delle componenti fenoliche libere presenti nel germe

1. Prodelfinidina B3, 2. Lucenina, 3-4-5-6. Shaftoside/Isoshaftoside, 7- Acido *p*-idrossi-benzoico
8. Acido *p*-cumarico, 9. Acido ferulico, 10. Apigenin-6-C-B-galactosyl-8-C-B-glucosyl-O-glucuronopyranoside



**Figura 6.3.** Identificazione HPLC delle componenti fenoliche legate presenti nel germe

1. Acido vanillico, 2. Acido siringico, 3. Acido *p*-idrossi-benzoico, 4. Acido trans *p*-cumarico, 5. Aldeide siringica (Siringaldeide), 6. Acido trans ferulico, 7. Acido diidroferulico, 8. Acido cis *p*-cumarico, 9. Acido cis ferulico, 10. Acido diidroferulico, 11. Acido diidroferulico, 12. Acido diidroferulico, 13. Acido diidroferulico, 14. Acido diidroferulico, 15. caffeoil-esoso

La maggior parte dei composti fenolici è rappresentata dagli acidi fenolici, in forma libera (14 mg/Kg) e legata (1200 mg/Kg). Risultati simili, sia per profilo che per contenuto in acidi fenolici, sono stati riportati da Brandolini *et al.* (2013) in germe di frumento duro.

Gli acidi fenolici riscontrati negli estratti liberi sono stati l'acido *p*-idrossibenzoico, l'acido *p*-cumarico e l'acido ferulico, rilevati nelle quantità riportate in tabella 6.6.

Tra i legati, il composto fenolico maggiormente presente è stato l'acido ferulico, seguito dall'acido *p*-cumarico, vanillico, benzoico e siringico. Questo a conferma dei dati riportati da Adom & Liu (2002) e Carcea *et al.* (2002) in cui si afferma che l'acido ferulico è il principale composto fenolico presente nel frumento, a concentrazioni 10-15 volte maggiori nella porzione crusca/germe rispetto all'endosperma.

**Tabella 6.6.** Analisi quantitativa delle sostanze fenoliche presenti nel germe di frumento

|   | <b>Acido <i>p</i>-idrossibenzoico (mg/Kg)</b> | <b>Acido Vanillico (mg/Kg)</b> | <b>Acido Siringico (mg/Kg)</b> | <b>Acido <i>p</i>-Cumarico (mg/Kg)</b> | <b>Acido Ferulico (mg/Kg)</b> | <b>Totale (mg/Kg)</b> |
|---|---|--------------------------------|--------------------------------|--|-------------------------------|-----------------------|
| <b><i>Fenoli Liberi (Media±STD)</i></b> | 1,09±0,18                                     | n.d                            | n.d.                           | 1,82±0,22                              | 10,79±0,25                    | 13,7                  |
| <b><i>Fenoli Legati (Media±STD)</i></b> | 13,21±0,26                                    | 16,88±0,34                     | 7,19±0,12                      | 36,72±0,29                             | 1125,56±0,43                  | 1213,26               |

Se si confrontano i risultati dei fenoli totali negli estratti liberi, determinati mediante il saggio di Folin-Ciocalteu e mediante analisi cromatografica, si evince come i primi risultino circa 50 volte più elevati rispetto ai secondi. La principale ragione di questa discrepanza è la mancanza di specificità per gli acidi fenolici del saggio spettrofotometrico, che potrebbe aver rivelato sostanze riducenti presenti nell'estratto diverse dai polifenoli, portando quindi ad una sovrastima del contenuto fenolico totale (Bonoli *et al.*, 2004; Lilyana-Pathirana & Shahidi, 2006).

Relativamente ai fenoli legati, i risultati del saggio di Folin- Ciocalteu e dell'analisi cromatografica presentano valori molto simili, ad indicare che gli acidi fenolici rappresentano la frazione fenolica maggiormente presente negli estratti legati.

## **6.2 Studio/progettazione di differenti semilavorati da destinare alla produzione di prodotti finiti a base di germe di frumento (pane e pasta fresca)**

### **6.2.1 Pane funzionale al germe di grano**

Per la realizzazione di pane ad elevata valenza funzionale sono state realizzate formulazioni a partire da farina di frumento tenero tipo 0 (var. Manitoba) addizionata di germe di frumento tenero.

Le miscele realizzate sono di seguito riportate:

**Miscela 1:** Farina

**Miscela 2:** Farina + 4% germe di frumento tenero

La scelta di utilizzare in miscela il 4% di germe tal quale in aggiunta alla farina è stata fatta per non inficiare o compromettere le caratteristiche reologiche degli impasti ottenuti e per evitare fenomeni di ossidazione della componente lipidica in seguito ad eccessiva presenza di germe nella miscela.

Sulla base dei dati di composizione e, relativamente al contenuto medio in lisina, dai dati disponibili in letteratura, è stata calcolata la composizione nutrizionale delle formulazioni realizzate (Tabella 6.7). I contenuti medi in lisina sono pari a 30 mg/g proteine e 32,5 mg/g proteine, relativamente alla farina e al germe di frumento tenero.

**Tabella 6.7.** Composizione chimica teorica delle formulazioni realizzate per la produzione di pane funzionale

| <b>Miscela</b> | <b>Grassi (%)</b> | <b>Proteine (%)</b> | <b>Fibra (%)</b> | <b>Ceneri (%)</b> | <b>Lisina (mg/ g proteine)</b> | <b>Indice chimico<sup>a</sup></b> |
|----------------|-------------------|---------------------|------------------|-------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| <b>1</b>       | 0,99              | 12,0                | 8,3              | 0,47              | 30,0                           | 50                                |
| <b>2</b>       | 1,32              | 12,6                | 8,2              | 0,62              | 32,5                           | 54                                |

**1:** Farina; **2:** Farina + 4% germe frumento tenero;

*a:* calcolato sulla base del pattern amminoacidico di riferimento della FAO/WHO (1991)

Come si evince dall'analisi della tabella, nelle miscele arricchite con germe si assiste ad un incremento del contenuto lipidico. Relativamente alla miscela arricchita, è interessante notare

l'incremento sia del contenuto proteico, sia del contenuto in lisina che comporta un innalzamento da 50 fino a 54 dell'indice chimico, calcolato sulla base del pattern amminoacidico della FAO/WHO (1991).

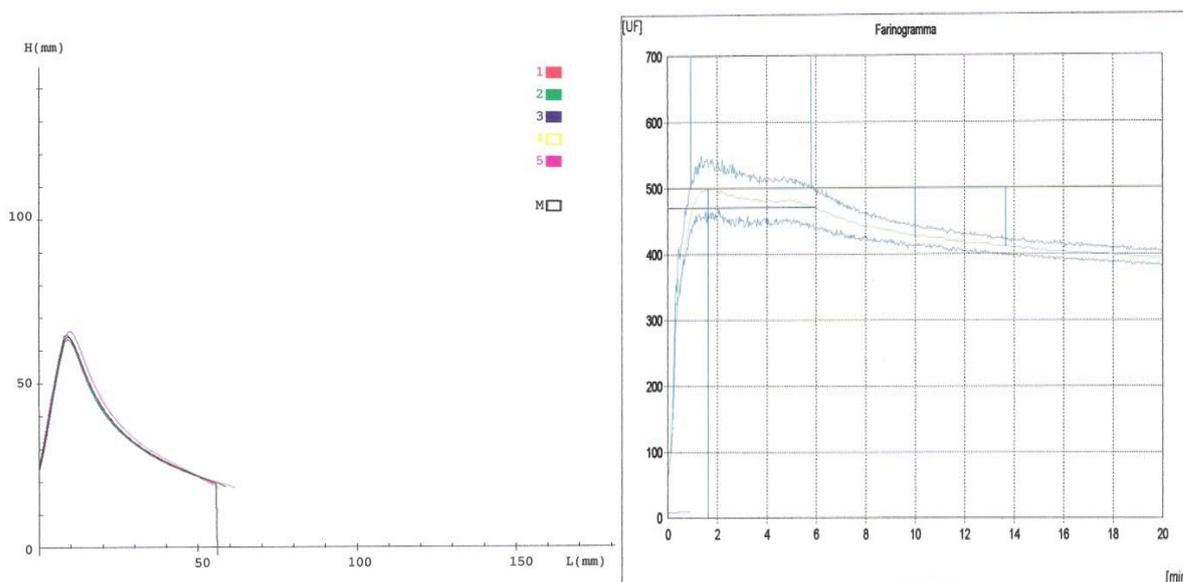
### 6.2.2 Valutazione dell'attitudine alla trasformazione delle formulazioni individuate

Al fine di verificare la possibilità di produrre in scala industriale alimenti nutrizionalmente e tecnologicamente validi, la fase successiva ha previsto una preliminare caratterizzazione delle miscele per panificazione realizzate nel corso della precedente attività.

Di queste miscele è stata testata l'attitudine alla trasformazione mediante valutazioni delle proprietà reologiche. In particolare sono stati presi in considerazione:

- L'attività amiliasica, espressa dai valori di Falling Number (F.N.)
- La qualità del glutine espressa dal valore di Gluten Index (G.I.)
- Il comportamento alle prove alveografiche, in particolare i valori P/L ossia il rapporto tra tenacità ed estensibilità dell'impasto ed il W che è espressione della forza della sfarinato.
- Il comportamento alle prove farinografiche, in particolare l'assorbimento di acqua (%), il tempo di sviluppo dell'impasto (min.) ed il tempo di stabilità dell'impasto (min.).

Due tipici tracciati alveografici e farinografici di una miscela realizzata sono mostrati nella figura 6.4. I risultati delle diverse prove sono riportati in tabella 6.8.



**Figura 6.4.** Tracciato alveo grafico e farinografico della miscela farina + 4% germe frumento tenero.

**Tabella 6.8.** Valutazione dell'attitudine alla trasformazione delle miscele realizzate per la produzione di pane funzionale

| Parametri                         | Miscele |      |
|-----------------------------------|---------|------|
|                                   | 1       | 2    |
| <b>G.I.</b>                       | 98      | 99   |
| <b>F.N.</b>                       | 404     | 407  |
| <b>Parametri alveografici</b>     |         |      |
| P/L                               | 1,32    | 0,98 |
| W                                 | 213     | 142  |
| <b>Parametri farinografici</b>    |         |      |
| Assorbimento H <sub>2</sub> O (%) | 55,4    | 54,6 |
| T. sviluppo impasto (min)         | 1,3     | 1,9  |
| T. stabilità impasto (min)        | 2,0     | 6,7  |

**Miscela 1:** farina 0; **Miscela 2:** farina + 4% germe di frumento tenero tq;

Nella miscela arricchita non si osservano particolari variazioni per quanto riguarda l'attività amilasica; in generale tuttavia i valori di Falling Number ottenuti, superiori a 300, indicano una debole attività amilasica, già nella miscela costituita da sola farina. I valori di Gluten Index, superiori a 55, indicano un'ottima qualità del glutine sia nella miscela di base sia in quelle arricchite.

Le miscele arricchite non mostrano valori di P/L significativamente superiori a quelli della miscela di sola farina, pertanto si presentano facilmente lavorabili (valori di P elevati e quindi P/L elevati indicano una elevata tenacità dell'impasto). I valori di W sono invece inferiori ed in particolare si riducono da 213 a 142, segno questo di una scarsa resistenza alla panificazione.

Gli indici farinografici non subiscono variazioni rilevanti, con valori di sviluppo dell'impasto leggermente superiori per la miscela arricchita con germe ed un tempo di stabilità dell'impasto maggiore. Quantunque le prove reologiche siano significative al fine di determinare l'attitudine alla panificazione delle diverse miscele, la valutazione complessiva può essere fornita soltanto da una prova di panificazione sperimentale e dalla successiva analisi del prodotto finito.

### 6.2.3 Valutazione delle miscele realizzate per la produzione di pane funzionale

Allo scopo di produrre pane funzionale arricchito di germe di grano sono state realizzate prove con miscele, le cui formulazioni e caratteristiche reologiche sono state riportate nei paragrafi precedenti:

- 1) farina 00
- 2) farina + 4% germe t.q. (4TQ)

La composizione chimica delle diverse miscele è riportata in tabella 6.9.

**Tabella 6.9.** Composizione chimica delle miscele prodotte per la produzione di pane funzionale

| Miscele | Proteine       | Lipidi         | Ceneri         | Fibra (g/100g s.s.) |          |        | Lisina          | Indice               |
|---------|----------------|----------------|----------------|---------------------|----------|--------|-----------------|----------------------|
|         | (g/100 g s.s.) | (g/100 g s.s.) | (g/100 g s.s.) | Insolubile          | Solubile | Totale | (mg/g proteine) | chimico <sup>a</sup> |
| 1       | 11,2±0,12      | 1,1±0,15       | 0,33±0,05      | 1,1±0,23            | 0,7±0,09 | 1,8    | 30,0±0,18       | 52                   |
| 2       | 12,1±0,14      | 1,5±0,16       | 0,72±0,08      | 1,7±0,21            | 0,8±0,05 | 2,5    | 32,0±0,26       | 55                   |

1: Farina 00; 2 Farina + 4% germe frumento tenero

<sup>a</sup>: calcolato sulla base del pattern amminoacidico di riferimento della FAO/WHO (1991)

Dai risultati si evince che la miscela arricchita con germe si caratterizza per un elevato contenuto in ceneri, superiore a quello della farina 00 rispettivamente del 118%. Questa miscela si arricchisce anche in lipidi (circa 40% in più).

Le miscela, è inoltre caratterizzata da un maggiore tenore in fibra rispetto alla farina controllo, dato che contribuisce a migliorare la loro valenza funzionale. In particolare il contenuto in fibra insolubile aumenta di circa il 50%. La miscela realizzata ha presentato anche un lieve incremento del tenore in proteine ed un incremento massimo di lisina, con un aumento dell'indice chimico da 52 a 55.

Sulle miscele analizzate è stato valutato il contenuto dei singoli tocoli e dei tocoli totali della miscela realizzata è riportato nelle tabella 6.10.

Come si può osservare, la miscela arricchita con germe presenta un più elevato contenuto in tocoli totali (con un arricchimento di circa il 70%), che, oltre ad incrementare significativamente l'apporto di questi composti antiossidanti, triplica l'attività vitaminica E, espressa come tocoferolo equivalenti (T.E.). A tale aumento, tuttavia, corrisponde anche un incremento del tenore lipidico, con una possibile diminuzione della shelf life del prodotto.

**Tabella 6.10.** Contenuto in tocoli nelle miscele realizzate(mg/100 g.s.s.) e contenuto in tocoferoli, tocotrienoli e attività vitaminica E (T.E.) nelle miscele realizzate (mg/100 g.s.s.)

| <b>Campione</b> | <b><math>\alpha</math>-T</b> | <b><math>\alpha</math>-T3</b> | <b><math>\beta</math>-T</b> | <b><math>\gamma</math>-T</b> | <b><math>\beta</math>-T3</b> |
|-----------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Miscela 1       | 0,48±0,06                    | 0,21±0,07                     | 0,23±0,08                   | 0,02±0                       | 1,93±0,26                    |
| Miscela 2       | 1,84±0,19                    | 0,22±0,07                     | 0,86±0,13                   | 0,02±0                       | 1,94±0,30                    |

| <b>Campione</b> | <b><math>\Sigma</math> Tocoferoli</b> | <b><math>\Sigma</math> Tocotrienoli</b> | <b>Totali</b> | <b>T.E</b> |
|-----------------|---------------------------------------|---|---------------|------------|
| Miscela 1       | 0,73                                  | 2,14                                    | 2,88          | 0,76       |
| Miscela 2       | 2,72                                  | 2,16                                    | 4,89          | 2,48       |

**Miscela 1:**farina 00; **Miscela 2:** farina +4% germe di frumento tenero tal quale

#### **6.2.4 Valutazione della qualità dei prodotti finiti**

A partire dalla miscela arricchita in germe, sono state realizzate diverse tipologie di pane. Sulla base dei valori di attività amilasica forniti dal Falling Number, si è proceduto all'aggiunta di estratto di malto alle diverse miscele in modo tale da raggiungere, per ciascuna di esse, un valore di Falling Number pari approssimativamente a 250, valore corrispondente ad una attività amilasica ottimale per un processo di panificazione. La percentuale di acqua aggiunta all'impasto è stata corretta sulla base dei valori di assorbimento di acqua farinografici e attraverso prove preliminari di impastamento. Gli ingredienti utilizzati per la produzione di pane sono mostrati in tabella 6.11.

**Tabella 6.11.** Ingredienti utilizzati per la produzione di pane e quantità utilizzata (g)

| <b>Ingredienti</b> | <b>Miscela 1</b> | <b>Miscela 2</b> |
|--------------------|------------------|------------------|
| Farina tipo "00"   | 1700             | 1632             |
| Germe di grano     | 0                | 68               |
| Malto              | 4,76             | 5,78             |
| Sale               | 27,2             | 27,2             |
| Lievito            | 42,5             | 42,5             |
| Acqua (mL)         | 1022             | 1115             |

**Miscela 1:** farina 00 ; **Miscela 2:** farina +4% germe di frumento tenero tal quale

I pani così ottenuti sono stati valutati dal punto di vista chimico, nutrizionale e sensoriale.

In tabella 6.12 sono riportate la composizione chimica, espressa come % s.s., il contenuto in lisina (g/100g proteine) e l'indice chimico dei campioni di pane prodotti.

**Tabella 6.12.** Composizione chimica chimica (% s.s.) e contenuto in lisina (g/100g proteine) nei campioni di pane prodotti

| Campione | Ceneri<br>(% s.s.) | Proteine<br>(% s.s.) | Lipidi<br>(% s.s.) | Fibra % s.s. |          |      | Lisina<br>(g/100g<br>proteine) | Indice<br>chimico <sup>a</sup> |
|----------|--------------------|----------------------|--------------------|--------------|----------|------|--------------------------------|--------------------------------|
|          |                    |                      |                    | Ins.         | Sol.     | Tot. |                                |                                |
| Pane 1   | 1,77±0,04          | 11,0±0,08            | 0,8±0,16           | 1,5±0,24     | 0,6±0,11 | 2,1  | 2,30±0,08                      | 40                             |
| Pane 2   | 1,57±0,07          | 11,8±0,11            | 0,9±0,12           | 1,6±0,19     | 0,8±0,07 | 2,4  | 2,85±0,14                      | 49                             |

Pane 1: farina 00 ; Pane 2: farina +4% germe di frumento tenero tal quale

a: calcolato sulla base del pattern amminoacidico di riferimento della FAO/WHO (1991)

Dai dati riportati in tabella emerge che il pane 2, prodotto con germe, presenta, rispetto al controllo, un arricchimento in proteine e lipidi di circa il 10%. Il campione di pane arricchito con germe mostra, inoltre, un maggior contenuto in fibra sia solubile che insolubile rispetto al pane controllo. L'arricchimento in lisina del pane 2 rispetto al pane di sola farina è di circa il 25%, a cui corrisponde un miglioramento dell'indice chimico che passa da 40 a 49.

Sui campioni di pane è stato determinato il contenuto in carotenoidi e tocoli. La tabella 6.13 mostra il contenuto in tocoferoli, tocotrienoli e la corrispondente attività vitaminica E espressa come tocoferolo equivalente dei campioni di pane prodotti.

**Tabella 6.13.** Contenuto in tocoferoli, tocotrienoli e attività vitaminica E (mg/100g s.s.) nei campioni di pane

| Campione | $\alpha$ -T | $\alpha$ -T3 | $\beta$ -T | $\gamma$ -T | $\beta$ -T3 | $\Sigma$ T | $\Sigma$ T3 | TOT  | T.E. |
|----------|-------------|--------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|------|------|
| Pane 1   | 0,19±0,04   | 0,08±0,02    | 0,17±0,05  | n.d.        | 1,22±0,12   | 0,36       | 1,30        | 1,66 | 0,36 |
| Pane 2   | 0,57±0,11   | 0,08±0,03    | 0,26±0,06  | n.d.        | 0,81±0,09   | 0,83       | 0,89        | 1,72 | 0,76 |

Pane 1: farina 00; Pane 2: farina +4% germe di frumento tenero tal quale

Dai dati riportati in tabella emerge che il pane 2, pur presentando un aumento in tocoli totali di solo circa il 4% rispetto al controllo, è quello che mostra il maggior incremento dell'attività vitaminica E, espressa come T.E., che risulta più che raddoppiata rispetto al pane 1.

Tale aumento è dovuto principalmente all' $\alpha$ -tocoferolo che passa da una concentrazione di 0,19 mg/100g s.s. nel controllo ad una concentrazione di 0,57 mg/100g s.s. nel pane 2. Si osserva invece una diminuzione del tenore in tocotrienoli di circa il 32%. Complessivamente le raccomandazioni nutrizionali contenute nei LARN suggeriscono, in prima approssimazione, un livello raccomandato (RDA) di vitamina E, espresso come tocoferolo equivalenti, intorno agli 8 mg/die per la popolazione media italiana. L'etichettatura nutrizionale (D.L. n.4 del 3 febbraio 2011), inoltre, prevede che un alimento può essere considerato fonte di una vitamina o di un elemento minerale solo se i contenuti soddisfano il 15% della RDA, per 100 g di prodotto.

Relativamente ai tocotrienoli, sebbene sia accertata la loro azione ipocolesterolemica e antiossidante (Qureshi *et al.* 1985, 1993), non esistono dati scientifici sufficienti a definire per l'uomo dei livelli di assunzione giornaliera che potrebbero apportare dei benefici alla salute.

Le quantità di vitamina E presenti nei prodotti realizzati, espresse come tocoferolo equivalenti (T.E.), sono tali da coprire fino al 6% circa della RDA nel pane con aggiunta di germe tal quale. Il contenuto in carotenoidi dei campioni di pane, espresso in mg/kg s.s., è mostrato in tabella 6.14.

**Tabella 6.14.** Contenuto in carotenoidi (mg/kg s.s.) nei campioni di pane

| <b>Campione</b> | <b><math>\beta</math>-carotene</b> | <b>luteina</b> | <b>zeaxantina</b> | <b>TOT</b> |
|-----------------|------------------------------------|----------------|-------------------|------------|
| Pane 1          | 0,02±0                             | 0,76±0,08      | 0,03±0,01         | 0,81       |
| Pane 2          | 0,02±0                             | 0,44±0,05      | 0,04±0            | 0,50       |

Pane 1: farina 00; Pane 2: farina +4% germe di frumento tenero tal quale

La tabella 6.15 illustra le caratteristiche fisiche dei tipi di pane prodotto. Oltre al calcolo del volume e del peso, sui diversi campioni è stato determinato il colore utilizzando un colorimetro tristimolo "Minolta". Al fine di verificare se l'aggiunta di ingredienti funzionali apporta cambiamenti significativi alle caratteristiche organolettiche del prodotto finito, sui campioni di pane è stato effettuato un panel test.

**Tabella 6.15.** Caratteristiche fisiche dei pani prodotti

| <b>Campione</b> | <b>H<sub>2</sub>O<br/>nell'impasto (%)</b> | <b>Tempo impastamento<br/>(min)</b> | <b>Volume<br/>(mL)</b> | <b>Peso<br/>(g)</b> |
|-----------------|--|-------------------------------------|------------------------|---------------------|
| Pane 1          | 65   | 15                                  | 895                    | 296,8               |
| Pane 2          | 65   | 15                                  | 895                    | 297,3               |

Pane 1: farina 00; Pane 2: farina +4% germe di frumento tenero tal quale

Il pane prodotto con germe tal quale non presenta variazioni di volume rispetto al controllo. I dati relativi al colore sono riportati in tabella 6.16.

**Tabella 6.16.** Valutazione del colore nei campioni di pane prodotti

|                        | <b>Pane 1</b> | <b>Pane 2</b> |
|------------------------|---------------|---------------|
|                        | Mollica       |               |
| <b>Indice <i>L</i></b> | 65,9          | 63,9          |
| <b>Indice <i>a</i></b> | -0,85         | -0,25         |
| <b>Indice <i>b</i></b> | 12,9          | 11,8          |
|                        | Crosta        |               |
| <b>Indice <i>L</i></b> | 62,1          | 54,7          |
| <b>Indice <i>a</i></b> | 9,7           | 14,0          |
| <b>Indice <i>b</i></b> | 26,0          | 31,0          |

Pane 1: farina 00; Pane 2: farina +4% germe di frumento tenero tal quale

I campioni di pane realizzati si mostravano più scuri e più tendenti al rosso (valori *L* minori e valori *a* maggiori sulla crosta) del corrispondente campione di sola farina. Questi dati oggettivi sono verificabili da un'analisi visiva dei campioni (Figura 6.5).

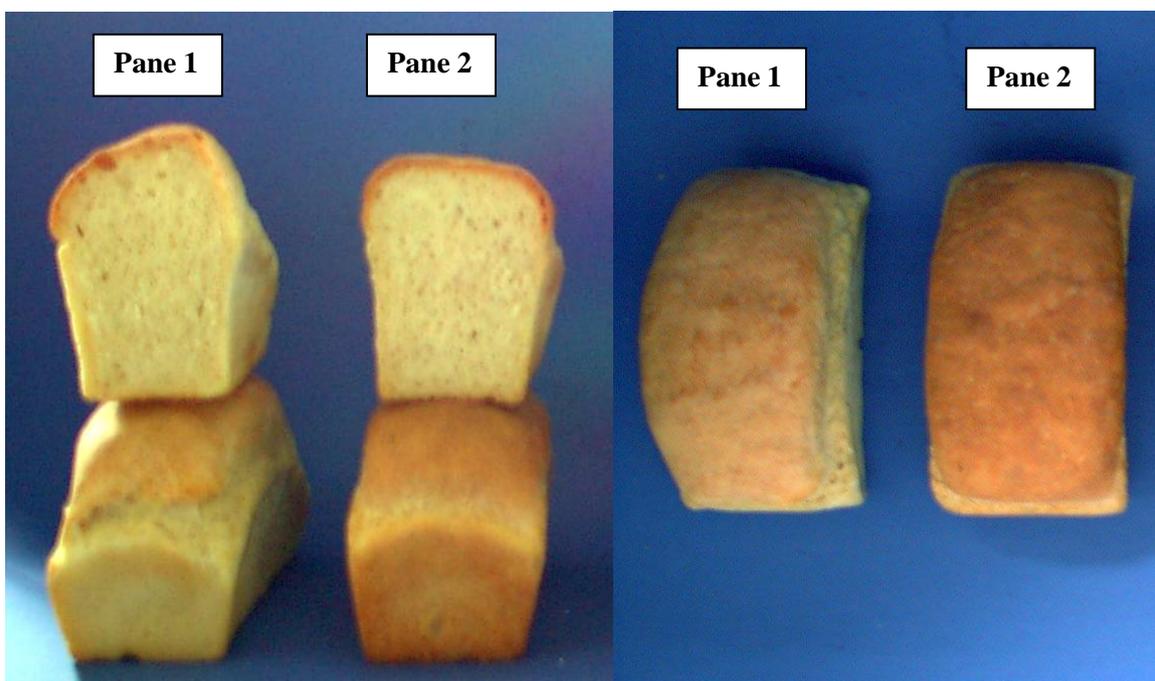
I giudizi rilasciati dal panel di assaggiatori sono riportati in tabella 6.17.

I giudizi migliori sono stati espressi per il pane 2, ossia quello addizionato di germe di frumento tenero tal quale il quale risultata più gradito rispetto al campione di pane realizzato con sola farina di frumento.

**Tabella 6.17.** Panel test sui campioni di pane prodotti

| <b>Parametri</b>         | <b>Pane 1</b>  | <b>Pane 2</b>  |
|--------------------------|----------------|----------------|
| <b>Colore crosta</b>     | Discreto       | Buono          |
| <b>Aspetto crosta</b>    | Mediocre       | Buono          |
| <b>Colpo di lama</b>     | Discreto/Buono | Buono          |
| <b>Colore mollica</b>    | Buono          | Discreto       |
| <b>Tessitura mollica</b> | Discreto       | Buono          |
| <b>Masticabilità</b>     | Discreto       | Buono          |
| <b>Odore - aroma</b>     | Discreto/Buono | Buono          |
| <b>Sapore</b>            | Discreto       | Discreto/Buono |
| <b>Giudizio globale</b>  | Discreto       | Buono          |

Pane 1: farina 00; Pane 2: farina +4% germe di frumento tenero tal quale



**Figura 6.5.** Confronto tra i campioni di pane prodotti

Pane 1: farina 00; Pane 2: farina + 4% germe di frumento tenero tal quale

### 6.2.5 Pasta fresca funzionale al germe di grano

Nell'ambito di questa indagine è stata valutata la possibilità di produrre un prodotto innovativo a base di germe di grano, quale la pasta fresca formato orecchiette. Sono state effettuate delle prove di pastificazione al fine di ottenere delle orecchiette arricchite con germe di frumento che sono state poi caratterizzate dal punto di vista chimico-nutrizionale e della loro attitudine alla conservazione.

Sulla base dei risultati ottenuti dalle analisi chimico nutrizionali e dalla valutazione della componente vitaminica e polifenolica, è stata valutata la possibilità di realizzare un prodotto innovativo a base di germe di grano, con elevate qualità nutrizionali.

Per le prove di pastificazione, alla formulazione classica per ottenere le orecchiette (semola + acqua), è stato aggiunto germe di frumento in ragione del 3%. La composizione centesimale delle orecchiette prodotte è riportata in tabella 6.18.

In figura 6.6 è schematizzato il diagramma di flusso utilizzato in questa sperimentazione per la produzione di pasta fresca.

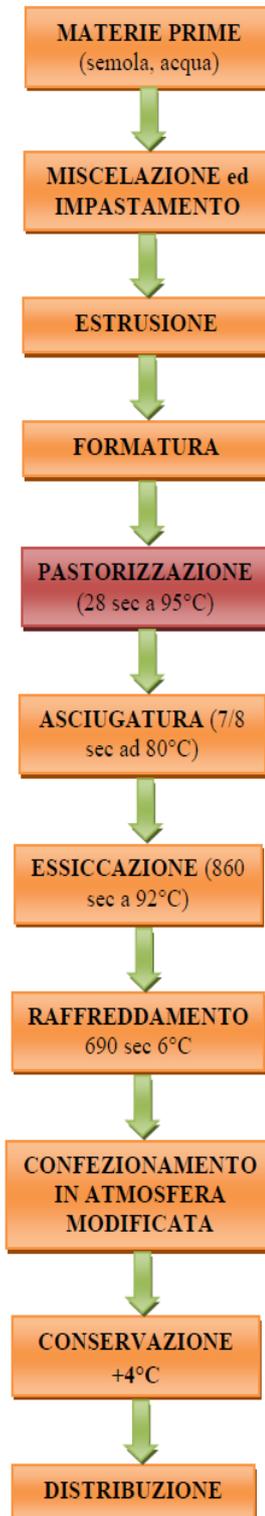
Come prevedibile, sebbene addizionato in piccola percentuale, le orecchiette al germe presentavano un contenuto in proteine maggiore rispetto alle orecchiette standard (13,0% s.s. e 12,7% s.s., rispettivamente delle orecchiette al germe e quelle standard). Anche il contenuto in grassi e fibra alimentare risultava più alto rispetto alle tradizionali, favorendo un complessivo miglioramento nutrizionale del prodotto.

Il germe contribuisce ad aumentare il valore nutrizionale ma, nel contempo, può andare incontro a processi di ossidazione conferendo alla pasta le caratteristiche tipiche dei prodotti rancidi, dovute ad incremento del numero di perossidi, e potrebbe subire un decremento del contenuto della componente vitaminica liposolubile.

**Tabella 6.18.** Composizione centesimale di orecchiette al germe di grano e delle orecchiette tradizionali

| CAMPIONE                      | UMIDITÀ (%) | PROTEINE (% s.s.) | GRASSI (% s.s.) | CENERI (% s.s.) | FIBRA ALIMENTARE (% s.s.) | CARBOIDRATI* (% s.s.) |
|-------------------------------|-------------|-------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------------|
| Orecchiette standard          | 26,4±0,04   | 12,7±0,16         | 2,3±0,12        | 0,88±0,06       | 4,9±0,18                  | 52,82                 |
| Orecchiette al germe di grano | 20,2±1,04   | 13,0±0,21         | 3,1±0,07        | 0,79±0,02       | 5,8±0,24                  | 57,3                  |

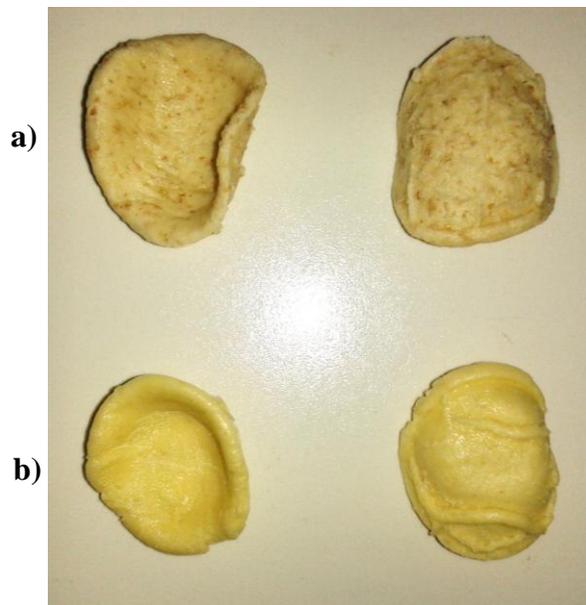
\*calcolato per differenza



**Figura 6.6.** Schema di produzione della pasta fresca

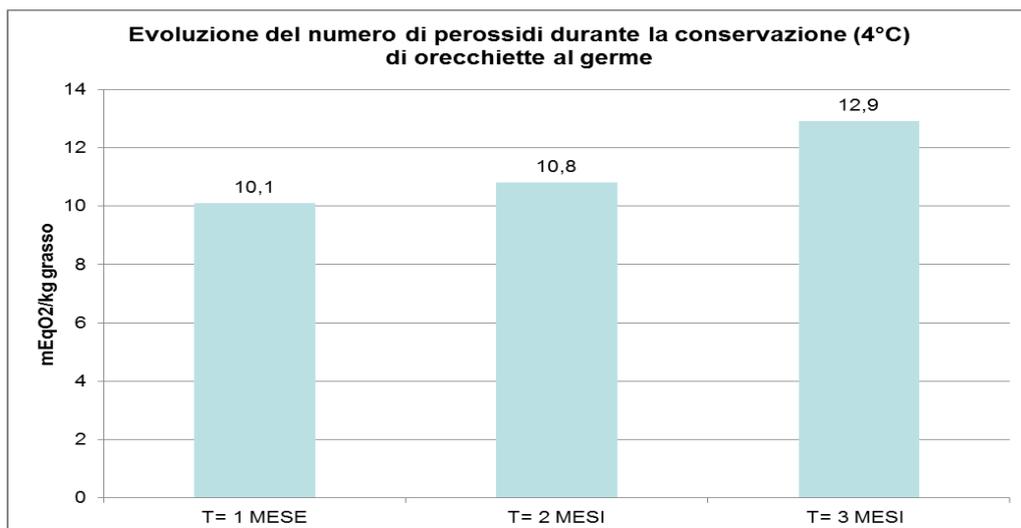
### 6.2.6 Valutazione della stabilità/shelf life di orecchiette fresche al germe

Sulle orecchiette realizzate (Figura 6.7) sono state effettuate valutazioni atte a definire la stabilità all'ossidazione mediante la valutazione del numero di perossidi e l'andamento del contenuto in vitamina E. Le analisi sono state eseguite sul campione conservato a 4°C e al buio, al fine di evitare fenomeni di ossidazione della componente grassa. Nell'arco di tre mesi sono state studiate le modifiche subite dalle orecchiette. La scelta di effettuare queste valutazioni fino a tre mesi è stata dettata dal fatto che generalmente questa tipologia di prodotto (pasta fresca pre-confezionata pastorizzata) ha, come previsto dalla legge, tempo massimo di conservazione pari a 90 giorni (D.M. 9 febbraio 2001, n.187).



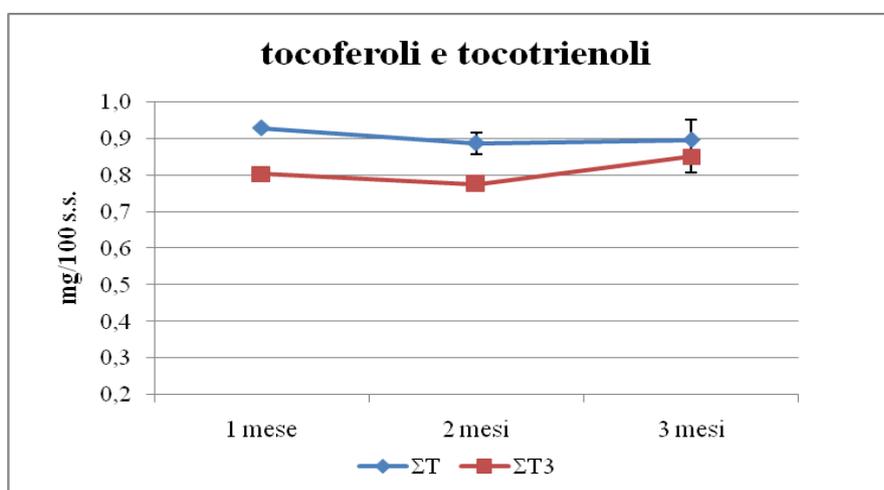
**Figura 6.7.** Confronto tra orecchiette arricchite con germe (a) e orecchiette standard (b)

In figura 6.8 è riportata l'evoluzione del contenuto in numero di perossidi. Nel corso della conservazione non sono stati registrati degli incrementi significativi del numero di perossidi, il cui contenuto è strettamente legato alla qualità del germe di frumento utilizzato per la preparazione delle orecchiette. Visti i valori contenuti (massimo 12,9 meq O<sub>2</sub>/kg di grasso dopo 3 mesi di conservazione), si può affermare che la conservazione a 4°C non influisce in modo incisivo sulla stabilità della frazione lipidica. Si auspica comunque l'utilizzo di un packaging opportuno che garantisca per tutta la vita del prodotto una protezione oltre che all'ossigeno, anche dall'esposizione alla luce diretta.



**Figura 6.8.** Evoluzione del numero di perossidi durante la conservazione di orecchiette al germe di grano

Quanto osservato per il numero di perossidi, trova conferma nel cambiamento altrettanto contenuto dei tocoferoli e i tocotrienoli nel tempo. Infatti, come si evince dalla figura 6.9, non ci sono state delle variazioni significative nel corso del periodo di osservazione e pertanto si può affermare che la conservazione non porta a cambiamenti nel contenuto vitaminico.



**Figura 6.9.** Evoluzione del contenuto di tocoferoli e tocotrienoli in orecchiette al germe di grano

### 6.2.7 Valutazione della componente microbica delle orecchiette al germe di grano

La pasta fresca, per il suo contenuto di umidità e attività dell'acqua, risulta un ottimo terreno per lo sviluppo di muffe che, con un errato sistema di confezionamento, possono svilupparsi anche prima dei 90 giorni definiti dalla legge come durabilità massima di un prodotto fresco pastorizzato preconfezionato quale la pasta fresca.

Contestualmente alle prove di stabilità all'ossidazione, durante il periodo di conservazione di 90 giorni, sulle orecchiette al germe di grano sono state effettuate anche delle prove microbiologiche preliminari atte a valutare l'incidenza della presenza del germe sulla componente microbica.

Dai risultati riportati in tabella 6.19 è stato possibile apprezzare che la pasta al momento del confezionamento era caratterizzata da livelli di carica irrilevabili relativamente ai microrganismi oggetto di studio.

Tale situazione ha caratterizzato i campioni fino al trentesimo giorno di conservazione.

**Tabella 6.19.** Valutazione della carica microbica in orecchiette al germe di grano conservate per 90 giorni.

|   | <b>0 gg</b> | <b>30 gg</b> | <b>60 gg</b>      | <b>90 gg</b>      |
|---|-------------|--------------|-------------------|-------------------|
| <b>a<sub>w</sub></b>                            | 0,923       | 0,923        | 0,923             | 0,924             |
| <b>pH</b>                                       | 6,46        | 6,46         | 6,47              | 6,47              |
| <b>Mesofili totali</b>                          | <10         | <10          | 5*10 <sup>2</sup> | 2*10 <sup>3</sup> |
| <b>Enterobatteri</b>                            | <10         | <10          | <10               | <10               |
| <b>Coliformi</b>                                | <10         | <10          | <10               | <10               |
| <b><i>Bacillus spp</i></b>                      | <100        | <100         | <100              | 5*10 <sup>2</sup> |
| <b><i>Bacillus cereus</i></b>                   | <100        | <100         | <100              | <100              |
| <b>Staphylococchi<br/>Coagulasi Positivi</b>    | <100        | <100         | <100              | <100              |
| <b>Eumiceti</b>                                 | <100        | <100         | <100              | <100              |
| <b><i>Salmonella spp</i> in 25g</b>             | assente     | assente      | assente           | assente           |
| <b><i>Listeria<br/>monocytogenes</i> in 25g</b> | assente     | assente      | assente           | assente           |

Solo al 60° giorno di conservazione è stata apprezzata la presenza, pur se contenuta, dei mesofili totali che si sono attestati intorno a valori di 5\*10<sup>2</sup> UFC/g, livelli che, comunque, rientrano pienamente nei limiti prefissati dall'azienda in merito a tale tipologia di prodotto,

per soddisfare i requisiti igienici previsti dall'HACCP, ma non definiti chiaramente dalla legge.

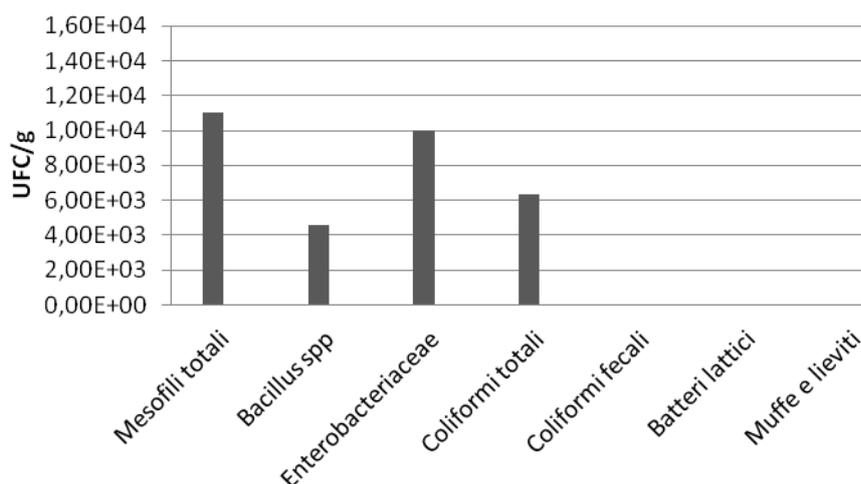
Una qualità microbiologica accettabile e in linea con quanto previsto dai criteri aziendali è stata riscontrata anche dopo 90 giorni di conservazione. A tale epoca, infatti, accanto ai mesofili totali, che hanno raggiunto livelli di  $2 \cdot 10^3$  UFC/g, è stata evidenziata la presenza, nella misura di  $5 \cdot 10^2$  UFC/g, di sole specie riconducibili a *Bacillus* spp. Degno di nota, a tal proposito, è il dato dal quale si evince che nessuno dei batteri di cui è stata apprezzata la presenza era riconducibile alla specie *Bacillus cereus*. Infatti, la presenza di forme microbiche riconducibili a tale specie è risultata irrilevabile durante l'intero periodo di osservazione considerato.

Tenendo conto dello stato di ossidazione del prodotto dopo 90 giorni dalla produzione e delle prove microbiologiche condotte nello stesso periodo, si può affermare che l'utilizzo del germe di grano nella preparazione di pasta fresca, oltre a costituire un mezzo per implementare la qualità nutrizionale del prodotto, favorisca una migliore conservazione del prodotto stesso. Pertanto si è proceduti con l'ulteriori prove atte a verificare l'effettiva azione stabilizzante del germe, cercando di capire a quali componenti è imputabile tale effetto.

### **6.3 Caratterizzazione microbiologica del germe di grano**

Al fine di descrivere la comunità microbica caratterizzante il germe di frumento, sono stati effettuati conteggi vitali in piastra delle principali popolazioni microbiche che potrebbero maggiormente contaminare le cariossidi di frumento. Dai risultati riportati in figura 6.10 è possibile apprezzare che i microrganismi mesofili totali sono stati quelli maggiormente presenti all'interno del campione, attestandosi intorno a valori di circa  $1,1 \cdot 10^4$  UFC/g; dello stesso ordine di grandezza è risultata anche la presenza di enterobatteri, le cui cariche si sono attestate intorno a valori di circa  $1,0 \cdot 10^4$ . All'interno degli enterobatteri, i coliformi totali hanno fatto apprezzare livelli di carica degni di nota e pari a  $6,3 \cdot 10^3$ , mentre i coliformi fecali sono risultati irrilevabili.

Di rilievo è stata la presenza di forme microbiche presumibilmente riconducibili al genere *Bacillus* che si sono attestati intorno a livelli di carica pari a  $4,6 \cdot 10^3$ , mentre non sono stati registrati livelli di crescita rilevabili durante le prove eseguite su lieviti, muffe e batteri lattici.



**Figura 6.10.** Livelli di carica delle differenti popolazioni microbiche contaminanti il germe di grano

#### ***6.4 Valutazione dell'attività antimicrobica degli estratti in vitro mediante Agar Well Diffusion Assay***

L'attività antimicrobica degli estratti fenolici ottenuti dal germe di frumento, nonché quella dei singoli standard degli acidi fenolici (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), riscontrati all'interno dell'estratto in seguito ad identificazione HPLC, è stata esaminata mediante la tecnica Agar Well Diffusion Assay.

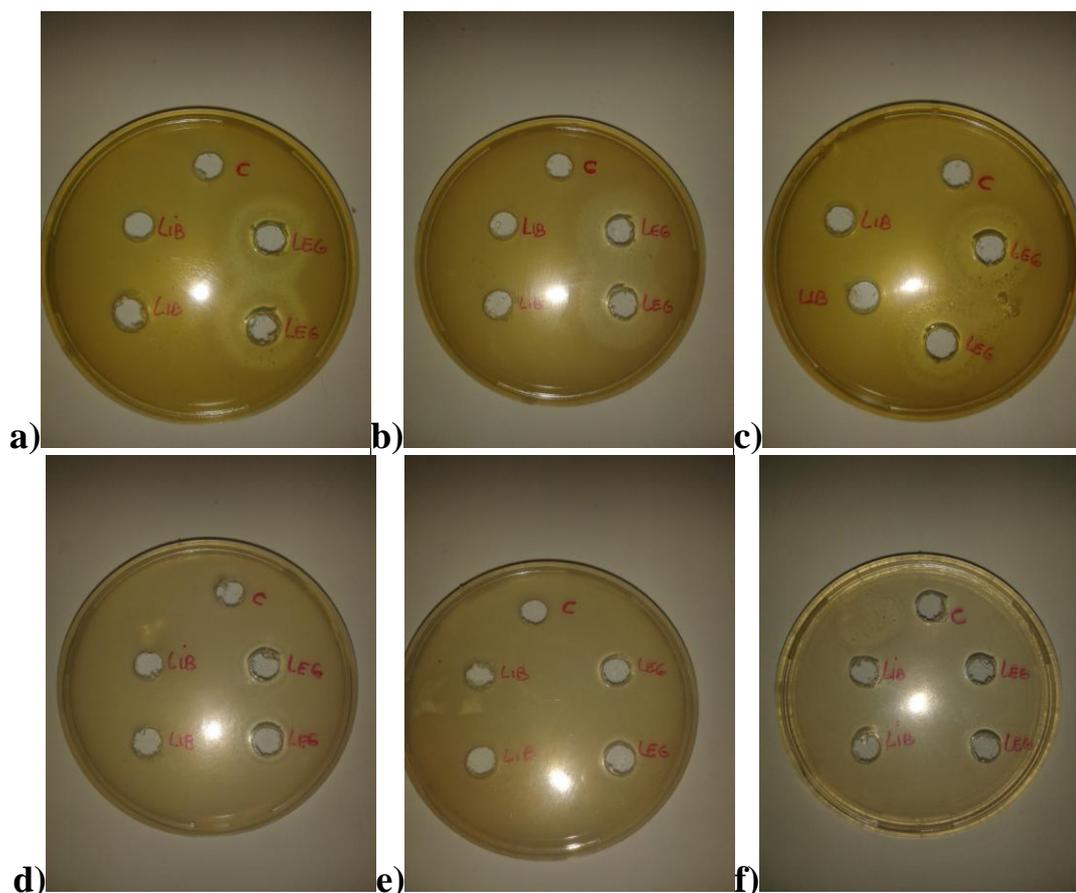
I risultati dell'Agar Well Diffusion Assay riportati in tabella 6.19 hanno permesso di ottenere uno screening rapido volto all'accertamento dell'attività antimicrobica degli estratti fenolici e dei singoli acidi fenolici. Infatti, la misura dell'alone d'inibizione fornisce una preliminare e rapida stima quali-quantitativa dell'attività antimicrobica di una determinata molecola o sostanza essendo direttamente proporzionale all'intensità dell'effetto inibitorio (Pongtharankul & Demirci, 2004).

Le specie microbiche utilizzate per le prove di Agar Well Diffusion sono state scelte in quanto rappresentano le principali specie alteranti che si riscontrano durante la conservazione degli alimenti e sono la causa del deterioramento del prodotto con conseguente perdita di shelf life.

Dai dati è emersa una differente efficacia antimicrobica espressa dalle componenti libere e legate presenti nel germe. In dettaglio, l'estratto costituito dai fenoli liberi del germe non ha fatto registrare alcuna azione inibitoria nei confronti dei ceppi indicatori; mentre l'estratto di fenoli presenti in forma legata nel germe, pur se con differente intensità, ha prodotto l'inibizione della totalità dei ceppi microbici oggetto dello studio (Tabella 6.20, Figura 6.11).

**Tabella 6.20.** Risultati dell'Agar Well Diffusion Assay Test dell'estratto di germe e dei singoli acidi fenolici nei confronti dei ceppi microbici oggetto di studio. I dati sono espressi in mm di diametro dell'alone d'inibizione e rappresentano la media di tre determinazioni con relativa deviazione standard

| Ceppo microbico         | Diametro alone (mm)          |                                 |                                 |                                      |                                  |                               |
|-------------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
|                         | Estratto germe Fenoli legati | Acido Vanillico (conc. 2g/100g) | Acido Siringico (conc. 2g/100g) | Acido Trans-ferulico (conc. 2g/100g) | Acido p-cumarico (conc. 2g/100g) | Siringaldeide (conc. 2g/100g) |
| <i>P. putida</i>        | 17,3±0,5                     | 10,9±0,4                        | 10,1±0,4                        | 10,4±0,2                             | 14,0±0                           | 10,5±0                        |
| <i>P. fluorescens</i>   | 17,2±0,3                     | 10,5±0,5                        | 10,4±0,2                        | 9,6±0,6                              | 14,8±1,5                         | 17,3±0,3                      |
| <i>P. fragi</i>         | 18,5±0                       | 11,1±0,2                        | 10,7±0,3                        | 10,8±0,3                             | 15,8±0,7                         | 13,0±1,4                      |
| <i>L. innocua</i>       | 11,7±1,2                     | 10,9±0,2                        | 10,2±0,3                        | 9,0±0                                | 10,6±0,2                         | 14,2±0,4                      |
| <i>C. sporogenes</i>    | 12,2±0,3                     | 10,8±0,3                        | 10,3±0,5                        | 10,3±0,6                             | 11,5±0,4                         | 11,8±0,3                      |
| <i>B. thermosphacta</i> | 11,0±0                       | 12,0±0                          | 11,8±0,3                        | 11,1±0,2                             | 11,1±0,4                         | 11,0±0                        |



**Figura 6.11.** Attività inibitoria dell'estratto di germe (liberi e legati) per i 3 ceppi di *Pseudomonas* spp oggetto di studio (a,b,c) e per i ceppi di *L. innocua*, *C. sporogenes*, *B. thermosphacta* (d, e, f)

Il differente comportamento dell'estratto di fenoli liberi rispetto a quello dei fenoli legati è da ricondurre sicuramente al contenuto totale di fenoli stessi nei due estratti. Infatti, come emerso dall'analisi cromatografica, l'estratto di fenoli legati risultava essere caratterizzato da un contenuto di acidi fenolici totali pari a 1213,26 mg/Kg, mentre l'estratto di fenoli liberi esibiva un livello di acidi fenolici totali pari ad appena 13,7 mg/Kg.

L'azione inibitoria più marcata, espressa dall'estratto di polifenoli legati nel germe, è stata prodotta nei confronti dei tre ceppi Gram negativi riconducibili alle specie *P. putida*, *P. fragi* e *P. fluorescens*. Di minore intensità è stata l'inibizione registrata nei confronti dei tre ceppi Gram positivi oggetto dello studio e riconducibili alle specie *C. sporogenes*, *L. innocua* e *B. thermosphacta*. L'evento inibitorio, di più elevata intensità nei confronti dei Gram negativi, rispetto ai Gram positivi, appare meritevole di riflessioni. Infatti, come ampiamente riportato in letteratura (Al-Reza *et al.*, 2010; Burt, 2004; Kim *et al.*, 2013), le forme batteriche Gram negative, rispetto a quelle Gram positive sono generalmente meno sensibili agli estratti vegetali. Dunque, l'estratto fenolico ottenuto dal germe potrebbe essere in possesso di peculiarità antimicrobiche di particolare interesse.

Al fine di meglio delineare la correlazione tra l'evento inibitorio e l'eventuale molecola, o gruppo di molecole, alla base dell'inibizione, è stata indagata l'intensità dell'azione antimicrobica espressa da ciascun acido fenolico presente nell'estratto fenolico del germe.

Tra i singoli composti fenolici presenti nell'estratto legato, utilizzati tutti ad una concentrazione di 2g/100g, la siringaldeide e l'acido *p*-cumarico sono quelli che hanno prodotto la più elevata attività inibitoria nei confronti dei ceppi oggetto di studio, mentre per gli altri acidi fenolici (acido vanillico, acido siringico e acido trans-ferulico) è stata registrata un'azione inibente di minore intensità.

Come è possibile apprezzare dalla Tabella 6.20 l'azione inibitoria espressa dalla maggior parte degli acidi fenolici appare sostanzialmente simile nei confronti dei batteri sia Gram negativi sia Gram positivi. Tuttavia occorre segnalare un comportamento di distinguo esibito dall'acido *p*-cumarico e dalla siringaldeide; in dettaglio, il primo ha fatto apprezzare un'azione antimicrobica più marcata nei confronti di tutte le specie riconducibili al genere *Pseudomonas* e il secondo ha prodotto una più intensa inibizione nei confronti di *P. fluorescens*.

Sicuramente sulla base dei risultati ottenuti, appare piuttosto arduo formulare un'ipotesi a supporto della più marcata e inattesa azione inibitoria espressa dall'estratto fenolico nei confronti dei ceppi Gram negativi. Tuttavia, è possibile ritenere che l'acido *p*-cumarico e la

siringaldeide, nonché la particolare combinazione della totalità degli acidi fenolici, potrebbero essere alla base della maggiore sensibilità mostrata da parte dei ceppi Gram negativi riferibili a *Pseudomonas* spp.

### 6.5 Determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC)

I risultati relativi alla determinazione della MIC hanno permesso di definire con esattezza la concentrazione minima di composti fenolici presenti in forma legata nel germe, necessaria per l'inibizione di ogni singolo ceppo microbico.

I risultati relativi alla MIC, espressa come g/L di acido fenolico, per ciascun microrganismo indicatore, sono riportati in tabella 6.21.

I dati ottenuti sono risultati essere solo in parte concordi con quanto già osservato mediante la preliminare tecnica di valutazione dell'attività inibitoria condotta mediante Agar Well Diffusion Assay.

**Tabella 6.21.** Valori di MIC rilevati per i ceppi oggetto di studio

| Ceppo microbico         | Acido Vanillico (g/L) | Acido Siringico (g/L) | Acido Trans-ferulico (g/L) | Acido <i>p</i> -cumarico (g/L) | Siringaldeide (g/L) |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------------|--------------------------------|---------------------|
| <i>P. putida</i>        | 6                     | 6                     | 7                          | 12                             | 6                   |
| <i>P. fluorescens</i>   | 14                    | 9                     | 15                         | 13                             | 6                   |
| <i>P. fragi</i>         | 13                    | 12                    | 13                         | 15                             | 4                   |
| <i>L. innocua</i>       | 14                    | 8                     | 17                         | 17                             | 15                  |
| <i>C. sporogenes</i>    | 14                    | 13                    | 17                         | 12                             | 13                  |
| <i>B. thermosphacta</i> | 8                     | 9                     | 9                          | 8                              | 2                   |

In dettaglio, i dati ottenuti confermano la maggiore resistenza esibita dai Gram positivi riconducibili alle specie *L. innocua* e *C. sporogenes*. Trova inoltre conferma, nei dati della MIC, la più elevata sensibilità delle specie di *Pseudomonas*, rispetto agli altri ceppi, nei confronti della siringaldeide. Al contrario, non appare pienamente confermata la sensibilità, precedentemente riscontrata mediante AWDA, da parte di queste ultime specie nei confronti dell'acido *p*-cumarico. Infatti, il più basso valore di MIC espresso dall'acido *p*-cumarico (8 g/L) è stato registrato nei confronti del ceppo riconducibile a *B. thermosphacta*, mentre verso le specie di *Pseudomonas* la MIC dell'acido *p*-cumarico permane intorno a valori uguali o superiori a 12 g/L.

Occorre evidenziare, inoltre, che livelli di MIC di più bassa entità sono stati prodotti nei confronti di *P. putida*, e *B. thermosphacta* da parte dell'acido vanillico, siringico e transferulico.

I dati ottenuti, pur se offrono importanti informazioni, ancora una volta, non consentono di giungere ad una chiara correlazione tra l'evento inibitorio prodotto dall'estratto fenolico e le specifiche sostanze di cui è composto. La mera somma dell'azione inibitoria espressa da ciascun acido fenolico non giustifica pienamente l'evento antagonista espresso dall'estratto fenolico nei confronti dei differenti microrganismi saggiati.

Dunque, è possibile ritenere che l'inibizione microbica prodotta dall'estratto è un processo piuttosto complesso, probabilmente basato sulla presenza di differenti "ostacoli" e, pertanto, dovuto non solo all'azione di un singolo composto fenolico, ma alla partecipazione sinergica di più sostanze fenoliche presenti nell'estratto, che potrebbero incrementare l'effetto delle sostanze prese singolarmente. Inoltre, la struttura chimica che possiedono e la tipologia di composti a cui possono essere legati, sono ulteriori fattori da tener presente e che possono essere alla base delle proprietà protettive dell'estratto di germe nei confronti dei microrganismi indesiderati.

*Sezione II*

*Quinoa*

## ***Capitolo 1. Quinoa (Chenopodium quinoa Willd)***

### ***1.1 Descrizione botanica***

La *Chenopodium quinoa Willd* (Figura 1.1) comunemente nota come quinoa, si tratta di una pianta erbacea annuale appartenente alla sottofamiglia delle *Chenopodiaceae* ed è botanicamente considerata uno pseudocereale, poiché la pianta, al pari dei cereali, presenta dei semi amidacei (acheni), ma in realtà appartiene alla stessa famiglia degli spinaci e della barbabietola da zucchero.

Questa pianta, nativa delle regioni Andine del Sud America e coltivata nelle regioni andine fin dal 3000 A.C., è stato per secoli l'alimento principale della civiltà Inca. Nel linguaggio Quechua degli Inca, la quinoa è denominata la *chisya mama*, ossia “madre di tutti i semi” questo perché al tempo degli Inca e degli Aztechi, tale alimento rappresentava, insieme al mais e alla patata, un elemento essenziale della loro alimentazione, era considerata una fonte di vita per le sue proprietà benefiche e salutari e veniva addirittura venerata come pianta sacra, perciò nota come “oro degli Inca” (Figura 1.2).

Tuttavia, in seguito alla conquista Spagnola, la coltivazione di quinoa non è stata incentivata (National Research Council, 1989) ed attualmente è limitata a zone circoscritte dell'America del Sud.



**Figura 1.1.** Pianta di *Chenopodium quinoa Willd*

#### **CLASSIFICAZIONE SCIENTIFICA**

|                       |                                  |
|-----------------------|----------------------------------|
| <b>Regno:</b>         | Plantae                          |
| <b>Divisione:</b>     | Magnoliophyta                    |
| <b>Classe:</b>        | Magnoliopsida                    |
| <b>Ordine:</b>        | Caryophyllales                   |
| <b>Famiglia:</b>      | Amaranthaceae                    |
| <b>Sottofamiglia:</b> | Chenopodiaceae                   |
| <b>Genere:</b>        | <i>Chenopodium</i>               |
| <b>Specie:</b>        | <b><i>Chenopodium quinoa</i></b> |

Negli ultimi anni, c'è stata una rivalutazione della quinoa per le sue caratteristiche agronomiche e nutrizionali, tanto che agronomi, nutrizionisti e la stessa industria alimentare

stanno valutando la possibilità di incrementare le produzioni di quinoa in altre parti del mondo, come ad esempio in Canada e la possibilità di garantire produzioni sia in termini di quantità che di qualità, tali da rispondere alle richieste delle industrie alimentari.



**Figura 1.2.** A sinistra una statua risalente all'impero Inca; a destra una fase della lavorazione della quinoa nelle regioni andine

L'interesse per la quinoa scaturisce dalla sua elevata capacità di adattamento a diversi ambienti così da renderla competitiva con i cereali comuni. La variabilità genetica della quinoa si crede sia alta, con cultivar che si sono adattate a crescere dal livello del mare a 4000 m sul livello del mare, da 40° Sud a 2° Nord, e dal freddo delle regioni montuose a climi subtropicali. Inoltre, è resistente a gelate e può crescere anche in condizioni di siccità (Coulter & Lorenz, 1990).

Per tali motivi la quinoa è stata selezionata dalla FAO come una specie destinata a offrire una risorsa di cibo sicura nei prossimi secoli.

Attualmente esistono oltre 200 varietà di quinoa, quelle più coltivate e commercializzate sono: Bear, Cherry Vanilla, Cochabamba, Dave 407, Gossi, Isluga, Kaslala, Kcoito, Linares, Rainbow, Red faro, Red head e Temuco (Saltini, 1996).

## ***1.2 Origine e diffusione***

È originaria delle regioni andine quali Perù, Bolivia ed Ecuador, dove, tutt'oggi, rappresenta l'alimento base per la popolazione. Pur crescendo spontaneamente, viene coltivata da oltre 5000 anni, ad altitudini fra i 2800 e i 4000 metri sul livello del mare.

Studi archeologici hanno dimostrato la bi-millenaria tradizione di questo pseudocereale. Durante l'epoca Inca, al momento della semina, era lo stesso re a tracciare il primo solco con la Chajilla, la vanga d'oro, e deporre il primo seme. Tuttavia, a causa del ruolo sacro che la quinoa aveva per le popolazioni andine, che lo offrivano alle diverse divinità *Quechuas*, *Aimaras* e *Incas*, all'epoca della conquista spagnola si ebbe l'ovvio conflitto con la cultura cattolica che considera invece sacro il pane di frumento, e quindi il grano, per cui la coltivazione della quinoa subì un lento declino. L'intolleranza per i rituali pagani e l'interesse dei colonizzatori alla diffusione dei cereali d'origine europea, contribuirono ulteriormente, a far cadere in oblio la quinoa, la cui coltivazione si conservò solo nelle zone più impervie e difficilmente raggiungibili, dove gli spagnoli non arrivavano.

In pochi anni, le colture importate dalla Spagna colonizzarono le terre più fertili, cancellando i piccoli terrazzamenti occupati dalla quinoa e dalle altre colture tradizionali e stravolgendo il paesaggio, la pianta finì quindi per essere disprezzata dalla stessa popolazione locale perché considerata cibo per i più poveri, come lo erano le residue comunità indigene.

Per ironia della sorte, la rivalutazione della quinoa è iniziata all'estero, lontano dalle tipiche zone di coltivazione.

Oggi giorno è soprattutto grazie al commercio equo e solidale, che la quinoa sta conoscendo una nuova rinascita divenendo oltre che semplice prodotto di sussistenza per le popolazioni locali, anche un prodotto di esportazione.

La quinoa del commercio equo e solidale proviene generalmente da coltivazioni biologiche e tale mercato è frutto della collaborazione tra la Cooperativa Terzo Mondo Altromercato (CTM) nota anche come Altromercato con l'ANAPQUI (Asociación Nacional Productores de Quinoa) della Bolivia.

Altromercato, è la prima associazione che gestisce l'importazione dei prodotti del commercio equo e solidale in Italia, e la seconda nel mondo, per dimensioni e fatturato ([www.wikipedia.org/altromercato](http://www.wikipedia.org/altromercato)). L'associazione Altromercato ha l'obiettivo di fondare la propria attività esclusivamente su processi di economia solidale e consumo responsabile, cercando di assicurare ai fornitori di materie prime, un prezzo equo e rapporti trasparenti a lungo termine e sostenendo inoltre la coltivazione biologica.

In collaborazione con Altromercato opera ANAPQUI (Asociación Nacional Productores de Quinoa), un'associazione fondata nel 1983 nella zona di Salar, sull'Altopiano Boliviano. Si tratta di una federazione di sette associazioni regionali che riunisce complessivamente 5000

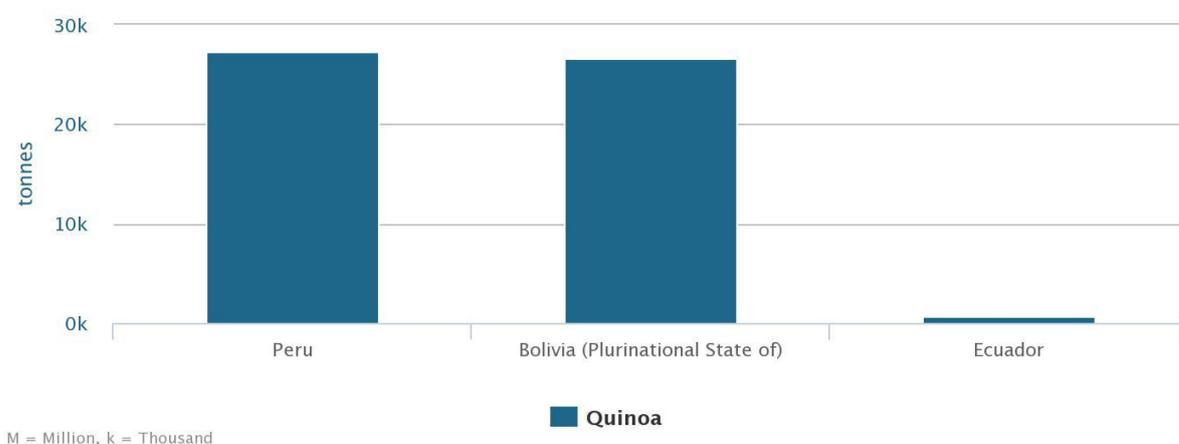
piccoli produttori di quinoa. L'associazione ha il compito di acquistare la quinoa dagli agricoltori ed esportarla a varie organizzazioni, fra cui quelle del commercio equo.

Scopo principale di Anapqui è quello di offrire ai produttori la possibilità di far giungere sul mercato il proprio prodotto a condizioni più favorevoli, vista la loro incapacità di provvedere in modo autonomo a tutte le pratiche necessarie per la commercializzazione e l'esportazione. A tale scopo Anapqui promuove forme autonome di organizzazione dei produttori con un'attività permanente di formazione e di informazione.

La valorizzazione della quinoa in campo alimentare è stata incoraggiata anche dalla FAO, che ha promosso massicciamente la coltura e diffusione di questo pseudocereale.

### ***1.3 Il mercato della quinoa***

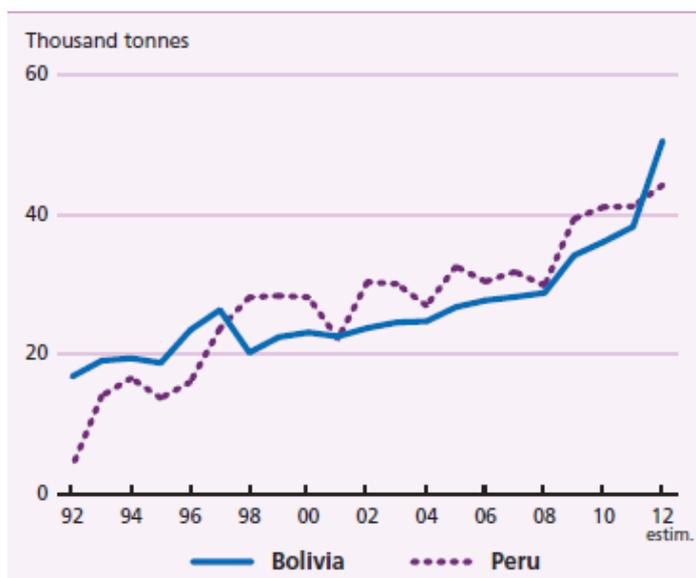
La quinoa è coltivata in Sud America ad un'altitudine tra il 5° parallelo dal polo Nord e il 30° parallelo dal polo Sud. In base ai dati della FAO i maggiori Paesi produttori sono Perù, Bolivia ed Ecuador (Figura 1.3), ma attualmente tale coltura è presente anche in Brasile, Argentina, Cile e Colombia.



**Figura 1.3.** Maggiori Paesi produttori di quinoa nel Mondo.

La FAOSTAT riferisce che, nel periodo 1992-2012, la superficie coltivata e la produzione totale di quinoa nei principali paesi produttori di Bolivia, Perù ed Ecuador sono quasi raddoppiati e triplicati, rispettivamente. Non esistono precisi dati ufficiali in Argentina o Cile per quinoa coltivata area e di produzione. Tuttavia, la produzione è nota per essere concentrata nella provincia di Jujuy in Argentina e negli altipiani del nord del Cile, anche se è nel sud del Cile centrale che si trovano le varietà importanti per l'espansione della quinoa in altre parti del mondo perché sensibili a fotoperiodismo.

La coltivazione di quinoa si sta comunque diffondendo ed è attualmente coltivata in più di 70 Paesi nel mondo. Nel 2002, 80.000 ettari sono stati registrati per essere coltivati con quinoa, principalmente nella regione andina. Come detto, i principali Paesi produttori di quinoa nella regione andina e nel mondo sono il Perù e la Bolivia (Figura 1.4). Nel 2008, questi due Paesi rappresentavano il 92% di quinoa prodotti nel mondo. Seguono gli Stati Uniti, Ecuador, Argentina e Canada, che rappresentano circa l'8% della produzione mondiale. Nel 2009, la produzione nella regione andina è stato pari a circa 70.000 tonnellate.



**Figura 1.4.** Produzioni di quinoa in Bolivia e Perù (1992-2012)

Oltre che in Sud America anche altrove si sta diffondendo la coltivazione della quinoa (Figura 1.5), in particolare in Canada, e negli USA (Colorado e New Mexico) (Risi & Galwey, 1989).



**Figura 1.5.** Zone di produzione della quinoa evidenziate in blu

Nei mercati americani, la quinoa viene solitamente importata dalla Bolivia dove trova una facile collocazione in forma di “granella ad elevato valore proteico”. L’ampia richiesta di questa coltura, ha spinto diversi agricoltori ad intraprenderne la coltivazione, nel 1987 cinque aziende agricole, in Colorado, hanno iniziato a coltivare la quinoa come un comune vegetale a fini commerciali. L’anno successivo, nel 1988, è stata poi fondata l’Associazione Nord Americana dei produttori di quinoa con la messa in funzione di un piccolo impianto di trasformazione (Johnson & Croissant, 1990). Negli Stati Uniti, attualmente, la quinoa grazie alla sua qualità nutrizionale e il versatile utilizzo in diverse preparazioni alimentari, è diffusamente venduta al pari dei comuni cereali.

I rendimenti elevati di sementi sono stati registrati in Kenya (4 t/ha) e il raccolto può essere ottenuto con successo e con alte rese in Himalaya e nelle pianure del nord dell’India.

Anche il mercato europeo sta cominciando ad aprirsi a tale coltura, soprattutto grazie all’azione di promozione da parte delle associazioni per il commercio equo. La coltivazione infatti della quinoa ha varcato i confini continentali per raggiungere la Francia, l’Inghilterra, la Svezia, la Danimarca, l’Olanda e l’Italia.

Negli anni ottanta, l’importazione di quinoa dai paesi di origine all’Europa era assicurata inizialmente da una organizzazione svizzera OS3, che riuniva tutte le richieste delle altre piccole associazioni in modo da coordinare e pianificare le ordinazioni anche secondo le esigenze dei produttori. A partire dal 1991, questo ruolo è stato assunto dalla tedesca Gepa che ha promosso, fra l’altro, la coltivazione della quinoa con il metodo biologico.

Ricerche Americane ed Europee sulla quinoa hanno fornito buoni risultati e dimostrato le potenzialità della quinoa per l’utilizzo sia della granella che del foraggio.(Mujica *et al.*,2001 a; Casini, 2002; Jacobsen *et al.*, 2003).

## ***1.4 Caratteristiche botaniche e morfologiche***

### ***1.4.1 Radice***

La pianta è a radice fittonante, molto profonda, con un sistema altamente ramificato, che le conferisce una buona stabilità e le permette un’ottima resistenza alla siccità. Le radici secondarie sono molto numerose e facilmente distinguibili dalle radici principali (Mujica *et al.*, 2001). Il colore varia a seconda del tipo di terreno in cui cresce. Durante la germinazione la prima parte che si sviluppa è la radichetta, che continua a crescere sia lateralmente sia in profondità raggiungendo anche i 180 cm. La profondità della radice è strettamente legata all’altezza della pianta. La profondità delle radici e la distribuzione delle radici laterali,

variano con il genotipo e permettono un forte ancoramento a terra e una buona resistenza della pianta alla carenza di acqua. Le dimensioni della radice sono strettamente correlate all'altezza della pianta e può superare i 30 cm, in generale comunque essa tende a svilupparsi in profondità per formare un sistema altamente ramificato così da aumentare la resistenza della pianta alla siccità.

#### ***1.4.2 Fusto***

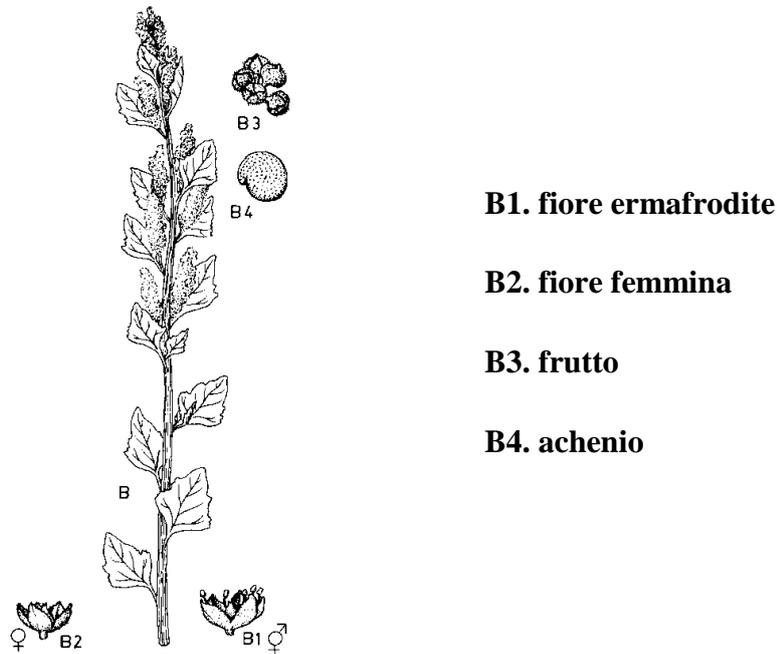
La pianta presenta un fusto legnoso eretto, che può essere ramificato o non ramificato, di altezze variabili dai 30 cm fino ai 3 m, a seconda della varietà di quinoa coltivata (Mujica *et al.*, 2001) e delle condizioni pedoclimatiche (Figura 1.6). Si presenta generalmente cilindrico con corteccia resistente quando le piante sono giovani, porosa quando le piante sono mature.

Il diametro dello stelo varia a seconda del genotipo, delle distanze di semina, alla concimazione, alle condizioni di coltivazione e varia da 1 a 8 cm. La configurazione delle ramificazioni della pianta può essere modificata dall'attacco di insetti, danni meccanici o da alcune pratiche culturali.

Al variare dei genotipi, della densità di semina, della disponibilità di nutrienti e delle aree di crescita ci possono essere piante ampiamente ramificate ("Sea level" quinoa), altre senza alcuna ramificazione (altopiano) oltre a varietà intermedie.

Il colore del fusto, così come accade nell'amaranto, è diverso a seconda dei genotipi e delle fasi fenologiche. Può assumere diverse colorazioni che vanno dal giallo pallido al rosso, in relazione alla presenza di differenti classi di pigmenti (Mabry *et al.*, 1963), mostra spesso striature, con le ascelle delle foglie o dei rami pigmentate di rosso o viola.

Lo stelo ha una epidermide cutinizzata, con membrane di cellulosa compatte, contiene al suo interno un midollo che scompare alla maturazione, lasciando il gambo secco e vuoto. Questo fusto per ricchezza e alto contenuto di pectina e cellulosa può essere utilizzato nella fabbricazione di carta e cartone.



**Figura 1.6.** Morfologia della pianta di *Chenopodium quinoa*

### ***1.4.3 Foglie***

Sul fusto sono inserite foglie piuttosto larghe, alternate su quattro livelli, sono caratterizzate da polimorfismo: le foglie più in alto sono piccole e lanceolate, mentre quelle in basso sono di grandi dimensioni, romboidali o triangolari (Hunziker, 1943).

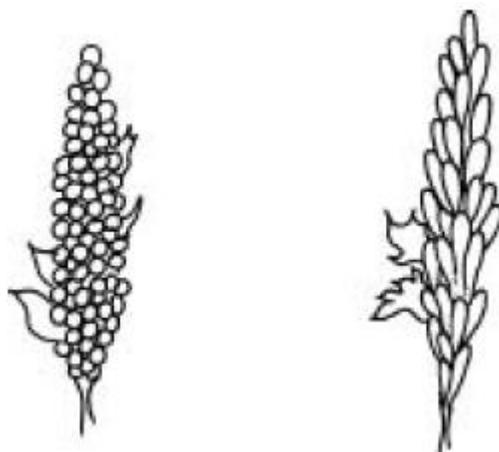
Le foglie sono formate da picciolo e lamina (Cornejo, 1976). I piccioli sono lunghi, sottili e scanalati. La lunghezza dei piccioli è variabile a seconda della varietà ma, può variare, anche all'interno della stessa pianta. La lamina fogliare è polimorfica anche nella stessa pianta e può essere a forma di diamante, triangolare o lanceolata, piatta o ondulata (Bonifacio, 2006). All'interno delle foglie sono contenuti cristalli di ossalato di calcio che riducono la traspirazione eccessiva permettendo di mantenere all'interno della pianta l'umidità adeguata.

Il colore delle foglie è molto variabile: dal verde nella piante più giovani, al rosso o viola con sfumature diverse nelle piante più mature, hanno delle venature molto pronunciate e facilmente visibili, derivanti dal fusto e sono generalmente in numero di tre. Ci sono genotipi con più foglie e altri con meno, in genere la quinoa tipo "Valley" presenta fogliame abbondante, permettendo l'utilizzo della pianta come foraggio.

In molte zone della regione andina le foglie giovani prima della fioritura, per il loro elevato valore nutrizionale contenendo vitamine, minerali e proteine idonee al consumo umano.

#### 1.4.4 Infiorescenze e fiori

È una tipica pannocchia, costituita da un asse centrale, uno secondario e uno terziario con i pedicelli che tengono i glomeruli. La pannocchia può presentare infiorescenze spargole (amarantiforme) oppure infiorescenze compatte (glomerulare) (Figura 1.7), esistono anche forme che presentano caratteristiche di transizione tra i due gruppi (Mujica *et al.*, 2001). È definita glomerulare quando le infiorescenze sono a gruppi compatti e con pedicelli ravvicinati, è amarantiforme quando i glomeruli sono allungati e l'asse centrale ha numerosi rami secondari e terziari con fiori raggruppati in ciuffi abbastanza sciolti. Sono stati così chiamati per la somiglianza che ha con l'infiorescenza del genere *Amaranthus*.



**Figura 1.7.** Forma dell'infiorescenza glomerulata e amarantiforme (Mujica *et al.*, 2001).

La lunghezza della pannocchia è variabile, a seconda del genotipo, il tipo di quinoa e delle condizioni di fertilità del suolo, raggiungendo dai 30 agli 80 cm di lunghezza e dai 5 ai 30 cm di diametro. Il numero di glomeruli per pannocchia varia da 80-120 e il numero di semi per pannocchia possono andare da 100 a 3000, con pannocchie di grandi dimensioni si possono avere delle rese fino a 500 grammi di seme per infiorescenza.

I fiori della quinoa sono incompleti poiché non presentano i petali, sono piccoli, raggiungono una dimensione massima di 3 mm, sono costituiti da una corolla composta da tepali e solitamente da cinque sepali di colore verde (Mujica *et al.*, 2001). Essendo una pianta ginomonoica la quinoa ha fiori femminili ed ermafroditi (Rea, 1969) per cui è caratterizzata da autoimpollinazione (Johnson & Ward, 1993), tuttavia fenomeni di impollinazione incrociata si verificano fino a interessare il 10-15% della coltivazione (Risi & Galwey, 1989). I fiori ermafroditi sono localizzati all'estremità distale, mentre la parte femminile

nell'estremità prossimale (Gandarillas, 1979). Sono autofertili e l'impollinazione in genere è anemofila (tramite il vento).

Giunta a maturità la pianta produce un panicolo contenente semi, detti acheni, che ricordano nell'aspetto quelli del miglio.

#### **1.4.5 Frutto**

Il frutto è un achenio indeiscente, con una forma sferica, conica o ellissoidale, con un diametro variabile tra 1,0 e 2,6 mm ed una colorazione del pericarpo estremamente variabile dal giallastro al grigio, con sfumature magenta derivanti dai pigmenti betacianini e presenta una struttura complessa. Esso è tenuto con cinque lobi del perianzio che è facilmente rimovibile mediante abrasione. È un frutto indeiscente poiché a completa maturazione non si apre spontaneamente per far uscire il seme. Si tratta di frutti molto piccoli, tanto che 1.000 acheni hanno un peso di solo 1,9-4,3 g (Koziol, 1993). Nel seme sono ben definite tre parti: episperma, embrione e perisperma.

Osservando la sezione longitudinale del seme infatti, si osserva la presenza di un sottile strato detto pericarpo che avvolge interamente l'achenio (Figura 1.8). Il pericarpo (PE) presenta una superficie esterna ruvida e fragile che viene rimossa facilmente se strofinata. In questa parte è contenuta la saponina che conferisce un gusto amaro al seme.

Al di sotto del pericarpo, è localizzato l'episperma che, oltre ad essere costituito dal pericarpo (PE), presenta un involucro protettivo (SC) e l'endosperma (EN). la colorazione dell'episperma può variare da trasparente, bianco, arancio, rosso, marrone, grigio o a volte nero (Ruales, 1998).

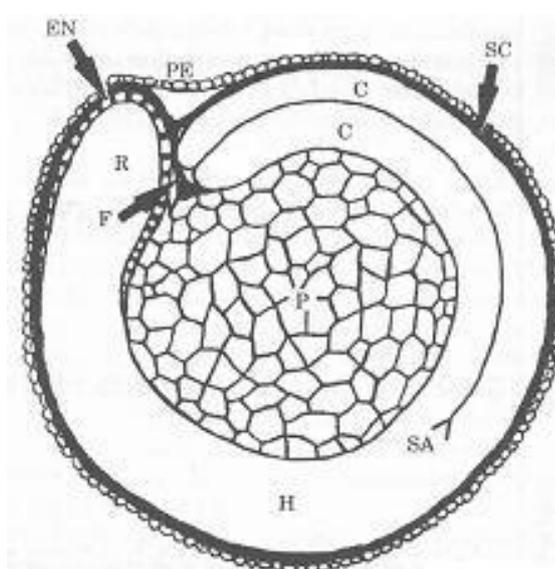
L'embrione è formato da due cotiledoni (C) e dalla radichetta (R) e costituisce il 30% del volume totale del seme, circondando il perisperma (P) come un anello, con una curvatura di 320 gradi. È giallastro misura 3,54 millimetri in lunghezza e 0,36 millimetri di larghezza. A volte raggiunge una lunghezza di 8,2 mm e occupa il 34% del seme e non di rado ci possono essere anche tre cotiledoni.

Rispetto ad altri semi l'embrione ha una maggiore quantità di proteine e raggiunge il 35-40% delle proteine totali del seme, mentre il perisperma presenta solamente il 6,3-8,3% delle proteine totali (Prego *et al.*, 1998).

Il perisperma è il tessuto di stoccaggio principale ed è costituito principalmente da granuli di amido, si presenta di colore biancastro e rappresenta quasi il 60% della superficie del seme.

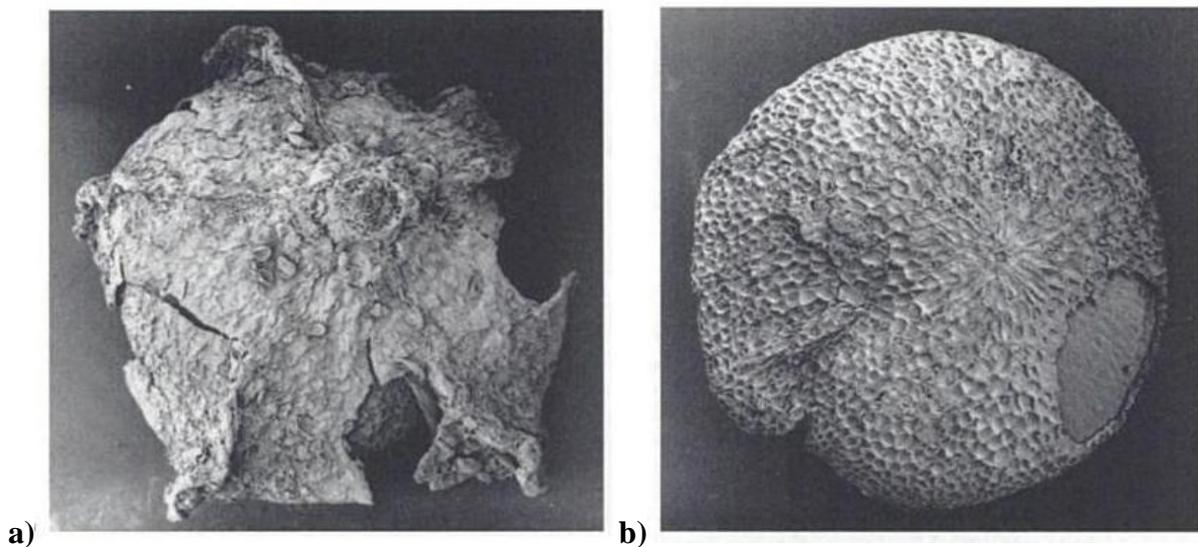
L'endosperma, anche nella quinoa, è composto da diversi strati intorno all'embrione e completamente separato probabilmente da uno strato di aria. Dopo l'idratazione del seme, le cellule dell'endosperma entrano in contatto con l'embrione e sono rapidamente consumate durante la sua crescita.

Nei cereali come mais e frumento, le principali riserve di amido sono immagazzinate nell'endosperma, nella quinoa invece l'endosperma è molto ridotto e circonda l'asse ipocotile-radicale (parte del fusticino della plantula compresa tra i cotiledoni e l'apice radicale) (Prego, 1998).



**Figura 1.8.** Sezione longitudinale di un seme di quinoa (*Chenopodium quinoa*) PE: pericarpo, SC: involucro protettivo, EN: Endosperma; C: cotiledoni, H: ipocotile; SA: meristema apicale; R: radichetta, P: perisperma; F: funicolo. (Prego *et al.*, 1998).

Sulla pianta il frutto è avvolto dal perianzio (involucro del fiore) che viene facilmente rimosso in seguito a processi di essiccamento. La figura 1.9a mostra la superficie dell'achenio di quinoa con ben evidente la presenza del perianzio e di caratteristici peli ghiandolari accartocciati sulla sua superficie esterna intorno al punto di attacco dell'infiorescenza. La figura 1.9b mostra invece l'achenio dopo la rimozione del perianzio.



**Figura 1.9.** Scansione a microscopio elettronico di acheni di quinoa

### ***1.5 Caratteristiche chimiche e valore nutrizionale***

La quinoa è un alimento altamente nutritivo, tanto che la FAO ha paragonato la qualità nutrizionale di questa coltura a quella del latte in polvere intero. La stessa FAO ha, inoltre, inserito la quinoa nel proprio programma di ricerca, con lo scopo di far fronte ai problemi di malnutrizione dei Paesi Andini, ha quindi promosso la coltivazione di una pianta dotata di estrema resistenza alle avversità climatiche, facile da coltivare ed interessante sotto l'aspetto nutrizionale ([www.associazionequinoa.it](http://www.associazionequinoa.it)).

È noto da tempo che il valore nutrizionale della quinoa è superiore ai cereali tradizionali, pertanto, questa pianta presenta un grande potenziale per il miglioramento dell'alimentazione sia umana sia animale. La valorizzazione della quinoa in campo alimentare è strettamente correlata alle sue caratteristiche compositive.

Diversi autori hanno evidenziato l'ampia variabilità della composizione chimica della quinoa, tale variazione è strettamente correlata alla tipologia di campione analizzato (achenio tal quale, sottoposto a lavaggio, decorticato/perlato).

La tabella 1.1 riporta la composizione chimica dell'achenio di quinoa. Come i cereali, la quinoa è un'eccellente fonte di amido, dal 32 a 60%, ha un buon contenuto in proteine attorno a 10-18%, il contenuto di grassi varia dal 4,4 a 8,8%, mentre le ceneri, costituite prevalentemente da potassio e fosforo, sono intorno al 2,4-3,7% e la fibra grezza tra 1,1-13,4%. Rispetto ai comuni cereali la quinoa fornisce anche un maggior apporto di vitamine del gruppo B, e di vitamina E, la più importante vitamina antiossidante liposolubile. Nella quinoa molti minerali sono presenti in concentrazioni superiori a quelli riscontrati per la

maggior parte delle colture cerealicole, a condizione però che siano presenti in forme biodisponibili.

**Tabella 1.1.** Composizione chimica dell'achenio di quinoa (g/100g s.s.)

|                   | Proteine<br>(Nx6,25) | Grassi               | Ceneri               | Fibra<br>Alimentare    | Amido                   |
|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------------------------|-------------------------|
| Achenio<br>Intero | 10-18 <sup>a</sup>   | 4,4-8,8 <sup>a</sup> | 2,4-3,7 <sup>a</sup> | 1,1-13,4 <sup>bc</sup> | 32,6-61,5 <sup>de</sup> |

**a** Coulter & Lorenz, 1990; **b** Becker & Hanners, 1990; **c** Ruales & Nair, 1993; **d** González *et al.*, 1989; **e** Wolf *et al.* 1950.

L'utilizzazione della quinoa in campo alimentare, presuppone una serie di operazioni mirate alla rimozione di frazioni ricche in composti anti nutrizionali (in particolare saponine) localizzate nel perianzio e nel pericarpo dall'achenio, responsabili della sensazione di amaro ed hanno effetti negativi sulla mucosa intestinale. Nei paesi d'origine, prima dell'utilizzo, la quinoa è generalmente sottoposta a una serie di lavaggi con acqua o acqua alcalinizzata, seguiti da uno sfregamento energico a mano degli acheni per l'allontanamento delle saponine (Simmonds, 1965). Tale pratica oltre a richiedere un notevole consumo idrico e di tempo, presenta problemi relativi al successivo smaltimento delle acque stesse e all'essiccamento degli acheni umidi. Quest'ultima operazione, oltre ad incrementare i tempi di lavorazione, deve necessariamente avvenire in condizioni controllate per evitare modificazioni dei costituenti del seme di quinoa (gelatinizzazione dell'amido, denaturazione proteica) che porterebbero a rilevanti cambiamenti delle proprietà nutrizionali e reologiche degli sfarinati di quinoa.

### **1.5.1 Proteine**

La quinoa presenta un elevato contenuto in proteine rispetto ad altri cereali, soprattutto quelli convenzionali, ma più basso rispetto ai semi oleaginosi (Mazza *et al.*, 1992). Le proteine della quinoa sono maggiormente localizzate nell'embrione (Prego *et al.*, 1998), anche se quantità significative sono state riscontrate in tutti i tessuti dell'achenio (Chauhan *et al.*, 1992). Queste proteine forniscono gli elementi di base per una rapida crescita del seme e la germinazione del polline. Test biologici hanno riscontrato una buona qualità delle proteine, confermata anche dalla valutazione dell'efficienza proteica (PER 1,95-3,10) (Guzmán-Maldonado & Paredes-López, 1998; Gross *et al.*, 1989).

L'indice di efficienza proteica, meglio conosciuta come PER, è il metodo più semplice per valutare il valore nutritivo delle proteine. Il PER rappresenta l'aumento totale di peso in grammi in relazione alla quantità di proteine consumate in grammi. Poiché è impossibile misurare l'aumento di peso in grammi nell'uomo, il PER è generalmente misurato su animali giovani e in crescita sottoposti ad una dieta il cui peso è composto per il 10% da proteine. Viene calcolato analizzando l'aumento di peso in grammi dei soggetti nutriti con una determinata dieta e la quantità di proteine assunte misurata sempre in grammi.

$$\text{PER} = \text{peso acquisito (g)} / \text{assunzione di proteine (g)}$$

Studi condotti da Koziol (1992), hanno dimostrato che le varietà di quinoa ad alto contenuto in saponine presentano un PER leggermente più basso della caseina, ma dopo la cottura l'indice di efficienza proteica raggiunge gli stessi valori osservati per la caseina.

L'assunzione delle proteine con la dieta è un problema per quelle popolazioni che raramente consumano proteine animali e che quindi hanno necessità di sostituirle con le proteine presenti in cereali e legumi. Questi alimenti, pur avendo un sufficiente apporto energetico, offrono livelli di amminoacidi essenziali inadeguati che possono contribuire ad aumentare i casi di malnutrizione. Un modo per contrastare questo problema è trovare dei semi con proteine ad alto valore biologico. A tal proposito ci sono piante alimentari che non sono state pienamente sfruttate, alcune delle quali come la quinoa, l'amaranto e il lupino rispondono a queste caratteristiche.

A differenza degli altri cereali convenzionali, la quinoa non subisce perdite rilevanti nel contenuto proteico durante la lavorazione industriale per cui i valori della tabella 1.1 coincidono con quelli dell'alimento. Ancora più rilevante è la composizione amminoacidica delle loro proteine, che rende il valore biologico della quinoa sicuramente superiore a quello degli altri cereali tradizionali.

Dal punto di vista compositivo infatti, i semi di quinoa hanno un profilo eccezionalmente ben equilibrato di amminoacidi essenziali, più del 37% delle proteine nella quinoa infatti comprendono amminoacidi essenziali (non sintetizzabili cioè dall'organismo e quindi da assumere necessariamente con la dieta) con una prevalenza in istidina, isoleucina, metionina e lisina (Tabella 1.2). L'alto contenuto in lisina della quinoa, che è di norma l'amminoacido limitante nei cereali, è correlabile all'alto contenuto in albumine e globuline (44-47% delle proteine totali) (Fairbanks *et al.*, 1990). Questo importante gruppo di proteine prende nome di "chenopodine", che hanno una composizione di amminoacidi simile alle globuline dei legumi

(Brinegar & Goundan, 1993). La quinoa si caratterizza inoltre per un ridotto contenuto in prolamine (0,5-7%) ciò indica che la quinoa è priva di glutine e quindi, può essere utilizzata per la produzione di alimenti gluten-free (Galwey, 1993; Berti *et al.*, 2004; Coulter & Lorenz, 1990; Javaid, 1997; Morita *et al.*, 2001).

La presenza di quantità rilevanti di metionina e cisteina fanno della quinoa un buon complemento ai legumi, che sono limitanti in questi due amminoacidi (Theurer-Wood, 1985). Le proteine della quinoa hanno, inoltre, i requisiti per avere un adeguato contenuto di treonina, valina e amminoacidi aromatici (fenilalanina e tirosina).

**Tabella 1.2.** Composizione amminoacidica delle proteine della quinoa comparate al pattern di riferimento FAO/WHO/UNU

| <b>Amminoacidi</b>    | <b>(g/ 100 g proteine)</b>            | <b>Pattern di riferimento</b> | <b>FAO/WHO/UNU</b>                |
|-----------------------|---------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Essenziali</i>     |                                       | <i>Adulti</i>                 | <i>Bambini in età pre-scolare</i> |
| Istidina              | 2,4 <sup>b</sup> - 3,2 <sup>c</sup>   | 1,6                           | 1,9                               |
| Isoleucina            | 3,6 <sup>a</sup> - 4,4 <sup>c</sup>   | 1,3                           | 2,8                               |
| Leucina               | 5,8 <sup>d</sup> - 6,9 <sup>e</sup>   | 1,9                           | 6,6                               |
| Lisina                | 5,1 <sup>b</sup> - 6,1 <sup>c</sup>   | 1,6                           | 5,8                               |
| Metionina+Cisteina    | 3,8 <sup>d</sup> - 4,4 <sup>f</sup>   | 1,7                           | 2,5                               |
| Fenilalanina+Tirosina | 6,6 <sup>d</sup> - 8,4 <sup>f</sup>   | 1,9                           | 6,3                               |
| Treonina              | 3,5 <sup>d</sup> - 4,4 <sup>e</sup>   | 0,9                           | 3,4                               |
| Triptofano            | 1,2 <sup>b</sup>                      | 0,5                           | 1,1                               |
| Valina                | 3,7 <sup>e</sup> - 4,9 <sup>d</sup>   | 1,3                           | 3,5                               |
| <i>Non essenziali</i> |                                       |                               |                                   |
| Alanina               | 4,1 <sup>d</sup> - 5,5 <sup>e</sup>   |                               |                                   |
| Arginina              | 7,0 <sup>b</sup> - 7,5 <sup>d</sup>   |                               |                                   |
| Acido Aspartico       | 7,3 <sup>b</sup> - 10,5 <sup>e</sup>  |                               |                                   |
| Acido Glutammico      | 11,9 <sup>b</sup> - 17,3 <sup>e</sup> |                               |                                   |
| Glicina               | 5,2 <sup>b</sup> - 6,3 <sup>e</sup>   |                               |                                   |
| Prolina               | 3,1 <sup>b</sup> - 3,5 <sup>e</sup>   |                               |                                   |
| Serina                | 3,7 <sup>b</sup> - 5,6 <sup>e</sup>   |                               |                                   |

<sup>a</sup> WHO, 1985; <sup>b</sup> Coulter e Lorenz, 1990; <sup>c</sup> Atwell *et al.*, 1983; <sup>d</sup> Becker e Hanners, 1990; <sup>e</sup> Ranhotra *et al.*, 1993; <sup>f</sup> Theurer –Wood, 1985

Brinegar *et al.* (1996) attraverso studi elettroforetici dimostrarono che le proteine della quinoa sono costituite da due grandi frazioni, la 11S-globulina e la 2S-proteina.

La 11S-globulina, chiamata anche chenopodio, caratterizzata da Brinegar e Goundan (1993), rappresenta circa il 37% del totale delle proteine. Tale frazione contiene polipeptidi con peso molecolare di 22-23 kDa e 32-39 kDa e presenta un contenuto relativamente basso in amminoacidi solforati (metionina e cisteina) (Brinegar & Goundan, 1993). La frazione 2S-proteina ha un peso molecolare di 9 kDa, presenta un elevato contenuto in cisteina, arginina e istidina, ma è relativamente povera in metionina (Brinegar *et al.*, 1996).

Se si confronta la composizione amminoacidica della quinoa con quella di altri alimenti (Tabella 1.3), si può facilmente notare che essa è differente da quella di un cereale. La quinoa può essere paragonata invece, in termini di composizione di amminoacidi, con altre fonti di proteine (soia, latte scremato).

**Tabella 1.3.** Confronto della composizione in amminoacidi essenziali della quinoa con altre fonti alimentari

| Amminoacidi         | Contenuto di amminoacidi (g/100g proteine) |       |      |                |
|---------------------|--|-------|------|----------------|
|                     | Quinoa                                     | Grano | Soia | Latte scremato |
| <b>Isoleucina</b>   | 4,0  | 3,8   | 4,7  | 5,6            |
| <b>Leucina</b>      | 6,8  | 6,6   | 7,0  | 9,8            |
| <b>Lisina</b>       | 5,1  | 2,5   | 6,3  | 8,2            |
| <b>Fenilalanina</b> | 4,6  | 4,5   | 4,6  | 4,8            |
| <b>Tirosina</b>     | 3,8  | 3,0   | 3,6  | 5,0            |
| <b>Cistina</b>      | 2,4  | 2,2   | 1,4  | 0,9            |
| <b>Metionina</b>    | 2,2  | 1,7   | 1,4  | 2,6            |
| <b>Treonina</b>     | 3,7  | 2,9   | 3,9  | 4,6            |
| <b>Triptofano</b>   | 1,2  | 1,3   | 1,2  | 1,3            |
| <b>Valina</b>       | 4,8  | 4,7   | 4,9  | 6,9            |

**Fonte:** Johnson & Aguilera, 1980

La quinoa ha un contenuto di lisina più che doppio rispetto a quello di frumento, mais e riso e più che triplo rispetto a quello di sorgo e miglio. Anche rispetto ai cereali più ricchi di lisina, come orzo, segale e avena, il contenuto della quinoa è comunque superiore.

Questo valore però non è sufficiente a raggiungere gli standard FAO per la composizione amminoacidica ideale. Infatti, la lisina contenuta nella quinoa è pari al 96% del quantitativo sufficiente a raggiungere gli standard FAO, e resta di conseguenza un amminoacido limitante. Si tratta comunque del valore più alto in assoluto tra tutti i cereali.

La leucina è il secondo amminoacido limitante, ma anche in questo caso si tratta di una limitazione moderata. Secondo gli standard FAO, il contenuto di questo amminoacido è pari al 91% del quantitativo ottimale. Di conseguenza, anche la quinoa si avvantaggia della complementazione con altri alimenti (legumi, formaggio, latte, uova, carne) per essere più completa. L'integrazione ad esempio con il mais, ma anche frumento, riso e sorgo è molto importante soprattutto per le popolazioni del terzo mondo, per le quali è più facile avere a disposizione cereali piuttosto che legumi e soprattutto alimenti di origine animale.

### ***1.5.2 Lipidi***

La quinoa è stata considerata una coltura alternativa ai semi oleosi per la sua composizione lipidica. Il contenuto in grasso della quinoa è piuttosto elevato (5-10%) se paragonato ai comuni cereali ed è localizzato principalmente nell'embrione (Prego *et al.*, 1998). I lipidi polari rappresentano circa il 25% dei lipidi totali costituiti principalmente da fosfolipidi (lisofosfatidil etanolamina e colina) (Przybylski *et al.*, 1994). Dei lipidi neutri invece (gliceridi e steroli), i trigliceridi incidono per il 74%, i digliceridi per il 20% mentre monogliceridi e cere rappresentano il 3% rispettivamente.

Tra gli acidi grassi è rilevante la presenza dell'acido linoleico (n-6) e linolenico (n-3) che complessivamente rappresentano dal 55 al 63% del totale degli acidi grassi (Tabella 1.4), mentre l'acido oleico rappresenta circa il 30% degli acidi grassi totali.

Gli acidi grassi omega-6 e omega-3 sono acidi grassi essenziali perché non possono essere sintetizzati dagli esseri umani, che deve ottenerli tramite gli alimenti. L'acido linoleico è metabolizzato ad acido arachidonico e l'acido linolenico ad acido eicosapentaenoico (EPA) e ad acido docosaesaenoico (DHA). EPA e DHA svolgono importanti ruoli nel metabolismo delle prostaglandine, trombosi e aterosclerosi, sull'immunologia, infiammazioni e sulla funzione della membrana.

Come detto quindi l'olio della quinoa è ricco in acidi grassi monoinsaturi (oleico) e polinsaturi (linoleico e linolenico) con una composizione simile a quella dell'olio di soia (Wood *et al.*, 1990). L'olio è particolarmente stabile per la presenza di un alto contenuto di antiossidanti naturali, quali  $\alpha$ -tocoferoli (69-75 mg/100g di olio) e  $\gamma$ -tocoferoli (76-93 mg/100g di olio). Il contenuto di tali composti decresce fino a 45 e 23 mg, rispettivamente, dopo raffinazione dell'olio (Koziol, 1992). La quinoa, inoltre presenta un'elevata qualità e quantità di olio per cui è stata definita da alcuni autori come uno pseudo-seme oleoso (Koziol, 1993).

**Tabella 1.4.** Composizione in acidi grassi del grasso di quinoa

| Acidi grassi               |              | (g/100 g grasso) |
|----------------------------|--------------|------------------|
| Acido Miristico            | C 14:0       | 0,1              |
| Acido Palmitico            | C 16:0       | 9,7              |
| Acido Palmitoleico         | C 16:1 (n-7) | 0,2              |
| Acido Stearico             | C 18:0       | 0,6              |
| Acido Oleico               | C 18:1 (n-9) | 24,8             |
| Acido Linoleico            | C 18:2 (n-6) | 52,3             |
| $\alpha$ -acido Linolenico | C 18:3 (n-3) | 3,9              |
| Acido Arachidonico         | C 20:0       | 0,4              |
| Acido Eicosanoico          | C 20:1       | 1,4              |
| Acido Eicosadienoico       | C 20:2 (n-4) | 0,2              |
| Acido Beenico              | C 22:0       | 0,5              |
| Acido Erucico              | C 22:1 (n-9) | 1,4              |
| Acido Lignocerico          | C 24:0       | 0,2              |
| Acido Nervonico            | C 24:1 (n-9) | 0,4              |

Da Ruales & Nair, 1993

L'alto livello di insaturazione dovrebbe aumentare in maniera significativa la suscettibilità della frazione lipidica all'irrancidimento ossidativo tuttavia la presenza di antiossidanti naturali soprattutto tocoferoli ( $\alpha$ -tocoferolo 5,3 mg/100 g e  $\gamma$ -tocoferolo 2,6 mg/100 g) limita in maniera considerevole l'innesco dell'ossidazione fungendo da naturale difesa contro di essa (Bhargava *et al.*, 2006).

Lo squalene e i fitosteroli sono elementi presenti nella frazione lipidica insaponificabile dei prodotti alimentari (come i tocoferoli). Lo squalene è un intermediario nella biosintesi del colesterolo, ed è presente in concentrazioni di 33,9-58,4 mg/100g nella frazione lipidica della quinoa. È il precursore biochimico di tutta la famiglia degli steroidi e possiede una efficace attività antiossidante. I tocotrienoli hanno altre importanti funzioni, in particolare servono a mantenere il sistema cardiovascolare sano e possiedono un ruolo nella protezione contro il cancro.

I fitosteroli sono componenti naturali delle membrane delle cellule vegetali che troviamo abbondanti negli oli vegetali, semi e cereali. I fitosteroli hanno differenti effetti biologici come antiinfiammatorio, antiossidante, attività antitumorale e riduzione del colesterolo. I livelli di fitosteroli della quinoa sono di 63,7 mg/100g di  $\beta$ -sitosterolo, 15,6 mg/100g di campesterolo e 3,2 mg/100g di stigmasteroli, che sono gli steroli vegetali più abbondanti. Questi livelli sono superiori a quelli che riscontriamo nell'orzo e nel mais, ma inferiore a quelli presenti nelle lenticchie e nei ceci. I fitosteroli sono importanti elementi della dieta per abbassare le lipoproteine a bassa densità (LDL).

### 1.5.3 Carboidrati

I carboidrati possono essere classificati in base al loro grado di polimerizzazione in tre gruppi principali: gli zuccheri semplici (monosaccaridi, disaccaridi), oligosaccaridi e polisaccaridi (amidi).

I carboidrati contenuti nella quinoa sono paragonabili a quelli di orzo e riso (Tabella 1.5).

**Tabella 1.5.** Composizione in carboidrati nei semi di quinoa, riso e orzo (% su base secca)

|                                   | <i>Quinoa</i> | <i>Riso</i> | <i>Orzo</i> |
|-----------------------------------|---------------|-------------|-------------|
| <b>Carboidrati per differenza</b> | 73,6-74       | 79,2        | 77,7        |
| <b>Amido</b>                      | 52,2 - 69,2   |             |             |
| <b>Totale fibre dietetiche</b>    | 7 - 9,7       | 2,8         | 15,6        |
| <b>Fibre solubili</b>             | 6,8 - 8,4     |             |             |
| <b>Fibre insolubili</b>           | 1,3-6,1       |             |             |
| <b>Zucchero</b>                   | 2,9           |             | 0,8         |

I carboidrati svolgono una funzione di base nella nutrizione e possono avere diversi effetti sul metabolismo, sul controllo della glicemia e insulina, sulla glicosilazione delle proteine, sul metabolismo del colesterolo e dei trigliceridi.

I carboidrati della quinoa possono essere considerati come un cibo nutraceutico, perché hanno benefici effetti ipoglicemici e inducono un abbassamento degli acidi grassi liberi. Gli studi effettuati in soggetti con celiachia hanno mostrato che l'indice glicemico della quinoa è risultato leggermente inferiore, oltre ad indurre livelli più bassi di acidi grassi liberi e concentrazioni inferiori di trigliceridi rispetto alla pasta e al pane senza glutine.

#### 1.5.3.1 Amido

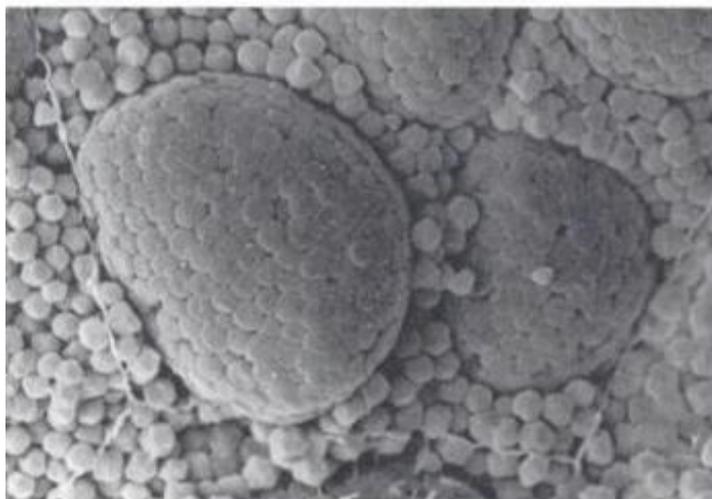
L'amido è il principale componente ed è presente dal 52,2 al 69,2% del seme e si presenta sottoforma di piccoli granuli di 1,5-2  $\mu\text{m}$  di diametro (Chauhan *et al.*, 1992).

L'amido è un carboidrato polisaccaridico che consiste di un gran numero di unità di glucosio unite tra loro da un legame glicosidico. È composto da due polimeri: amilosio, che è un polimero lineare in cui le unità di glucosio sono legate tra loro con legami  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) e amilopectina, che è un polimero ramificato che presenta catene di base di struttura simili all'amilosio che si dispongono a formare una struttura ramificata attraverso l'innesto di catene laterali tramite legami  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6).

Diversi studi sono stati intrapresi per caratterizzare l'amido di quinoa (Atwell *et al.*, 1983; Lorenz, 1990; Ahamed *et al.*, 1996; Praznik *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2002).

I granuli sono localizzati nel perisperma singolarmente o aggregati a formare strutture più complesse formate da centinaia di granuli individuali (Lorenz, 1990) sebbene piccoli quantitativi si trovano anche nell'embrione (Prego *et al.*, 1998). I granuli individuali (Figura 1.10) sono di forma poligonale, con un diametro di 1,0-2,5  $\mu\text{m}$  mentre i granuli complessi sono ovali, con un diametro di 6,4-32  $\mu\text{m}$  (Atwell *et al.*, 1983).

L'amido nella quinoa è altamente ramificato, con un minimo di polimerizzazione di 4600 unità di glucano e un massimo di 161.000 unità. La lunghezza della catena può dipendere dalla varietà di quinoa, ma è nell'ordine di 500-6000 unità di glucosio. Il grado medio di polimerizzazione dell'amilosio della quinoa (900) è inferiore a quello dell'orzo (1700). L'amilosio ha una media di 11,6 catene per molecola, la lunghezza della catena dell'amilopectina della quinoa è di circa 6700 unità di glucano.



**Figura 1.10.** Scansione al microscopio elettronico di parti di un perisperma di quinoa che mostra la composizione dei granuli di amido incastrati in un granulo di amido semplice

L'amilopectina della quinoa, come quella dell'amaranto e del grano saraceno, contiene un gran numero di catene corte da 8 a 12 unità e un piccolo numero di catene più lunghe di circa 13-20 unità, rispetto agli altri amidi dell'endosperma dei cereali.

L'amido di quinoa presenta una bassa digeribilità ed estraibilità a causa del legame con le proteine (Ruales & Nair, 1994).

In molte piante, l'amido è costituito dal 20-30% di amilosio e 70-80% di amilopectina. Per la quinoa molti studi suggeriscono che esiste una considerevole variabilità nel contenuto di amilosio nell'amido di quinoa compreso tra il 7 e il 27% (Lorenz, 1990; Inouchi *et al.*, 1999; Praznik *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2002), valori simili ad alcune varietà di riso e più alto rispetto ad alcune varietà di orzo.

Le proprietà di gelatinizzazione dell'amido sono relative a diversi fattori quali: la dimensione, la proporzione e il tipo di struttura cristallina e l'ultra struttura dei granuli di amido. L'amido di quinoa gelatinizza a temperature relativamente basse ( $T_{in}=46,1-57,4$  °C;  $T_{max}=54,2-61,9$  °C;  $T_{fin}=66,2-68,5$  °C) simili a quelle di gelatinizzazione dell'amido di grano e patate, ma più bassa della temperatura di gelatinizzazione di altri granuli grandi.

Al contrario dell'amido di frumento e orzo, l'amido di quinoa ha un'elevata capacità di rigonfiamento, è altamente stabile alle condizioni di congelamento-scongelo e mostra poca retrogradazione per il ridotto contenuto in amilosio (Lorenz, 1990; Ahamed *et al.*, 1996).

Nel complesso le proprietà tecnologiche dell'amido di quinoa in prodotti da forno lievitati è simile a quella di altri amidi non di natura cerealicola, come l'amido di amaranto e patate, ma inferiori all'amido di orzo e frumento (Lorenz, 1990).

### 1.5.3.2 Zuccheri

La tabella 1.6 mostra il contenuto di zuccheri semplici e oligosaccaridi nella quinoa. Il saccarosio è presente in quantità significative, rispetto agli altri zuccheri (Gonzalez *et al.*, 1989). Nonostante questa apparente differenza, si può affermare che il contenuto di zuccheri nella quinoa è molto simile a quello dell'amaranto (Gross, 1989).

**Tabella 1.6.** Zuccheri semplici della granella di quinoa

| <b>Zuccheri semplici</b> | (g/100g s.s.) |
|--------------------------|---------------|
| Fruttosio                | 0             |
| Glucosio                 | 0,19          |
| Saccarosio               | 2,79          |
| Raffinosio               | 0,15          |
| Stachinosio              | 0,08          |
| $\alpha$ -Galattosidi    | 0,23          |

Da Gross, 1989

### 1.5.3.3 Fibra

La quinoa è generalmente considerata un importante fonte di fibre (Ranhotra *et al.*, 1993; Ruales & Nair, 1994). Oltre all'amido infatti, le cellule del perisperma della quinoa contengono emicellulosa (xilano, galattani, mannani, arabinosio, galattosio), pectine, pentosani, cellulosa e beta-glucani. Questi elementi costituiscono la struttura delle pareti cellulari e sono più abbondanti nelle porzioni esterne rispetto all'interno.

Dai dati riportati da Ranhotra *et al.* (1993), la quinoa contiene circa l'8,9% di fibra alimentare totale, di questa più dell'80% è rappresentata dalla frazione insolubile. Ruales e Nair (1994) hanno riportato che il contenuto in fibra totale è del 13,4% nella quinoa e che l'11% è rappresentata dalla frazione insolubile mentre la parte solubile è di circa il 2,4%. Becker e Hanners (1990), a differenza di tutti gli altri autori, riportarono un contenuto basso di fibra pari al 1,1%.

L'esatta distribuzione di fibra alimentare nell'achenio è difficile da accertare, principalmente perché dagli sfarinati ottenuti con la macinazione è difficile separare le diverse parti anatomiche del seme come invece è possibile ottenere per i cereali. Tuttavia, è stato riscontrato che il contenuto in fibra del rivestimento dell'achenio (presumibilmente pericarpo e perianzio) è 2,5 volte più alto dell'achenio brillato.

Ruales e Nair (1994) dimostrarono che i processi di lavaggio ed abrasione della quinoa, per eliminare le saponine, non influenzano significativamente il contenuto in fibra (Tabella 1.7).

**Tabella 1.7.** Composizione chimica della granella di quinoa (g/100g s.s.)

| <b>Componenti</b>       | <b>Quinoa grezza</b> | <b>Quinoa lavata</b> |
|-------------------------|----------------------|----------------------|
| Proteine                | 14,1                 | 14,2                 |
| Grassi                  | 9,7                  | 9,7                  |
| Amido                   | 51,6                 | 53,1                 |
| Ceneri                  | 3,4                  | 2,8                  |
| Fibra alimentare totale | 13,4                 | 13,3                 |
| - Insolubile            | 11,0                 | 10,4                 |
| - Solubile              | 2,3                  | 2,5                  |

Da Ruales & Nair, 1994

#### **1.5.4 Minerali**

Come nei cereali, i minerali nell'achenio di quinoa si trovano soprattutto nello strato esterno del pericarpo.

I principali minerali presenti nella quinoa sono calcio, magnesio, fosforo e potassio (Kent, 1994) (Tabella 1.8).

Rispetto alla dose giornaliera raccomandata (RDA), la quinoa risulta una buona fonte di magnesio, fosforo e ferro. Infatti il contenuto di ferro (8-9 mg/100g) è più alto rispetto ai cereali comuni; tuttavia la presenza di composti antinutrizionali quali le saponine e l'acido fitico possono ridurre in modo significativo la biodisponibilità di alcuni minerali (Ruales, 1993).

Il fosforo e il magnesio nella quinoa sono localizzati nel tessuto embrionale mentre calcio e potassio sono concentrati negli strati esterni del chicco (Chauhan *et al.*, 1992). Si è infatti osservato che trattamenti come decorticazione e lavaggio dell'achenio riducono il contenuto minerale del 12-15% per quanto riguarda ferro, zinco e potassio, e rispettivamente del 27% e 3% per rame e magnesio.

Dalla tabella riportata è inoltre evidente lo scarso contenuto di selenio, per questo spesso prodotti ottenuti con sfarinati di quinoa sono addizionati con farina di lecitina disoleata che compensa questa mancanza.

**Tabella 1.8.** Contenuto in minerali nell'achenio di quinoa

| <b>Minerali<br/>(mg/100g)</b> | <b>Chauhan et<br/>al. (1992)</b> | <b>Ruales e Nair<br/>(1993)</b> | <b>RDA per adulti e bambini<br/>di più di 10 anni*</b> |
|-------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|--|
| Calcio                        | 110                              | 87                              | 1200   |
| Rame                          | 1                                | 1                               | Non applicabile  |
| Ferro                         | 9                                | 8                               | 14   |
| Magnesio                      | 500                              | 262                             | 350  |
| Manganese                     | 4                                | 3                               | Non applicabile  |
| Fosforo                       | 360                              | 535                             | 880  |
| Potassio                      | 900                              | 120                             | Non applicabile  |
| Zinco                         | 0,8                              | 3,6                             | 15   |

\* RDA: Dose Giornaliera Raccomandata

### 1.5.5 Vitamine

La composizione in vitamine è molto simile ai cereali, essendo la quinoa ricca in vitamina B, acido folico e vitamina E (Guzman-Maldonado, 1998) (Tabella 1.9) con una concentrazione di tali composti nell'embrione. Inoltre, diversamente dagli altri cereali, la quinoa contiene quantità significative di vitamina C. Riguardo alla RDA la quinoa può essere classificata come fonte di vitamina E, riboflavina, tiamina e acido folico (Guzman-Maldonado, 1998; Iafelice *et al.*, 2007).

**Tabella 1.9.** Contenuto in vitamine dell'achenio di quinoa

| <b>Vitamine<br/>(mg/100g)</b>   | <b>Ruales e Nair<br/>(1993)</b> | <b>Guzman-Maldonado e<br/>Paredes-Lopez (1998)</b> | <b>RDA per adulti e bambini<br/>di più di 10 anni*</b> |
|---------------------------------|---------------------------------|--|--|
| $\alpha$ -Tocoferolo            | 2,6                             | 2,0-5,4  | 10   |
| Acido Folico<br>( $\mu$ g/100g) | 78,1                            | ND   | 400  |
| Niacina                         | ND                              | 1,5  | 18   |
| Riboflavina                     | 0,2                             | 0,4  | 1,6  |
| Tiamina                         | 0,4                             | 0,3  | 1,4  |
| Vitamina A<br>(RE/100g)         | 20                              | 15   | 800  |
| Vitamina C                      | 16,4                            | 3,0-4,1  | 60   |

\* RDA: Dose Giornaliera Raccomandata; ND: Non Determinato.

### 1.5.6 Enzimi

La quinoa non germinata contiene quantità significative di enzimi idrolitici quali  $\alpha$ -amilasi, proteasi, cellulasi ed emicellulasi (Lorenz & Nyanzi, 1989).

Abrasioni meccaniche aumentano l'attività  $\alpha$ -amilasica e delle proteasi (Lorenz & Nyanzi, 1989), per questo si presume che questi enzimi siano concentrati nell'embrione. Contrariamente i livelli di cellulasi ed emicellulasi diminuiscono con l'abrasione, suggerendo così la presenza degli stessi nel pericarpo.

### 1.5.7 Antinutrienti e metaboliti secondari della pianta di quinoa

#### 1.5.7.1 Polifenoli

Molte ricerche sono state condotte negli ultimi dieci anni sulla composizione polifenolica degli alimenti, sulla loro biodisponibilità, sul loro metabolismo e sugli effetti biologici (Manach *et al.*, 2004). L'aumentato interesse verso questi composti è dovuto ai risultati ottenuti da alcuni studi epidemiologici che correlano il consumo di alimenti vegetali ricchi in polifenoli, con riduzione dei rischi di malattie associate a stress ossidativo, come cancro e malattie cardiovascolari (Scalbert *et al.*, 2005). Per via delle favorevoli proprietà dei polifenoli, numerosi studi sono stati condotti circa l'uso di quinoa, come potenziale ingrediente funzionale per migliorare il contenuto in antiossidanti naturali in pani gluten-free. In particolare, per gli acheni di quinoa è stata valutata la composizione in polifenoli (Alvarez-Jubete *et al.*, 2009). I risultati ottenuti sono riportati in tabella 1.10, confrontandoli con quelli ottenuti per amaranto, grano saraceno e frumento.

**Tabella 1.10.** Contenuto totale di fenoli di differenti cereali e pseudo cereali

| <b>Seme</b>           | <b>Fenoli totali<br/>mgGAE/100g s.s.</b> |
|-----------------------|--|
| <b>Amaranto</b>       | 21,2 $\pm$ 2,3                           |
| <b>Quinoa</b>         | 71,7 $\pm$ 5,5                           |
| <b>Grano saraceno</b> | 323,0 $\pm$ 14,1                         |
| <b>Frumento</b>       | 53,1 $\pm$ 2,8                           |

### 1.5.7.2 Saponine

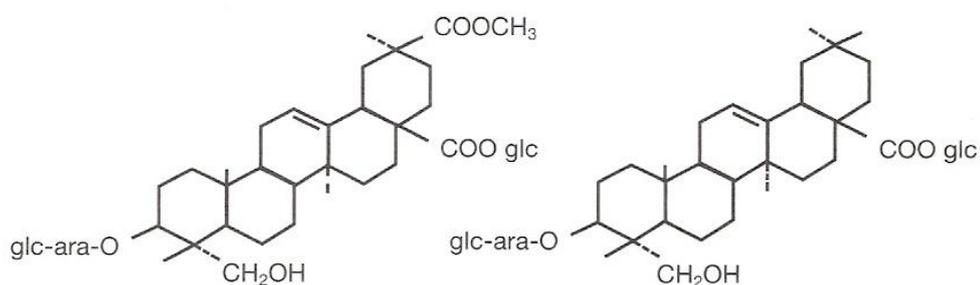
Le saponine sono dei glicosidi terpenici di origine vegetale che prendono il nome dalla *Saponaria officinalis*, una pianta pluriennale della famiglia delle *Caryophyllaceae* la cui radice è stata utilizzata come sapone, essendo solubile in acqua e formando schiuma.

Molte piante contengono saponine (liquirizia, ippocastano, avena, legumi, ginseng ed altri), e quest'ultime possono essere così abbondanti da raggiungere anche il 30% del peso secco della pianta. Si ritiene inoltre che le saponine siano utilizzate dalle piante come sistemi difensivi naturali contro diversi agenti patogeni, in particolare funghi, rendendo il seme a loro indigesto. In alcuni casi esse sono già presenti, altre volte vengono sintetizzate da particolari precursori in seguito ad eventi di stress o danni della pianta. È stato accertato che l'azione fungicida è dovuta alla reazione delle saponine con steroli presenti nelle membrane delle ife dei funghi, procurando la rottura della membrana e la conseguente morte del fungo.

La quinoa si caratterizza per la presenza di saponine, presenti in concentrazioni variabili in funzione della varietà, delle condizioni ambientali, con un range variabile da 0,01% a 4,65% (Koziol, 1992).

Strutturalmente le saponine sono formate dall'unione di un nucleo policiclico, chiamato sapogenina o aglicone, e da catene laterali formate da zuccheri semplici (glucosio, arabinosio e occasionalmente galattosio) (Figura 1.11). I residui zuccherini sono presenti in numero variabile da una a sei unità.

Chimicamente il gruppo policiclico delle saponine è riconducibile o ad una struttura triterpenica o steroidea.

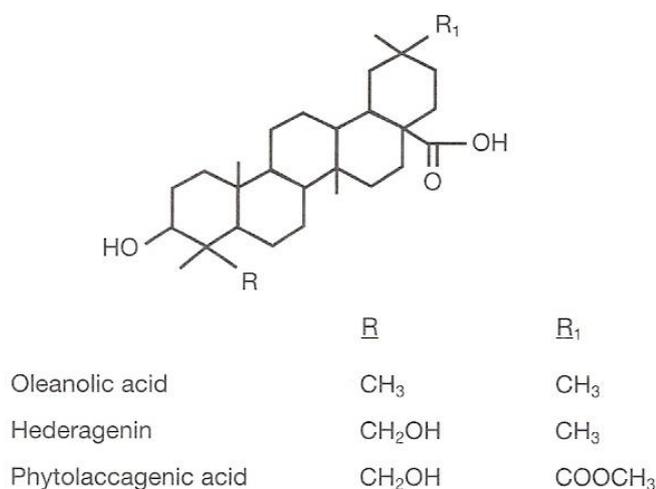


**Figura 1.11.** Struttura chimica delle saponine della quinoa

Le saponine a nucleo triterpenico (come la glicirrizina della liquirizia o l'escina dell'ippocastano) hanno una struttura pentaciclica a 30 atomi di carbonio mentre quelle a nucleo steroideo hanno struttura tetraciclica, con 27 carboni (spesso la catena alifatica è trasformata in due anelli eterociclici). Generalmente le saponine presenti nella quinoa sono

quelle a nucleo triterpenico, si tratta quindi di composti con peso molecolare relativamente elevato e con una o più catene di carboidrati come arabinosio, glucosio, galattosio, xylosio e ramnosio legate ad un aglicone idrofobico.

Le saponine della quinoa comprendono 3 o 4 sapogenine: fitolaccagenina, ederagenina, acido oleanolico e a volte acido deossifitoaccagenico, in funzione della varietà (Figura 1.12)(Mizui *et al.*, 1988; Ridout *et al.*, 1991). Come si osserva dalla figura 1.12 le sapogenine si differenziano in funzione dei gruppi R e R<sub>1</sub> presenti nella struttura triterpenica.



**Figura 1.12.** Struttura chimica degli agliconi

La maggior parte degli autori hanno dimostrato che l'acido oleanolico e la fitolaccagenina sono le sapogenine più abbondanti nella quinoa (Koziol, 1992; Chauhan *et al.*, 1992; Mizui *et al.*, 1988), mentre la componente glucidica è generalmente rappresentata da glucosio e arabinosio, occasionalmente è possibile riscontrare nella struttura delle saponine la presenza del galattosio (Fleming & Galwey, 1995). Ridout *et al.* (1991) contrariamente agli altri, hanno riportato che la fitolaccagenina è la più abbondante, seguita dall'acido oleanolico e l'ederagenina.

Per quanto riguarda la biosintesi delle saponine di quinoa (Figura 1.14), essa procede attraverso la via degli isoprenoidi nel corso della quale tre unità isoprenoiche (Figura 1.13) sono prima legate in modo testa-coda l'una all'altra ottenendo così una molecola a 15 carboni chiamata farnesyl-pirofosfato (FPP). Due molecole di FPP sono poi legate in modo coda-coda dando origine così ad una molecola a 30 atomi di carbonio conosciuta come squalene (Holstein & Hohl, 2004). Lo squalene viene poi ossidato ad ossidosqualene, che rappresenta l'intermedio comune che porta alla sintesi delle differenti saponine (Haralampidis *et al.*, 2002).

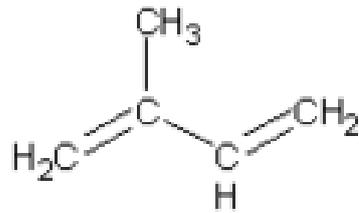


Figura 1.13. Unità isoprenoica

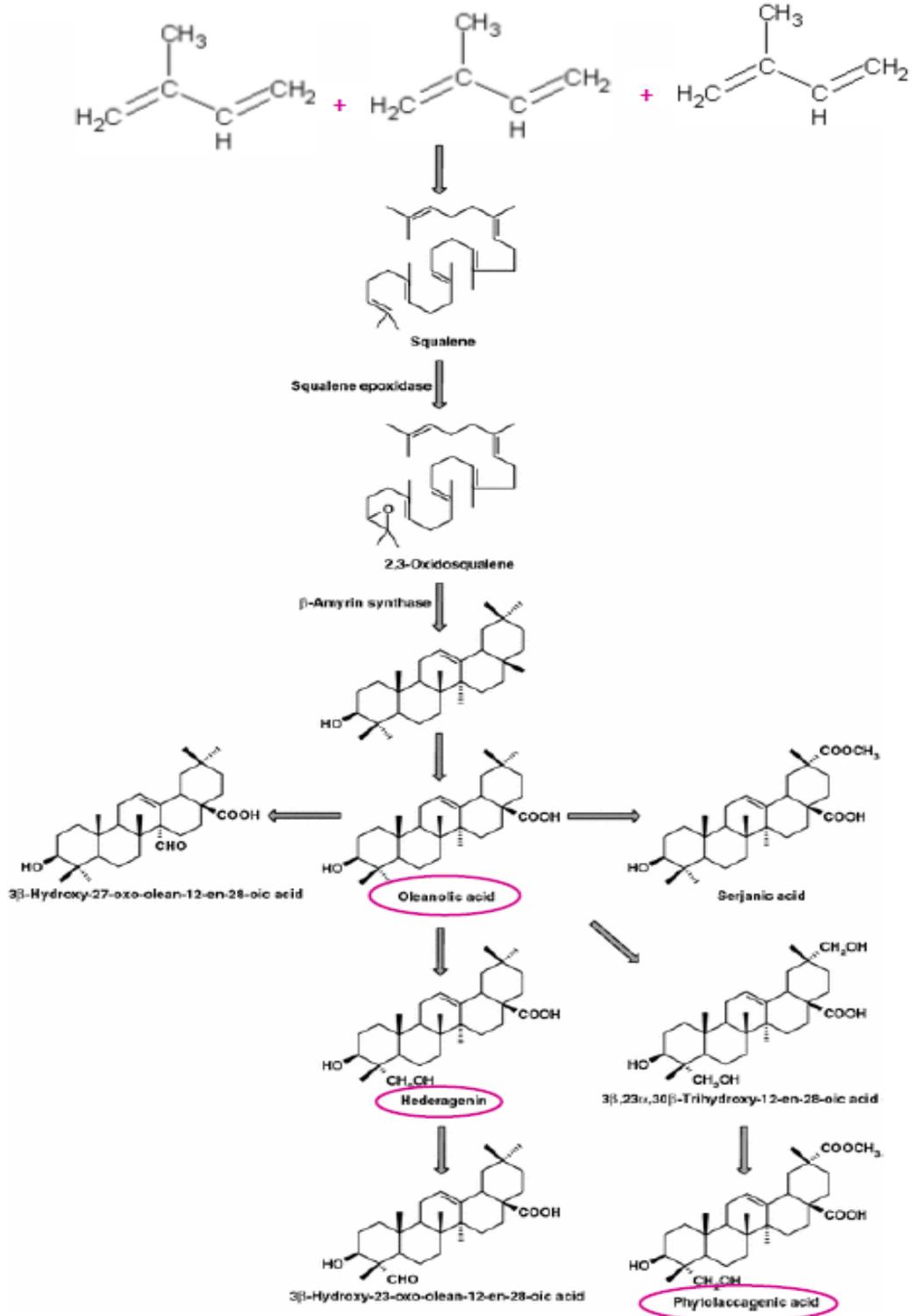


Figura 1.14. Via biosintetica delle saponine della quinoa

Da un punto di vista della distribuzione delle saponine nella pianta, particolari studi, condotti su *Chenopodium quinoa*, hanno mostrato una maggiore concentrazione di acido oleanolico nei semi e di ederagenina nelle foglie (Mastebroek *et al.*, 2000; Cuadrado *et al.*, 1995). In termini di localizzazione all'interno dell'achenio, invece, diversi studi hanno dimostrato che la quasi totalità delle saponine sono localizzate negli strati più esterni, in particolare nel pericarpo (circa il 34%), in concentrazioni doppie rispetto a quelle riscontrabili nel perisperma. In particolare, studi condotti da Becker e Hanners (1990) e da Mastebroek (2000), hanno riportato per le varietà ad alto contenuto in saponine (definite varietà bitter/amare) una concentrazione in saponine dell'ordine di 0,44-1,45g/100g, negli stessi studi varietà di quinoa la cui concentrazione era pari a 0,03-0,10g/100g sono state definite sweet (dolci). Tra le diverse varietà le cultivar "sweet" pur presentando il più alto contenuto in saponine sono quelle maggiormente coltivate soprattutto in Nord America (Fleming & Galwey, 1995).

A livello sensoriale comunque, la percezione dell'amaro, dovuta a queste sostanze, è evidente quando il contenuto in saponine è dell'ordine di circa 0,10g/100g (Bhargava *et al.*, 2006). Attualmente il lavoro di selezione varietale è orientato verso l'identificazione delle varietà di quinoa sweet, anche se, la resistenza alle fito-patologie è significativamente più bassa delle varietà bitter.

Oltre ad essere responsabili del gusto amaro della quinoa, le saponine rientrano nei composti classificati come antinutrienti. È stato infatti dimostrato che le saponine hanno la capacità di formare schiume in acqua e possono danneggiare le cellule della mucosa intestinale, alterando la permeabilità della membrana cellulare e interferendo con il trasporto attivo (Gee *et al.*, 1989). Tali sostanze inoltre, possono legarsi con il ferro riducendone così l'assorbimento (West *et al.*, 1978; Southon *et al.*, 1988).

Tuttavia, il livello di tossicità delle saponine dipende dalla loro struttura chimica, dall'esposizione dell'organismo a tali composti e dalla loro concentrazione. Le saponine pur essendo considerate composti antinutrizionali, possono trovare largo impiego in numerosi settori.

Diversi studi hanno infatti riportato che, le saponine possiedono interessanti proprietà farmacologiche in quanto possono coadiuvare l'assorbimento di alcune droghe (Basu & Rastogi, 1967) ed avere un effetto ipocolesterolemico (Oakenfull & Sidhu, 1990) e antinfiammatorio. Per tali motivi, alcuni autori suggeriscono l'impiego di saponine come nutraceutici (Fleming & Galeway, 1995). Oltretutto le saponine possono essere applicate come agenti antibatterici e antifungini (Koziol, 1992).

Le saponine infine, sono sostanze in grado di abbassare la tensione superficiale in soluzioni acquose; sono capaci di formare soluzioni colloidali schiumeggianti e si possono usare come emulsionanti.

In sintesi si può affermare che la notevole diversità chimica delle saponine di *Chenopodium quinoa*, ha avuto come risultato, negli ultimi anni, un rinnovato interesse verso questi composti in particolare come agenti fitoterapeutici e chemioterapeutici. Tali conoscenze forniscono un incentivo per un uso futuro di tale pianta in medicina e nel campo alimentare.

#### **1.5.8 Altri composti antinutrizionali**

La quinoa contiene dallo 0,7 all'1,2% di fitati (Koziol, 1992; Ruales & Nair, 1993a), quantità paragonabile a quella del frumento, delle lenticchie, e della segale (Ruales & Nair, 1993a). I fitati possono formare nel tratto gastrointestinale complessi insolubili con vari cationi, come  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  nel tratto gastrointestinale, riducendo così la loro biodisponibilità (Serraino *et al.*, 1985). La quinoa è ricca in ferro se paragonata ad altri cereali tuttavia, i fitati ne diminuiscono marcatamente la biodisponibilità.

Valencia *et al.* (1999) hanno riportato che la bagnatura, la germinazione e la fermentazione lattica della quinoa riducono il contenuto di fitati e migliorano la solubilità del ferro. In particolare, il trattamento più efficace per ridurre il contenuto di fitati è la fermentazione di farina di quinoa germinata, in cui i fitati vengono completamente idrolizzati con un aumento della biodisponibilità del ferro da 5 a 8 volte se paragonata all'equivalente farina non fermentata.

La quinoa contiene quantità basse o nulle di tannini (Chauhan *et al.*, 1992; Ruales & Nair, 1993b) e inibitori della tripsina (Chauhan *et al.*, 1992; Ruales & Nair, 1993b).

Nella quinoa è stata registrata la presenza di flavonoidi quali kampferolo e quercitina.

Entrambi i composti sono forti antiossidanti e contrastano l'azione dei radicali liberi (Zhu *et al.*, 2001); tuttavia insieme alle saponine, i flavonoidi possono contribuire all'amaro/astringenza.

## Capitolo 2. Lavorazione della quinoa

Il diagramma di flusso della trasformazione della quinoa (Figura 2.1) mostra le tutte le fasi di lavorazione a cui l'achenio è sottoposto prima di poter essere commercializzato e messo sul mercato. Come si può notare dal diagramma, la desaponificazione degli acheni può essere effettuata o mediante metodo a secco o attraverso il metodo a umido in cui si effettuano diversi lavaggi del prodotto.

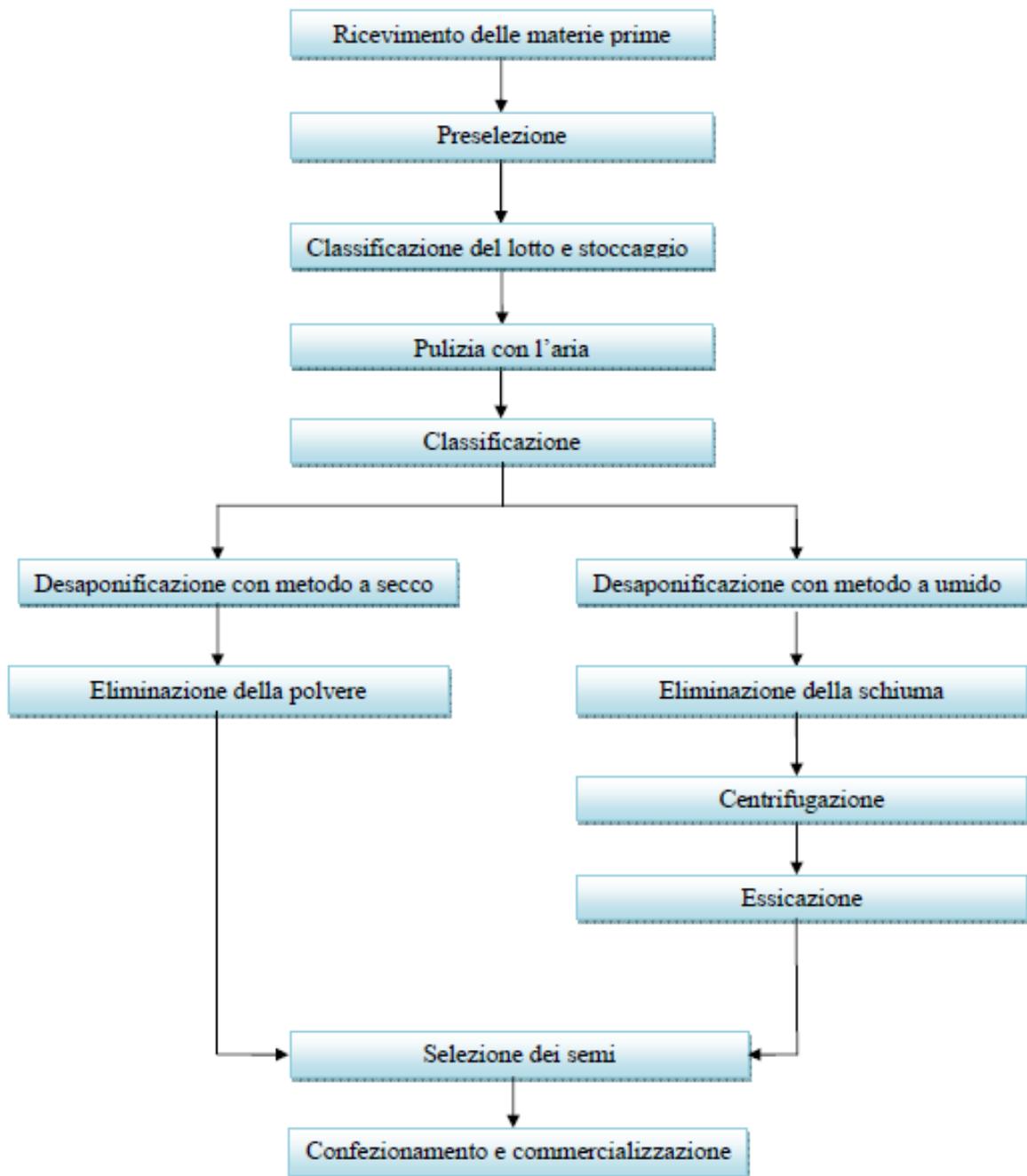


Figura 2.1. Diagramma di flusso della lavorazione della quinoa (Mujica *et al.*, 2001).

## **2.1 Prime operazioni sul seme**

Dopo l'arrivo della materia prima essiccata avvengono le prime lavorazioni che sono le seguenti:

- Preselezione: è un lavoro importante che mira ad eliminare i semi piccoli (Chini), l'eventuale residuo di terreno, ciottoli e i semi di piante infestanti. Se non viene eseguita, le rese risultano basse e vanno ad incidere sul costo con la necessità di una maggiore potenza di lavorazione e di utilizzare grandi quantità di acqua nei passaggi successivi.
- Classificazione del lotto e stoccaggio: la classificazione viene fatta per lotto e per qualità. La classificazione per lotto della quinoa viene fatta tenendo conto dell'origine della granella mentre la classificazione secondo la qualità del seme avviene in base ai seguenti parametri:
  - Nome della varietà
  - Granulometria
  - Quantità di impurità (ramoscelli e ciottoli)

## **2.2 Pulizia e classificazione della granella**

Una seconda pulizia più accurata permette la rimozione delle impurità dal seme. È una pratica importante prima di iniziare la lavorazione effettiva, permettendo di migliorare la qualità e la presentazione degli stessi, favorendone la conservazione. Le impurità sono igroscopiche e sensibili agli attacchi di muffe e batteri, che accelerano il deterioramento della granella immagazzinata.

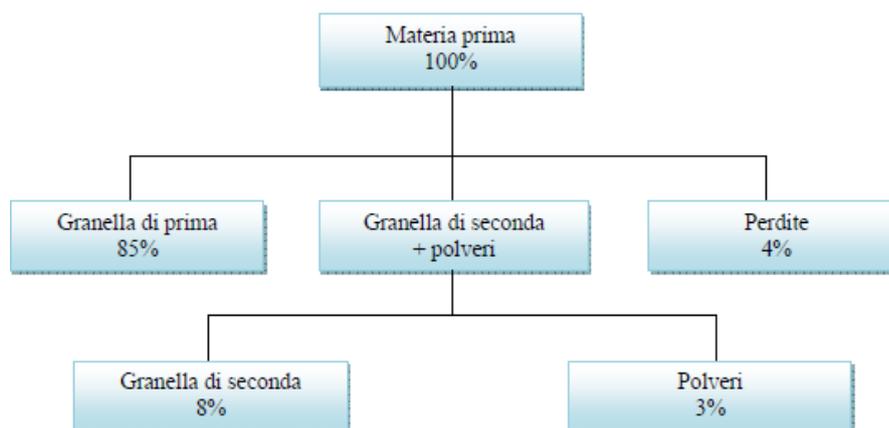
La classificazione della granella, dovrebbe essere prassi normale dell'agricoltore, in quanto permette di ottenere maggiori opportunità di vendita e prezzi migliori in quanto viene fornita granella di qualità più elevata. Nel caso della quinoa, sono stati identificati almeno tre metodi per la pulizia della granella dopo la raccolta:

### **2.2.1 Pulizia tradizionale**

La selezione della granella viene eseguita manualmente con l'ausilio di setacci o schermi e l'eliminazione delle impurità (foglie, perigoni, semi estranei, ecc.), è eseguita lanciando la granella in aria, per sfruttarne le correnti. Questi metodi sono utilizzati da piccoli agricoltori, la cui produzione è principalmente di sussistenza.

### 2.2.2 Pulizia e classificazione meccanica

Considerando la difficoltà di ottenere una macchina specifica per pulire e calibrare i semi di quinoa a livello aziendale, specialmente per i piccoli produttori, la scelta migliore è l'adattamento dei modelli di macchine già presenti in azienda, in modo che la pulizia e la classificazione della granella di quinoa non sia l'unico utilizzo abbassando così i costi di gestione. In Ecuador, alcuni test sono stati eseguiti per regolare degli apparecchi selezionatori per la quinoa, trovando il sistema più adeguato per la sua lavorazione. È conosciuto come "cassetto a schermi" o "Mini Clipper" e permette la classificazione per dimensione dei semi, che viene eseguita attraverso una serie di setacci, la rimozione delle impurità avviene sempre con un setaccio e tramite una ventilazione forzata finale. Dalle esperienze di classificazione con questa macchina è stato definito il seguente processo di classificazione e di tassi di estrazione.



**Figura 2.2.** Descrizione del processo di classificazione della granella di quinoa e percentuale di estrazione dei sottoprodotti (Mujica *et al.*, 2001).

### 2.2.3 Pulizia industriale

Quando la produzione di quinoa passa a livello industriale ed è quindi necessario dover elaborare grandi volumi, la pulizia della granella e lo smistamento devono avvenire con macchine per la lavorazione industriale. Queste macchine sono costituite da quattro schermi: due setacci, due calibratori e due ventilatori. Nel caso della quinoa, questi quattro schermi sono i seguenti:

- Primo schermo (Pulizia), setaccio con maglie di 4 mm;
- Secondo schermo (Classificazione), calibratore con maglie di 1,3 mm;
- Terzo schermo (Pulizia), secondo setaccio con maglie di dimensioni inferiori di 2,2 millimetri;

- Quarto schermo (Classificazione), secondo calibratore con maglie di 1,8 mm.

Il primo schermo separa le impurità di grandi dimensioni e volume. Il secondo schermo separa piccoli semi di piante infestanti, parti immature ed effettua una prima classificazione dei semi. Il terzo schermo separa i semi di quinoa dai semi indesiderati di grandi dimensioni. Il quarto schermo è quello della cernita e separazione della quinoa con diametro del chicco di 1,8 mm o maggiore.

Prove con questa macchina sul seme di quinoa sono state soddisfacenti. È stato possibile lavorare circa 0,5 t/ha (Mujica *et al.*, 2001) con i seguenti risultati:

- Seme di prima 75-80%
- Seme commerciale 15-20%
- Impurità e perdite 5%

In questo caso la percentuale di estrazione della granella di prima dipende da diversi fattori quali la qualità della quinoa, la varietà, il grado di contaminazione con altre impurità.

### ***2.3 Tecnologie utilizzate per la riduzione del contenuto in saponine***

Per poter essere utilizzato, l'achenio di quinoa è generalmente sottoposto ad una serie di operazioni che mirano principalmente alla rimozione delle saponine e dell'acido fitico (Simmonds, 1965), componenti caratteristici di questo pseudocereale che oltre ad essere responsabili della percezione dell'amaro, hanno effetti negativi sulla mucosa intestinale (Koziol, 1992). Il livello massimo accettabile di saponina nella quinoa per il consumo umano varia tra lo 0,06 e lo 0,12% (Mujica *et al.*, 2001).

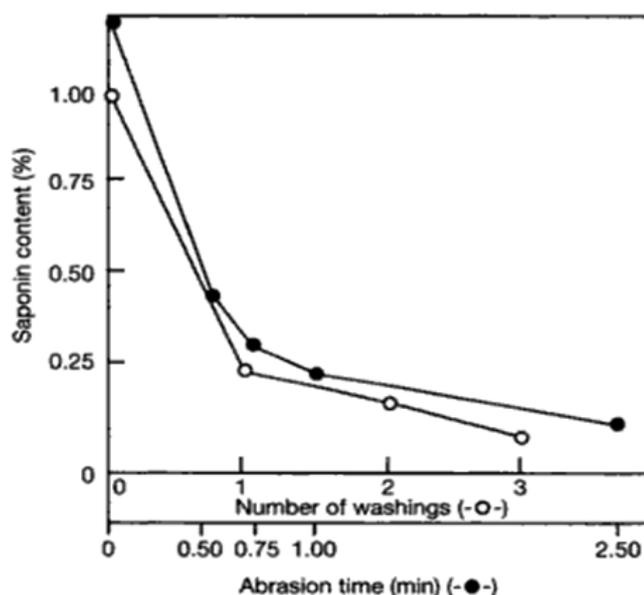
Lo svantaggio di rimuovere le saponine dai semi di quinoa è stato ampiamente superato con l'uso della cosiddetta "quinoa dolce", proveniente cioè da quelle cultivar che presentano contenuti di saponina minimi e che, di conseguenza, necessitano per il consumo solo di una pulizia o scarificazione dei semi.

#### ***2.3.1 Desaponificazione tradizionale***

Tradizionalmente, gli indiani del Sud America rimuovevano le saponine attraverso l'immersione o il lavaggio dei semi in acqua fredda o in soluzioni alcaline, seguito da uno strofinamento energico a mano dei semi su una pietra al fine di rimuovere gli strati superficiali dei semi contenenti la saponina (Simmonds, 1965). Il problema di questo metodo era l'impiego di grandi quantitativi d'acqua, che richiede un successivo processo di essiccamento e il loro successivo smaltimento (Ruales, 1998).

Studi condotti da Ruales (1998) hanno evidenziato che l'efficienza del processo di lavaggio può essere migliorata con un'energica agitazione. Un sistema di rimozione delle saponine alternativo ai lavaggi con acqua è l'abrasione meccanica del seme (Reichert *et al.*, 1986; Ridout *et al.*, 1991; Chauhan *et al.*, 1992). Al fine di rimuovere gli strati estremi dell'achenio Reichert *et al.* (1986) usarono un impianto pilota di abrasione tangenziale. I risultati di questa ricerca hanno evidenziato che un'abrasione per un tempo di 2,5 minuti determina una significativa riduzione del contenuto in saponine (Figura 2.3). Lo stesso studio ha evidenziato che i lavaggi con acqua hanno una efficacia paragonabile a quanto osservato con il processo di abrasione in termini di riduzione del contenuto in saponine (da 1,03% a 0,18%) (Ridout *et al.*, 1991).

Successivi studi condotti da Ruales e Nair (1993) hanno dimostrato che attraverso il trattamento combinato dei due processi (abrasione e lavaggio) è possibile ridurre la fitolaccagenina del 57% e la ederagenina del 100%, con una perdita limitata di vitamine (acido folico).



**Figura 2.3.** Effetto del lavaggio e dell'abrasione meccanica sul contenuto totale di saponine della quinoa (Ridout *et al.*, 1991)

Come si osserva dalla figura 2.3, il processo di abrasione consente di ridurre il contenuto di saponine presenti, per effetto dell'allontanamento dagli acheni del perianzio e del pericarpo, dove sono principalmente localizzate.

### 2.3.2 Desaponificazione meccanica

Anche noto come metodo a secco, consiste nel sottoporre la granella a un processo di attrito (scarificazione) per eliminare gli strati periferici (in forma di polvere) dal seme. Nel corso degli anni, diversi sono stati gli esperimenti di desaponificazione tramite l'adeguamento di macchine originariamente progettate per altri usi, uno degli studi più interessanti in questo campo è la rigeneratrice.

In questo caso, la quinoa subisce un processo combinato di abrasione e battitura, tramite delle lame rotanti su schermi fissi, che raccolgono e separano la saponina formata da granelli di polvere. La macchina ha tre cilindri posti a diverse altezze, in modo che i semi in lavorazione vengono spostati da un cilindro all'altro utilizzando la gravità. Ciascun cilindro è composto da 9 a 12 lame raschiatrici poste sull'albero e da alcune palette convogliatrici rotanti. I semi, lasciando l'ultimo cilindro, sono investiti da un flusso di aria che ne consente la separazione dalla polvere prima di essere raccolti all'uscita.

Questa macchina scarificatrice ha un'efficienza del 95% e il contenuto di saponina nel prodotto finale è compreso tra lo 0,04 e lo 0,25% a seconda della varietà utilizzata come materia prima.

Un altro metodo di scarificazione sviluppato sulla quinoa che da risultati soddisfacenti, unisce il calore (pretostatura del seme) con la spazzolatura. Tuttavia, nessuno degli apparecchi progettati per la scarificazione della quinoa ha prodotto un'eliminazione della saponina a livelli sufficienti da permetterne il consumo umano diretto senza un successivo trattamento del prodotto. Un altro inconveniente del metodo è l'elevato contenuto di fibra e grassi che vengono persi nella polvere ottenuta dopo la scarificazione poiché la maggior parte di queste sostanze sono contenute nell'embrione e nel pericarpo, producendo degli sfarinati con un alto contenuto in amido e un buon contenuto in proteine.

Tuttavia a causa delle piccolissime dimensioni degli acheni la quinoa è generalmente macinata per intero. Gli sfarinati ottenuti includono residui del pericarpo, pertanto se le saponine sono allontanate con lavaggi prima della macinazione, è possibile ottenere sfarinati a basso contenuto in composti antinutrizionali. È possibile produrre frazioni di sfarinati potenzialmente utili attraverso la macinazione con cilindri rotanti. Chauhan *et al.* (1992) usarono un mulino pilota a rulli per separare gli sfarinati di quinoa in crusca e farina (Tabella 2.1).

**Tabella 2.1.** Composizione chimica delle frazioni macinate di quinoa (g/100g)

| Frazioni                        | Umidità | Proteine <sup>a</sup> | Grassi | Carboidrati     | Ceneri | Fibra |
|---------------------------------|---------|-----------------------|--------|-----------------|--------|-------|
| Achenio t.q.                    | 12,0    | 13,7                  | 6,8    | 61,2            | 2,8    | 2,2   |
| Achenio decorticato manualmente |         |                       |        |                 |        |       |
| Sfarinato Integrale             | 12,2    | 13,7                  | 6,8    | 62,8            | 2,7    | 1,8   |
| Crusca                          | 13,9    | 20,4                  | 11,0   | 45,3            | 4,0    | 5,0   |
| Farina                          | 15,6    | 6,5                   | 2,8    | 73,8            | 1,0    | 0,4   |
| Achenio decorticato con acqua   |         |                       |        |                 |        |       |
| Sfarinato Integrale             | 7,5     | 14,2                  | 7,2    | ND <sup>b</sup> | 2,3    | ND    |
| Crusca                          | 13,9    | 24,3                  | 13,2   | ND              | 4,1    | ND    |
| Farina                          | 15,5    | 5,6                   | 2,0    | ND              | 0,8    | ND    |

Da Chauhan *et al.*, 1992

<sup>a</sup> N\*5,7; <sup>b</sup> ND: Non Determinato

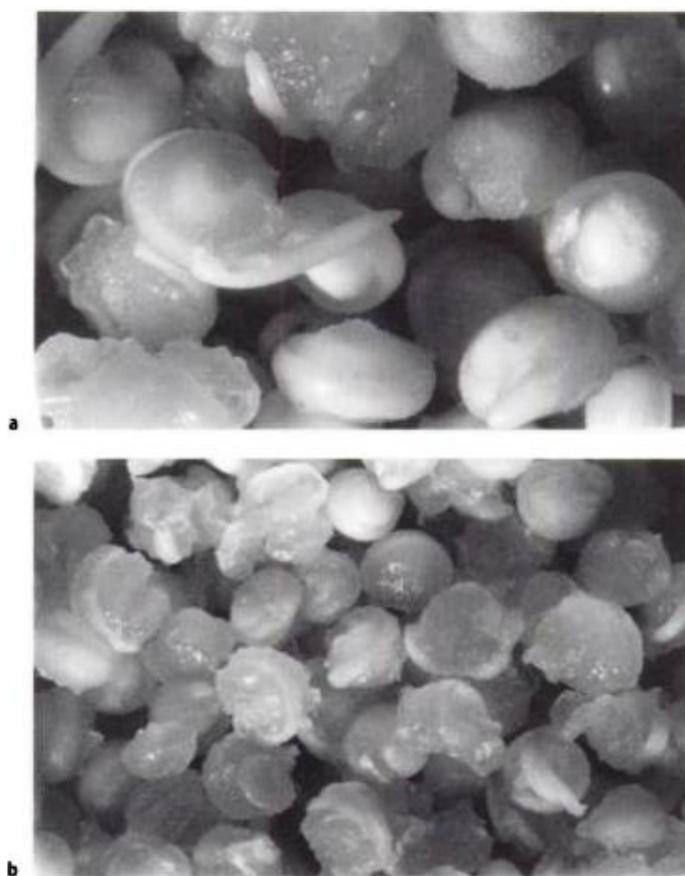
### 2.3.3 Desaponificazione tramite lavaggio

È anche noto come metodo umido e consiste nel sottoporre il seme a un processo di immersione e turbolenza dell'acqua circolante o fissa in una vasca di lavaggio. L'obiettivo principale di questo metodo è favorire il processo di gelatinizzazione dell'amido. La saponina viene rilasciata nell'acqua di lavaggio.

Sono stati sviluppati metodi di desaponificazione tramite agitazione e turbolenza, tutti con risultati incoraggianti. Uno dei metodi migliori sviluppati è costituito da un serbatoio verticale, dotato di lame rotanti per dare turbolenza all'acqua. Il seme è sottoposto a un ammollo iniziale, che dura da 5 a 8 minuti, a seconda del contenuto di saponina, una turbolenza, che dura da 5 a 15 minuti, sempre a seconda del contenuto di saponina rimanente e da un risciacquo finale, che dura da 5 a 8 minuti. Dopo di che, i semi sono sottoposti a un processo di essiccazione. Questo processo avviene in vaschette mobili poste all'interno di un essiccatore a tunnel. L'essiccazione dura da 4 a 5 ore ed è il processo più lungo e costoso. La qualità del prodotto finale ottenuto con questo sistema è soddisfacente e i prodotti ottenuti sono stati ben accettati dai mercati.

Altre ricerche hanno testato un processo di desaponificazione a diverse temperature. Il lavaggio con acqua a 50°C, può ridurre il contenuto di saponina fino al 25% del contenuto iniziale, mentre con lavaggi a 70 e 80°C, la saponina residua non è più rilevabile.

Questo processo comporta dei cambiamenti desiderabili nella consistenza del prodotto e può migliorare la sua digeribilità. La figura 2.4 evidenzia che con la cottura gli acheni di quinoa si rigonfiano come avviene per il riso, permettendo la separazione dell'embrione dal perisperma gelatinoso.



**Figura 2.4.** Foto al microscopio di acheni di quinoa sottoposti a cottura in umido: acheni dopo lavaggio e cottura (a); acheni dopo abrasione e cottura(b) (Ruales *et al.*, 1993)

La macinazione a secco è spesso preferita ai processi di cottura in umido poiché consente di ottenere un prodotto con un contenuto in acqua ridotto che lo rende più stabile per la conservazione. Ma è possibile sfruttare l'azione combinata dei due metodi sopracitati utilizzando la desaponificazione combinata.

### **2.3.4 Desaponificazione combinata**

Considerando gli inconvenienti della desaponificazione con il metodo umido e tenendo conto che il metodo a secco non è efficiente per le varietà con elevati livelli di saponina, è possibile l'applicazione di entrambi i metodi per eliminare la saponina dai semi. Viene eseguita una prima scarificazione, eliminando così una buona parte di saponina e i semi vengono poi sottoposti a lavaggio per rimuovere il residuo di saponina, in modo da non avere un'eccessiva esposizione all'umidità e avere un processo di essiccazione molto più veloce ed economico. I vantaggi del processo combinato sono il risparmio idrico, buona qualità proteica dei semi trasformati, minor consumo di energia per la lavorazione e quindi costi più bassi.

## **2.4 Stoccaggio**

La conservazione è una componente importante nel processo di post-raccolta e per la quinoa è più importante nel caso della conservazione dei semi. È inutile aver effettuato un buon processo di pulizia, cernita e rimozione delle impurità se lo stoccaggio non viene fatto in maniera ottimale.

Tradizionalmente i semi sono conservati in contenitori aperti di metallo, argilla o plastica, anche se sono molto comuni i contenitori di stoccaggio in tessuto o in polietilene (Mujica *et al.*, 2001). I principali problemi con questi tipi di conservazione sono le contaminazioni da polvere, attacchi di roditori o di insetti, come le falene del grano. Queste falene, nel caso della quinoa, appartengono a una famiglia di micro lepidotteri: *Pachyzancla bipunctalis fabricius*.

Se il seme deve essere conservato per un breve periodo, è sufficiente conservarlo in contenitori chiusi a temperature inferiori ai 10°C e a basso contenuto di umidità, mentre se la conservazione è a medio-lungo termine (anche più di due anni) è meglio conservarli in contenitori sigillati ermeticamente e conservati in frigorifero (0°C o meno). In quest'ultimo caso, i migliori risultati sono stati ottenuti con l'uso di sacchetti in alluminio-polietilene, superando così il problema di umidità ambientale del vano refrigerato. I semi conservati a lungo termine dovrebbero essere essiccati con un'umidità non superiore all'8%, per garantire un minimo di attività fisiologica e garantirne la conservazione. Nel caso di granella commerciale, questa deve essere conservata in contenitori chiusi o alla rinfusa ma mantenuti in un ambiente ventilato, asciutto e protetto da insetti e roditori. Se si tratta di grandi volumi, in particolare nel caso di granella destinata alla trasformazione in prodotti alimentari per il consumo umano, il miglior stoccaggio avviene nei silos. I silos possono essere in metallo o in

cemento e la granella, prima di essere immagazzinata nel silo, deve essere asciutta (10-13% di umidità) e priva di impurità.

## ***2.5 Imballaggio e presentazione***

Questo è certamente il fattore più influente nella preferenza della domanda dei consumatori. Nel caso della quinoa, nella regione andina, non viene eseguito il confezionamento del prodotto e non viene migliorata la sua presentazione. Sono comuni i centri di vendita al dettaglio che offrono la quinoa alla rinfusa, anche nei casi di prodotti trasformati, dando idea di scarsa igiene che scoraggia i consumatori all'acquisto.

Tuttavia, negli ultimi anni, per iniziativa di imprese private, alcuni prodotti sono offerti sul mercato in confezioni e con presentazioni eleganti che attirano l'interesse del cliente. I materiali più appropriati per il confezionamento della quinoa per la vendita all'ingrosso possono essere: sacchi di carta o di stoffa mentre per la vendita al dettaglio, sacchetti di carta, cellophane, confezioni di latta o di imballaggi combinati (cartone e cellophane). I sacchetti o contenitori di polietilene, anche se apparentemente più versatili, non sono i più consigliati per la vendita al dettaglio, perché difficili da riciclare nei rifiuti domestici.

### **Capitolo 3. Applicazioni tecnologiche della quinoa**

Tradizionalmente, la quinoa è sempre stata usata in una vasta varietà di cibi. Di essa, in particolare, si utilizzano gli acheni, generalmente consumati tal quali, o previa macinazione, ottenendo in tal modo sfarinati da impiegare in diverse produzioni. Anche le foglie della pianta possono essere utilizzate nell'alimentazione avendo proprietà e sapore simili agli spinaci. Il fusto invece, è usato come foraggio per il bestiame. Il seme intero è utilizzato per la preparazione di brodi, zuppe, stufati (Figura 3.1). Inoltre la farina può essere utilizzata per la preparazione di prodotti da forno.

Un'importante caratteristica nutrizionale della quinoa è rappresentata dall'assenza del glutine, si tratta quindi di un prodotto particolarmente adatto per soggetti affetti dal morbo celiaco. Grazie a questa particolare peculiarità, la quinoa può quindi essere utilizzata nella realizzazione di prodotti gluten-free.



**Figura 3.1.** Acheni di quinoa perlata commerciale

La quinoa può essere sottoposta a un processo di fermentazione per la produzione di una birra detta chichi (Taylor & Parker, 2002). Inoltre dopo il recupero dei semi l'apparato fogliare della pianta di quinoa può essere vantaggiosamente utilizzato per l'alimentazione animale.

Nelle diverse preparazioni gli sfarinati di quinoa sono spesso utilizzati in combinazione con farine di cereali per aumentare la qualità nutrizionale dei prodotti (Chauhan *et al.*, 1992; Jacobsen, 2003).

### **3.1 Pane, torte e biscotti con quinoa**

Come anticipato, la quinoa è uno pseudocereale che non contiene glutine per cui può essere utilizzata nella preparazione di prodotti gluten-free. Tuttavia a causa dell'assenza del glutine i prodotti ottenuti con sfarinati di quinoa, come ad esempio il pane, mostrano una riduzione di volume.

Studi condotti da Bean *et al.* (1982) hanno evidenziato che le proprietà reologiche di impasti preparati con sfarinati di quinoa possono essere significativamente migliorate utilizzando opportuni coadiuvanti tecnologici (agenti ossidanti), quali il bromato di potassio. La farina di quinoa può essere infatti miscelata con farina di frumento o mais, per la produzione di pane (10-13% di farina di quinoa), pasta (30-40%) e biscotti (60%).

Lorenz e Coulter (1991), hanno effettuato prove sperimentali di produzione di pane, torte e biscotti, utilizzando farina di quinoa, in miscela con sfarinati convenzionali in percentuali variabili del 5, 10, 20 e 30%. Per il pane, tali studi hanno riportato che l'aggiunta del 5% di sfarinati di quinoa permette di ottenere un pane con un volume superiore rispetto a quello ottenuto con sola farina, dovuto probabilmente ad un'alta attività amilasica apportata proprio dalla quinoa (Lorenz & Nyanzi, 1989). L'elevata attività amilasica, aumenta infatti, la quantità disponibile di zuccheri fermentescibili derivanti dall'idrolisi dell'amido. L'impiego del 10% di quinoa, invece, determina una riduzione di volume del pane (Bean & Fellers, 1982). Tale fenomeno è strettamente legato al fatto che l'impasto presenta una minore elasticità proprio perché gli sfarinati di quinoa sono privi di glutine. Da un punto di vista sensoriale, il pane ottenuto con il 5 e il 10% di farina di quinoa, è stato giudicato accettabile in seguito ad analisi delle caratteristiche esterne ed interne della forma di pane. Con alti livelli di sostituzione della farina di frumento (30%) invece, il pane presentava una alveolatura più aperta, colore scuro e retrogusto indesiderato.

Nello stesso studio è stata valutata poi, la possibilità di preparare torte utilizzando farina di quinoa in miscela con farina di frumento.

La sostituzione della farina di frumento con il 20% di farina di quinoa non ha avuto effetti particolari sulla struttura e sull'aspetto del dolce. Al contrario l'aggiunta di oltre il 30% di farina di quinoa ha determinato una struttura più cedevole della torta. Tuttavia in entrambi i casi si è riscontrato un leggero retrogusto amaro e un colore più scuro.

Gli sfarinati di quinoa sono stati impiegati per la realizzazione di biscotti e torte con flavour caratteristici giudicati positivamente (Lorenz & Coulter, 1991). In commercio sono disponibili biscotti con quinoa ed alcuni esempi sono riportati nella figura 3.2.



**Figura 3.2.** Biscotti con quinoa

Oltre agli sfarinati di quinoa è possibile utilizzare anche l'amido di quinoa. Lorenz (1990) ha dimostrato che è possibile utilizzare l'amido di quinoa in miscela con glutine di frumento per la preparazione di biscotti.

Penaloza *et al.* (1992) hanno prodotto con la quinoa una torta fermentata con *Rhizopus oligosporus* tipica dell'Indonesia, chiamata tempeh.

### 3.2 Pasta

La pasta può essere utilizzata come veicolo di diversi principi nutrizionali attraverso l'uso di ingredienti sia di origine vegetale (Bahnassey & Khan, 1986; Breen, 1977; Haber *et al.*, 1978) che animale (Hanna *et al.*, 1978; Pagani *et al.*, 1986; Resmini *et al.*, 1975). La quinoa ad esempio, presentando un alto contenuto in amminoacidi ed acidi grassi essenziali, può essere utilizzata per aumentare il valore nutrizionale delle proteine e dei grassi nella pasta.

Lorenz *et al.* (1993) hanno utilizzato gli sfarinati di quinoa per produrre della pasta, tuttavia il prodotto ottenuto aveva una qualità inferiore per colore, gusto, consistenza, ma complessivamente accettabile se paragonata alla pasta preparata con sola semola di grano duro.

Poiché la quinoa si caratterizza per l'assenza delle proteine che costituiscono il glutine, diversi autori (Caperuto *et al.*, 2000) hanno intrapreso ricerche per valutare le caratteristiche qualitative di paste gluten free con quinoa. Nello studio di Caperuto *et al.* (2000), sono stati realizzati degli spaghetti impiegando il 10% di farina di quinoa, miscelata con altri ingredienti quali farina di mais e albume d'uovo. Gli spaghetti ottenuti erano confrontabili, dal punto di vista sensoriale, con gli spaghetti ottenuti con sola semola di frumento ma con una migliorata qualità proteica.

In Italia è disponibile in commercio della pasta con quinoa contenente circa il 16% di quinoa di provenienza Boliviana in miscela con la semola. In particolare distinguiamo tra la pasta con

quinoa gluten-free e quella in cui la quinoa è stata miscelata con semola, contenente perciò glutine (Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Paste commerciali con quinoa

### 3.3 *Bevande fermentate*

La birra con quinoa disponibile in commercio proviene da un'antica birreria belga, a partire da orzo maltato e quinoa con metodi classici. Il processo di birrificazione prevede una doppia fermentazione: alla prima, che avviene durante il normale processo produttivo, se ne aggiunge una seconda che si completa in bottiglia, donandole un sapore speciale e la distintiva torbidità.

Le tipologie di birra prodotte con quinoa disponibili in commercio sono due (Figura 3.4):

- birra scura con riso e quinoa 330 mL;
- birra chiara con riso e quinoa 330 mL.



**Figura 3.4.** A sinistra è riportata la birra chiara con quinoa; a destra è riportata la birra scura con quinoa

### 3.4 *Prodotti da prima colazione e snacks con quinoa*

Con la farina di questo pseudocereale possono essere preparati biscotti, snacks, e prodotti per la prima colazione.

Gli snack-foods espansi di quinoa sono normalmente prodotti con il processo di estrusione-cottura (Hoseney, 1994). Ruales *et al.* (1993) studiarono gli effetti di vari parametri sull'estrusione cottura di grits di quinoa.

Coulter e Lorenz (1991) realizzarono inoltre, l'estrusione-cottura degli snacks con una migliore qualità nutrizionale rispetto allo stesso prodotto ottenuto con solo mais.

In commercio è possibile trovare alcuni snack (Figura 3.5), quali: il ciki uno snack ottenuti con quinoa, arachidi, caffè, l'uvetta e i crispies ricoperti al cioccolato; i BriBon uno snack con cioccolato bianco e quinoa soffiata, anacardi o noci cajou tostati o caramellati, caffè e guaranà in polvere. Con la quinoa si producono anche crackers al sesamo e tapioca chiamati Rudi.



Figura 3.5. Snacks e crackers con quinoa

### 3.5 *Altri impieghi della quinoa*

#### 3.5.1 *Amido e saponine*

Dalla quinoa è possibile estrarre l'amido che trova diverse applicazioni: nell'industria della stampa (Jane *et al.*, 1994; Wilhelm *et al.*, 1998), come supporto per cosmetici (Figura 3.6)

(Whistler, 1995) e nell'industria tessile e fotografica (Biliaderis *et al.*, 1993). L'amido è anche utilizzato per la realizzazione di film biodegradabili. Le saponine della quinoa, per la loro capacità di formare schiume, possono trovare applicazione nella produzione di saponi, detergenti, shampoo, cosmetici, produzione di schiume per estintori (Johnson e Ward, 1993).



**Figura 3.6.** Applicazione della quinoa nella cosmesi

Diversi studi hanno evidenziato l'effetto positivo delle saponine sulla riduzione del colesterolo (Oakenfull e Sidhu, 1990) e alcuni autori suggeriscono l'impiego di saponine come nutraceutici (Fleming e Galwey, 1995). Inoltre le saponine possono essere applicate come agenti antibatterici e antifungini (Koziol, 1992). Dutchesses e Danyluk (2002) hanno dimostrato che le saponine della quinoa possono essere utilizzate per prevenire alcune malattie di piante causate specialmente da funghi.

### **3.5.2 Pasta gluten-free**

La celiachia può essere definita come un'intolleranza alle proteine del glutine, presenti in alcuni cereali quali: frumento, orzo, triticale, farro e avena (Thompson, 1997).

La quinoa non contiene glutine per cui può essere utilizzata dai celiaci e tutti coloro che presentano intolleranze o allergie alimentari. Caperuto *et al.* in Brasile, attraverso un lavoro di promozione della quinoa, realizzarono spaghetti gluten-free (Caperuto *et al.*, 2000). Gli spaghetti erano stati realizzati con una miscela di farina di quinoa (10%), farina di mais e albume d'uovo. Il processo consisteva nel sottoporre la miscela di ingredienti a vapore diretto per favorire la gelatinizzazione dell'amido, seguita dall'estrusione dell'impasto. Gli spaghetti ottenuti erano sufficientemente paragonabili agli spaghetti ottenuti con sola semola di frumento dal punto di vista sensoriale, ma con una migliore qualità proteica.

### 3.5.3 Prodotti per l'infanzia

Nelle regioni Andine, nelle vicinanze del lago Titicaca, nel nord della Bolivia, la nutrizione dei bambini dopo svezzamento è un problema in quanto i bambini fin dall'infanzia sono nutriti con solo cibo amidaceo, specialmente patate, che hanno un basso valore energetico e nutrizionale.

Ruales (1998) e i suoi collaboratori nell'Ecuador seguendo una particolare tecnologia hanno realizzato della farina istantanea di quinoa per dolci per l'infanzia, al fine di incrementare la presenza di nutrienti essenziali nell'alimentazione dei bambini. La figura 3.7 riporta il diagramma di flusso utilizzato per la preparazione di farine istantanee a partire dalla quinoa.

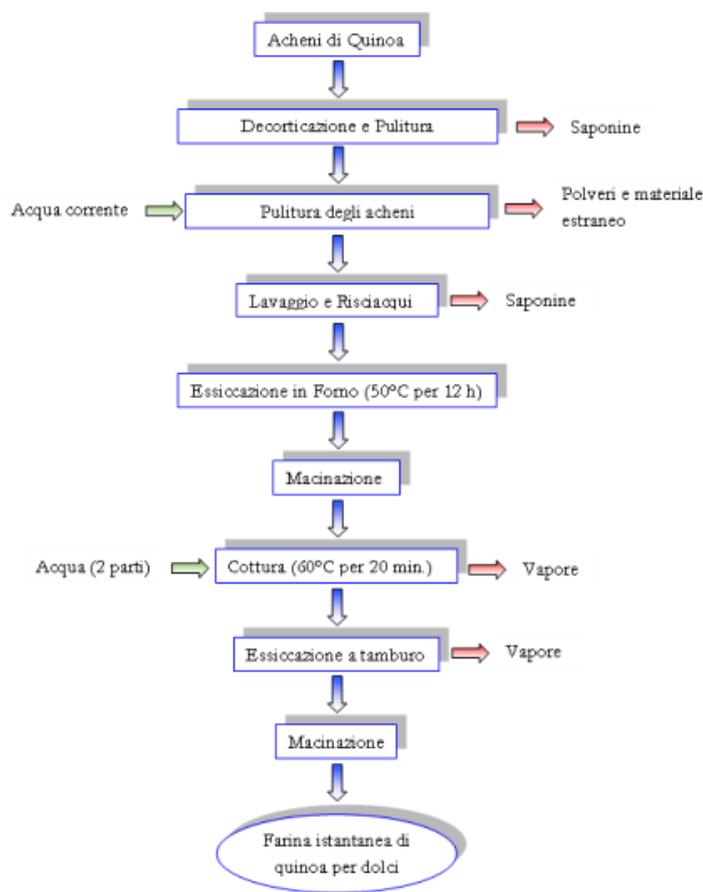


Figura 3.7. Diagramma di flusso per la produzione di farina istantanea per dolci

### 3.6 Altre applicazioni della quinoa

La quinoa è stata considerata come un potenziale raccolto per NASA CELLS (Controlled Ecological Life Support System). Il concetto di CELLS nasce dalla possibilità di utilizzare la quinoa come alimento per gli astronauti in quanto ricco di proteine ad alto valore biologico e come pianta per rimuovere il biossido di carbonio dall'atmosfera (Schlick & Bubenheim, 1996).

## ***Capitolo 4. Materiali e metodi***

### ***4.1 Campionamento***

I campioni di quinoa pervenuti al DiAAA, di diverse specie, sono stati forniti dal CNR – Istituto per i sistemi Agricoli e Forestali del Mediterraneo (ISAFoM) e conservati in frigorifero a 4°C fino al momento dell'analisi.

È stata effettuata una caratterizzazione per confrontare due distinti genotipi: KVLQ520Y (International Potato Center, Lima, Perù) e Regolana Baer (Cile). Per individuare l'epoca di impianto più idonea per l'ambiente di prova sono state eseguite, solo per il primo genotipo, semine in due diverse epoche (sigla campioni KA, KM). Per il secondo genotipo (sigla campione RB) è stata effettuata un'unica semina.

Per le prove analitiche, i campioni di quinoa tal quale sono stati macinati con un macinino da laboratorio dotato di un sistema di raffreddamento ad acqua (IKA A10-IKAWERKE GmbH & CO. KG. Staufen, Germania) e sottoposti quindi ad analisi centesimale le cui metodiche sono di seguito riportate.

### ***4.2 Determinazione dell'umidità***

Per la determinazione dell'umidità è stato utilizzato il metodo riportato sulla G.U. del 21/06/1985 n. 145. In un pesafiltro precedentemente condizionato in stufa a 105°C, sono stati pesati circa 0,5 g di campione, i pesafiltri sono stati quindi posti in stufa termostata a 105°C per 4 ore fino a peso costante. Successivamente è stato prelevato il pesafiltro dalla stufa e, dopo averlo fatto raffreddare in essiccatore, è stato pesato con una bilancia analitica.

Il tenore di umidità, espresso in percentuale, è dato dalla differenza tra il peso del campione prima e dopo l'essiccamento.

### ***4.3 Determinazione delle ceneri***

Le ceneri rappresentano il contenuto in sostanze minerali presenti in una determinata matrice alimentare. Queste al contrario degli altri componenti, non vengono incenerite in muffola a 525°C.

Per l'analisi sono stati pesati circa 0,25 g di campione in capsule precedentemente tarate in muffola a 525°C e raffreddate in essiccatore. Il campione, a questo punto, è stato prima carbonizzato a piccola fiamma e successivamente posto in muffola a 525°C per l'intera notte,

fino ad ottenere ceneri bianche. Trascorso il tempo necessario, le ceneri sono state raffreddate in essiccatore e pesate.

#### ***4.4 Determinazione del contenuto in grassi***

Per la determinazione del contenuto in grassi è stato utilizzato il metodo NGD B4 1976 (Soxhlet). L'analisi è stata effettuata su 5 g di campione finemente macinato e posto in un ditale di cellulosa. Il ditale è stato poi introdotto nel corpo estrattore del Soxhlet alla cui base va sistemato il pallone di vetro da 250 mL, precedentemente pesato. Dall'alto del corpo estrattore è stato poi aggiunto etere di petrolio in quantità tale da provocare il sifonamento. A questo punto è stato regolato il riscaldamento del bagnomaria (posto al di sotto dei palloni) in modo da provocare un sifonamento ogni 15 minuti per 8 ore. Terminata la fase di estrazione, il grasso estratto si trova nel pallone insieme al solvente. Quest'ultimo è stato quindi allontanato con evaporatore rotante, dopodiché il pallone è stato posto in stufa per 1 ora a 105°C, raffreddato in essiccatore e pesato.

#### ***4.5 Analisi degli acidi grassi***

Sulla frazione lipidica della quinoa è stata effettuata la caratterizzazione degli acidi grassi. In particolare l'analisi è stata eseguita sul grasso estratto con il sistema Soxhlet previa derivatizzazione come di seguito descritto.

A 10 mg di grasso sono aggiunti 50 µL di una soluzione di KOH 2N in metanolo e 1,2 mL di esano. La provetta tappata è stata agitata con vortex per 1 minuto; quindi, dopo la separazione delle due fasi la frazione esanica è stata utilizzata per l'analisi cromatografia seguendo la metodica riportata sulla G.U. n. 198 del 21 luglio 1981.

La composizione in acidi grassi dello sfarinato di quinoa è stata determinata mediante gascromatografia sui rispettivi esteri metilici, ottenuti mediante reazione di metilazione descritti in precedenza. È stato utilizzato un GC Clarus 500 Perkin Elmer (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), dotato di rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID). Le condizioni operative sono di seguito riportate:

- colonna capillare in silice fusa Rtx 2330 rivestita di fase stazionaria polare di 10% fenilcianopropil-polisilossano - 90% dicianopropil (Restek-Bellefonte PA, USA), lunghezza 30 m, 0,25 mm ID, 0,2 µm df;
- temperatura del forno: da 120°C a 230°C con un incremento di temperatura di 5°C al min;

- temperatura iniettore e rivelatore 240°C;
- flusso del carrier gas (He): 2 mL/min.

L'identificazione degli acidi grassi è stata effettuata mediante confronto dei tempi di ritenzione dei composti rivelati con quelli di una miscela standard di acidi grassi.

#### **4.6 *Determinazione dell'amido totale***

La determinazione effettuata ha previsto l'idrolisi dell'amido in due fasi.

Nella prima fase l'amido è stato idrolizzato con formazione di destrine e totalmente solubilizzato mediante l'utilizzo dell'enzima  $\alpha$ -amilasi termostabile in un bagno di acqua bollente per 6 minuti.

Nella seconda fase le destrine sono state idrolizzate a glucosio mediante l'utilizzo dell'enzima amiloglicosidasi a 50°C per 30 minuti.

Il glucosio formato è stato quantificato spettrofotometricamente a 510 nm dopo reazione con il GOPOD a 50°C per 20 minuti.

#### **4.7 *Determinazione delle proteine***

Per la determinazione del contenuto in proteine è stato utilizzato il metodo riportato sulla G.U. n. 114 del 10/08/94.

Attraverso una mineralizzazione le sostanze azotate presenti nel campione sono ossidate con acido solforico concentrato in presenza di un catalizzatore; il solfato di ammonio che si forma nella reazione è trattato con alcali, e l'ammoniaca che si libera viene determinata mediante distillazione e titolazione.

Per l'analisi sono stati pesati esattamente circa 0,5 g di campione. Al campione introdotto in appositi tubi sono stati aggiunti una pasticca di solfato di rame come catalizzatore, 10 mL di acido solforico concentrato (98%;  $d=1,84$ ) e 3 mL di acqua ossigenata.

È stata effettuata la mineralizzazione fino ad ottenere una soluzione verde brillante e limpida. Dopo il raffreddamento di ogni tubo sono stati aggiunti 50 mL di acqua distillata e 8 mL di acido tartarico al 20%. Sono state preparate le beute di raccolta in cui sono stati aggiunti in ciascuna 20 mL di acido borico al 4% p/v e 4 gocce di indicatore.

È stata effettuata la distillazione con distillatore, aggiungendo NaOH finché la soluzione nel tubo sia diventata blu e facendo proseguire la distillazione fino a raccogliere 200 mL di distillato nella beuta di raccolta.

Il distillato ottenuto contenente azoto è stato titolato con acido solforico 0,1 N fino al viraggio della soluzione in presenza di un indicatore specifico per l'azoto.

#### ***4.8 Determinazione degli amminoacidi totali***

Il contenuto in amminoacidi dei differenti campioni è stato valutato mediante cromatografia a scambio ionico previa idrolisi acida del campione. L'idrolisi è stata condotta in ambiente acido con HCl 6N e in assenza di ossigeno seguendo la metodica riportata da Moore *et al*, 1985. È stata pesata una quantità di campione tale da avere un tenore in proteine pari a 20-40 mg, direttamente in palloni con giunto sferico, al quale è stato applicato un rubinetto per effettuare il vuoto. In base al quantitativo di proteine pesate è stata aggiunta una quantità di HCl 6N pari a "1 mg di proteina/1mL di HCl". Il campione è stato quindi posto in stufa a 110°C per 24 h.

Dopo idrolisi del campione la valutazione degli amminoacidi è stata effettuata utilizzando un cromatografo a scambio ionico ad alta prestazione con rilevazione ad amperometria pulsata (HPAEC-PAD; Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA), composto da una pompa a gradiente (mod. GP50) con degaser on-line ed un detector elettrochimico (mod. ED40).

Il controllo dello strumento, la raccolta dei dati e la quantificazione totale sono stati effettuati mediante software cromatografico Peak Net (Dionex).

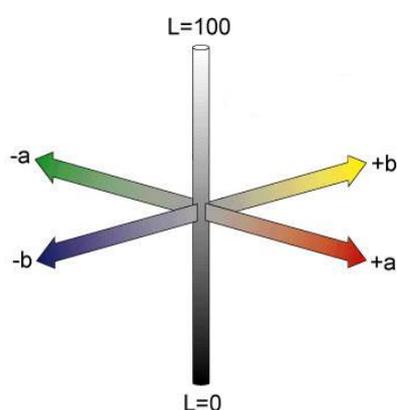
Il rivelatore risulta costituito da una cella elettrochimica a flusso continuo (Dionex) costituita da un elettrodo di lavoro dal diametro di 1mm, un elettrodo di riferimento a pH e il corpo in titanio della cella che funge da contro elettrodo. L'ossidazione o la riduzione delle molecole dell'analita viene realizzata applicando un potenziale all'elettrodo di lavoro rispetto ad un elettrodo di riferimento.

Per l'iniezione del campione è stato utilizzato un iniettore Rheodyne (Cotai, CA, USA) con un loop da 25µL. La separazione è stata effettuata con una colonna analitica 250 x 2 mm Aminopac PA 10 con dimensione delle particelle pari a 8,5µL (Dionex).

La determinazione quantitativa è stata condotta ad una velocità di flusso di 0,25mL/min, utilizzando una fase mobile a gradiente di acqua, 250 mM di sodio drossido e 1,0 M di sodio acetato.

## 4.9 *Analisi del colore*

Il metodo più usato per esprimere numericamente il colore di un campione è stato proposto dalla CIE (Commissione Internazionale de l'Eclairage) nel 1976 ed è denominato spazio colorimetrico  $L^*$   $a^*$   $b^*$  o più sinteticamente CIELab. Il sistema CIELab definisce il colore di un oggetto mediante una terna di valori numerici, indicati come  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ; i tre numeri misurano qualitativamente e quantitativamente la sensazione di colore percepita da un osservatore che abbia una visione dei colori standardizzata come normale (Osservatore Normale o Standard) (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Spazio colorimetrico  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$

I valori numerici di  $L^*$ : indice di bruno,  $a^*$ : indice di rosso,  $b^*$ : indice di giallo sono stati determinati mediante il colorimetro Minolta mod. CR-300 (Minolta Italia S.p.a., Milano) utilizzando come sorgente di luce l'illuminante standard D65.

## 4.10 *Estrazione e valutazione delle saponine della quinoa*

In questa ricerca è stato utilizzato il metodo di quantificazione delle saponine riportato da Ridout *et al.*, (1991) e da Bialy *et al.*, (2006) con opportune modifiche.

### 4.10.1 *Estrazione delle saponine*

L'estrazione è stata effettuata su 3g di campione, preventivamente sgrassati con il sistema Soxhlet per 10h utilizzando etere etilico come solvente di estrazione. Questa operazione si è resa necessaria per eliminare la componente lipidica che interferisce in maniera significativa con le successive analisi cromatografiche.

Allo sfarinato di quinoa sgrassato è stato aggiunto l'acido ursolico come standard interno per la quantificazione dei componenti di interesse quindi si è proceduto all'idrolisi del campione a

caldo (60°C) per una durata di 3h in presenza di 40 mL di HCl 2N in metanolo. Al termine dell'idrolisi sono stati aggiunti 20 mL di acqua distillata e modulato il pH (con una soluzione di NH<sub>3</sub>) fino al raggiungimento della neutralità. Le sapogenine sono state estratte con 30 mL di etil acetato; la frazione organica è stata recuperata mentre sull'idrolizzato sono state condotte altre 2 estrazioni ciascuna con 30 mL di etil acetato.

Le tre frazioni organiche contenenti le sapogenine sono state riunite e trasferite in una beuta a collo smeriglio alla quale è stato aggiunto sodio solfato anidro. Dopo 1 ora di riposo, la fase organica è stata filtrata, recuperata ed essiccata con evaporatore rotante. Il residuo secco è stato recuperato con 1 mL di cloroformio:etanolo 2:1 (v/v) quindi conservato in freezer fino al momento dell'analisi.

#### ***4.10.2 Cromatografia su stato sottile (TLC) per la purificazione delle saponine***

Gli estratti di saponine sono stati purificati mediante TLC con lastre di silice (20x20 cm, spessore della fase stazionaria 0,25 mm), su ciascuna delle quali, sono stati depositati 10 µL di idrolizzato (Kim *et al.*, 1994). Le lastre sono state quindi introdotte in una camera di sviluppo preventivamente condizionata con la fase mobile costituita da una miscela di benzene:metanolo in rapporto 90:10 (v/v), mantenuta a temperatura ambiente di circa 20°C, fino al termine della separazione cromatografica (10 cm di corsa). Al termine della corsa le lastre sono state asciugate sotto cappa e poste in stufa a 105°C per 5 min per visualizzare la bande di interesse.

La posizione caratteristica della banda delle sapogenine è stata accertata mediante la deposizione puntiforme, accanto al campione di una soluzione standard di acido oleanolico.

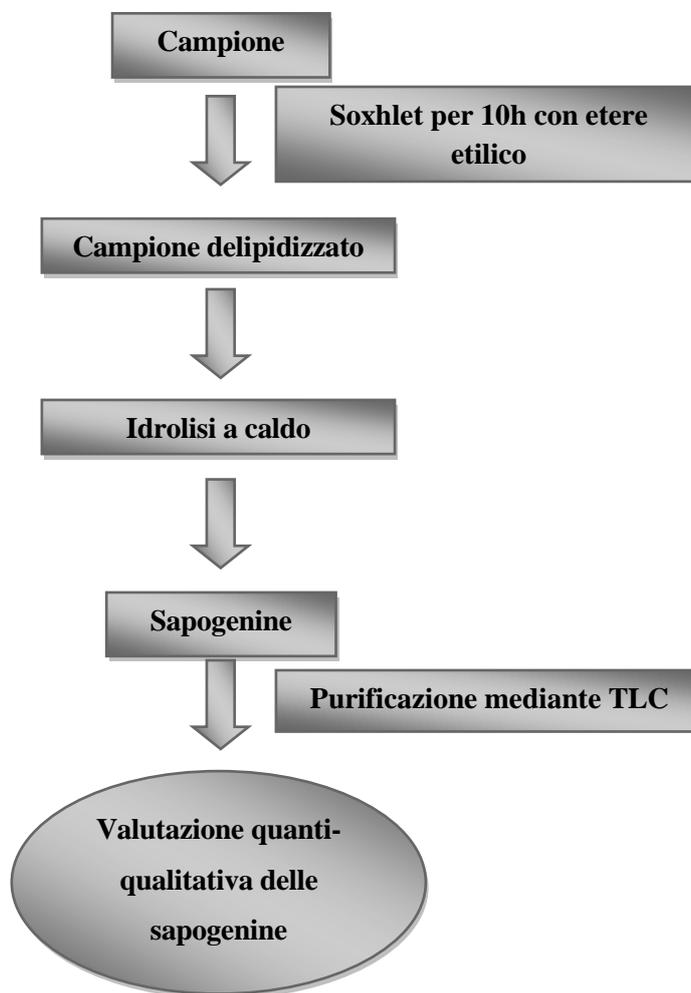
Raschiando il gel di silice con l'utilizzo di una spatola, è stato possibile asportare l'area della lastra contenente le sapogenine.

Per il recupero delle sapogenine sono state effettuate tre successive estrazioni impiegando ogni volta 1 mL di cloroformio.

#### ***4.10.3 Derivatizzazione delle sapogenine (Cuadraro *et al.*, 1995)***

La derivatizzazione è stata realizzata con 100 µL di BSTFA e 200 µL di piridina. La provetta troncoconica è stata posta in bagnomaria termostata a 50°C per 30 minuti, e agitata al vortex ogni 10 minuti, per qualche secondo. Il residuo, è stato essiccato sotto flusso di azoto, solubilizzato in 50 µL di esano e analizzato in GC.

La figura 4.2 riporta lo schema analitico seguito per l'estrazione e successiva valutazione delle sapogenine.



**Figura 4.2.** Schema analitico seguito per l'estrazione e successiva valutazione delle sapogenine

#### ***4.10.4 Analisi GC delle saponine***

La quantificazione delle sapogenine è stata eseguita per via gas cromatografica, con uno strumento HRGC 5300 Mega Series (Carlo Erba, Rodano, Milano), munito di rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID).

Di seguito sono riportate le condizioni analitiche adottate:

- colonna capillare ZB-5HT della Phenomenex (30x 0,32 mm x0,25 µm) con una fase stazionaria 5% phenyl-95% dimethylpolysiloxane;
- temperatura programmate del forno: da 180 a 230 con incremento di 8°C/min e da 230 a 350 con incremento di 6°C/min;
- temperatura iniettore e rivelatore: 370°C;
- flusso del carrier gas: (He), 1,2 mL/min.

La determinazione del contenuto in saponine è stata effettuata anche per il pane e per i biscotti successivamente descritti, utilizzando la stessa metodica su menzionata.

## ***4.11 Determinazione del contenuto in steroli***

### ***4.11.1 Estrazione degli steroli***

La determinazione degli steroli è stata effettuata sul grasso estratto con il metodo Soxhlet dopo saponificazione a freddo (Sanders *et al.*, 1989). In particolare al grasso sono stati aggiunti 40 mL di soluzione 1N di KOH in metanolo. La miscela è stata agitata fino alla comparsa di finissime goccioline di grasso disperse nella soluzione metanolica. La saponificazione è stata condotta a temperatura ambiente e al riparo dalla luce sotto leggera agitazione per 18-20 ore.

Al termine della saponificazione la soluzione è stata trasferita in un imbuto separatore, addizionata di 20 mL d'acqua e di 30 mL di etere etilico.

La fase eterea è stata recuperata mentre la fase acquosa ha subito altri due lavaggi con 20 mL e 15 mL di etere etilico rispettivamente; quando le due fasi si sono separate, si è proceduto al recupero della fase eterea.

Le tre frazioni eterie sono state riunite e lavate per due volte con 5 mL di KOH 0,5N quindi con acqua, fino a neutralità delle acque di lavaggio.

La frazione eterea contenente gli steroli è stata trasferita in una beuta a collo smeriglio alla quale è stato aggiunto sodio solfato anidro. Dopo 2 ore di riposo, la fase organica è stata filtrata, recuperata ed essiccata sotto flusso di azoto.

L'insaponificabile è stato recuperato con 1 mL di esano:isopropanolo 4:1 (v/v) e conservato in freezer.

### ***4.11.2 Cromatografia su stato sottile (TLC) per la purificazione della frazione sterolica***

Gli steroli sono stati purificati mediante TLC, che permette di separare i vari composti sulla base della loro polarità.

Nel caso specifico la purificazione degli steroli è stata eseguita con lastre di silice (20x20 cm, spessore della fase stazionaria 0,25 mm), su ciascuna delle quali, è stata depositata la frazione insaponificabile. Le lastre sono state quindi introdotte in una camera di sviluppo preventivamente condizionata con la fase mobile costituita da una miscela di esano: etere etilico in rapporto 70:30 (v/v), mantenuta a temperatura ambiente di circa 20°C, fino al

termine della separazione cromatografica (10 cm di corsa). Al termine della corsa le lastre sono state asciugate sotto cappa e rivelate nebulizzando in modo uniforme una soluzione etanolica allo 0,2% del sale sodico di 2'-7'-dicloroluoresceina, che consente di visualizzare le diverse bande mettendo la lastra sotto lampada UV a 365-254 nm.

La posizione caratteristica delle bande ( $R_f$  steroli=0,1), è stata accertata mediante la deposizione puntiforme, accanto al campione di 0,015 mg delle soluzioni standard di  $\beta$ -sitosterolo.

Raschiando il gel di silice con l'utilizzo di una spatola, è stato possibile asportare l'area della lastra contenente i gli steroli.

Per il recupero degli steroli sono state effettuate tre successive estrazioni impiegando ogni volta 1 mL di cloroformio. Il solvente è stato evaporato sotto flusso di azoto, gli steroli ottenuti sono stati derivatizzati.

#### ***4.11.3 Derivatizzazione dei trimetilsilileteri (TMSE) (Sweeley et al., 1963)***

Nella provetta contenente gli steroli è stato aggiunto il reattivo silanizzante, costituito da una miscela di piridina-esametildisilazano-trimetilclorosilano 9:3:1 (v/v/v) in quantità pari a 400  $\mu$ L evitando l'assorbimento di umidità. La provetta chiusa è stata posta in bagnomaria termostata a 45°C per 60 minuti e agitata al vortex ogni 10 minuti, per qualche secondo. Il residuo, è stato essiccato sotto flusso di azoto, solubilizzato in 50  $\mu$ L di esano e analizzato in GC.

#### ***4.11.4 Analisi GC degli steroli***

La determinazione degli steroli, è stata eseguita per via gas cromatografica, con uno strumento HRGC 5300 Mega Series (Carlo Erba, Rodano, Milano), munito di rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID).

Di seguito sono riportate le condizioni analitiche adottate:

- colonna capillare SE52 di silice fusa ricoperta di uno strato di 5% fenil-95% dimetilpolisilossano (Phenomenex, Torrence, USA) lunga 30 m, i.d. 0,25 mm, spessore del film 0,2  $\mu$ m;
- temperatura del forno: da 270°C a 325°C con un incremento di temperatura di 3°C al minuto;
- temperatura dell'iniettore e del rivelatore (FID): 330°C;
- flusso del carrier gas (He): 1 mL/min.

#### **4.12 Prove di perlatura**

Poiché le saponine sono principalmente localizzate negli strati più esterni dell'achenio di quinoa (Chauhan *et al.*, 1992), è stato applicato il processo di perlatura per allontanare tali composti.

In questa ricerca sono state effettuate prove di perlatura su diversi campioni di quinoa; le prove sono state eseguite utilizzando un perlatore da laboratorio modello TM-05 Taka-Yama, testing Mill (Irom Italia Brugherio, Milano). Il processo è stato avviato in modo da rimuovere differenti percentuali dello strato superficiale dell'achenio ottenendo un grado di perlatura pari al 20 e al 30%. Gli acheni di quinoa perlata sono stati successivamente macinati con un macinino da laboratorio IKA A 10 Laborotechnic (Tanke & Kunkel, Gmbh & Co., Staufe, Germany); quindi sugli sfarinati è stato valutato il contenuto in saponine con la metodica descritta in precedenza ed è stata determinata la composizione chimica percentuale.

## Capitolo 5. Risultati e discussione

### 5.1 Caratterizzazione chimico-nutrizionale di varietà di quinoa

Nella prima fase delle attività di ricerca i diversi genotipi di quinoa (KA, KM e RB), coltivati presso l'Istituto per i Sistemi Agricoli e Forestali del Mediterraneo – ISAFoM, sono stati caratterizzati dal punto di vista chimico-nutrizionale (Tabella 5.1).

**Tabella 5.1.** Composizione chimica (g/100g s.s.) delle differenti varietà di quinoa

| Campione     | Proteine  | Lipidi   | Ceneri     | Amido     | Fibra alimentare * |
|--------------|-----------|----------|------------|-----------|--------------------|
| <b>KA</b>    | 16,2±0,08 | 7,8±0,02 | 4,28±0,276 | 55,6±2,34 | 16,1±2,12          |
| <b>KM</b>    | 16,5±0,04 | 7,8±0,01 | 4,07±0,017 | 54,8±3,58 | 16,9±0,79          |
| <b>RB</b>    | 16,8±0,08 | 7,9±0,10 | 3,96±0,15  | 52,8±0,77 | 18,6±1,89          |
| <b>Media</b> | 16,5      | 7,8      | 4,1        | 54,4      | 17,2               |
| <b>CV%</b>   | 1,8       | 0,7      | 4,0        | 2,7       | 7,4                |

\*Calcolata per differenza

Come si osserva la quinoa presenta un contenuto proteico più alto se paragonato ai comuni cereali con valori mediamente pari a 16,5%.

È interessante osservare valori elevati in ceneri (4,1 g/100g s.s.) e in fibra alimentare (17,2 g/100g s.s.), più alti di quelli riportati in letteratura (Coulter & Lorenz, 1990; Ruales & Nair, 1994). L'amido, che rappresenta il componente principale della quinoa, mostra un valore medio di 54,4%.

Gli sfarinati di quinoa si distinguono inoltre per l'elevato contenuto lipidico pari a 7,8% in accordo con quanto riportato da diversi autori (Chauhan *et al.*, 1992; Ranhotra *et al.*, 1993).

Sulla quinoa è stata effettuata la valutazione del peso dei mille semi. Le varietà KA e KM hanno mostrato un peso inferiore (Media=3,73 g) rispetto alla varietà RB (Media=2,52 g).

Tali risultati giustificano il più alto contenuto in fibra nella varietà RB dovuto alle dimensioni più ridotte degli acheni rispetto alle varietà KA, KM (Tabella 5.1) e quindi ad una incidenza maggiore degli strati corticali ricchi di fibra.

### 5.1.1 Caratterizzazione della frazione lipidica

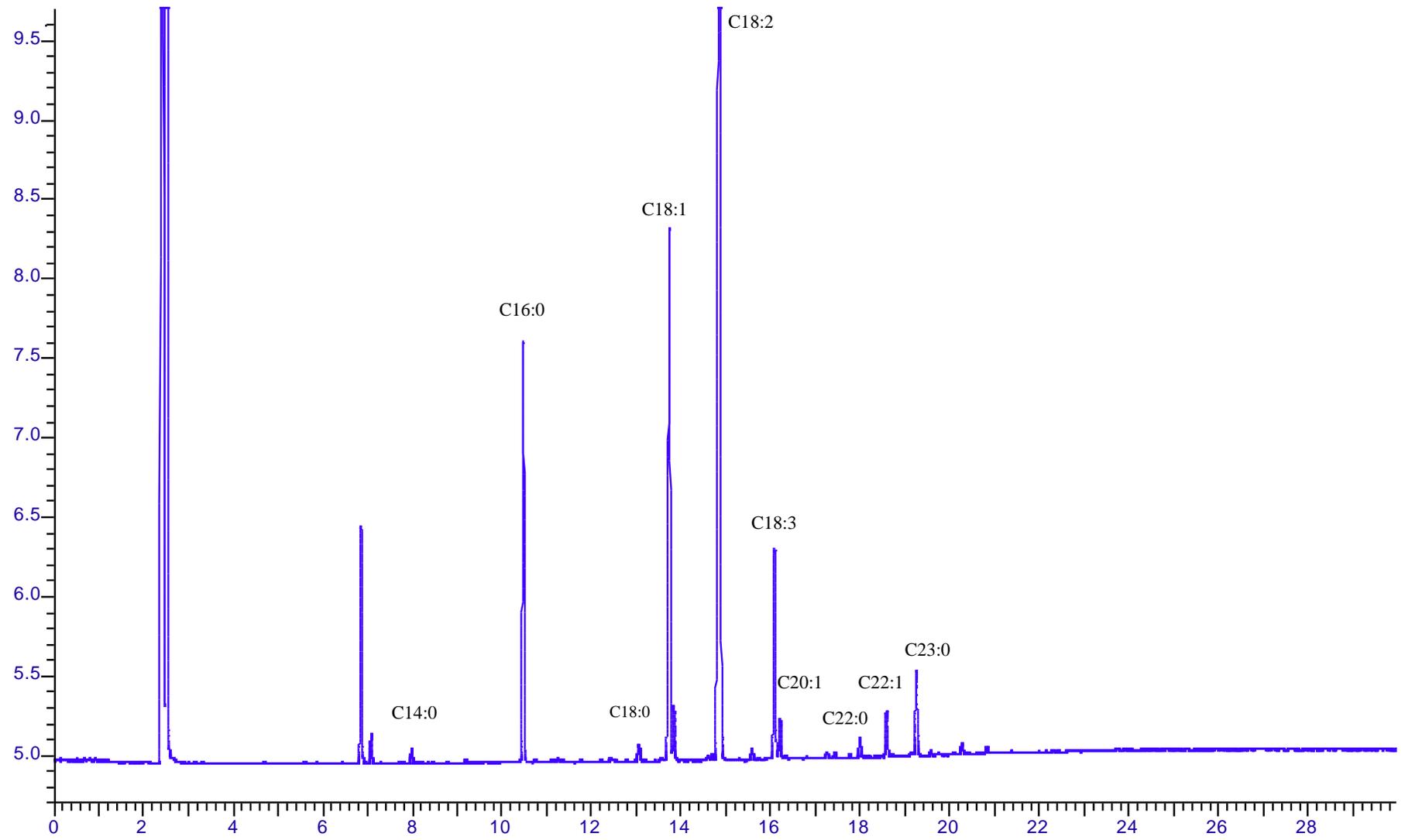
Sulla frazione lipidica della quinoa è stata effettuata la valutazione degli acidi grassi (Figura 5.1). Dal punto di vista qualitativo la frazione lipidica della quinoa si caratterizza per la presenza di acidi grassi polinsaturi che complessivamente rappresentano l'82-83% degli acidi grassi totali (Tabella 5.2). L'acido linoleico (C18:2) è il principale acido grasso insaturo (58-60%), seguono l'acido oleico (C18:1) (14,8-16,6%) e l'acido linolenico (C18:3) (5%). Tra i saturi, si è registrata la presenza dell'acido palmitico (C16:0) (10-11%) e dell'acido stearico (C18:0) (0,4-0,5%), confermando quanto riportato da Da Ruales e Nair (1993a) (Tabella 5.2). Dato l'alto contenuto lipidico e la presenza di acidi grassi insaturi della serie n-6 e n-3 la quinoa potrebbe essere utilizzata per estrarre dell'olio con particolari caratteristiche; la quinoa infatti è spesso definita una pianta pseudo-oleaginosa (Koziol, 1993).

Oltre alla caratterizzazione della componente acidica, si è proceduto con l'analisi cromatografica degli steroli. Tali composti, poiché sono caratteristici per ogni singola specie botanica, possono essere utilizzati per differenziare le diverse specie, costituendo così una vera e propria impronta digitale.

Contrariamente a quanto riportato per i cereali (Pelillo *et al.*, 2003) gli steroli della quinoa sono caratterizzati da un ridotto contenuto in stanoli. In particolare si è osservata la presenza del campesterolo (2,0 mg/100g s.s.), stigmasterolo (5,6 mg/100g s.s.) e  $\beta$ -sitosterolo (47,2 mg/100g s.s.) (Tabella 5.3). La presenza di tali steroli è stata osservata anche da Xu *et al.* (1990). Inoltre si è riscontrata la presenza di un picco rilevante, in fase di identificazione, che cade nella zona del cromatogramma corrispondente al  $\Delta^7$  sitosterolo.

**Tabella 5.3.** Contenuto in steroli (mg/100g s.s.) dei genotipi di quinoa

| Campioni | Campesterolo   | Stigmasterolo  | $\beta$ -Sitosterolo | Altro sterolo   | Totale |
|----------|----------------|----------------|----------------------|-----------------|--------|
| KCA      | 2,1 $\pm$ 0,12 | 6,1 $\pm$ 0,31 | 46,6 $\pm$ 1,25      | 39,2 $\pm$ 0,88 | 23,5   |
| RBC      | 1,9 $\pm$ 0,05 | 4,7 $\pm$ 0,22 | 51,6 $\pm$ 0,75      | 43,5 $\pm$ 1,15 | 25,4   |
| KCM      | 2,0 $\pm$ 0,15 | 5,9 $\pm$ 0,53 | 43,4 $\pm$ 0,98      | 40,2 $\pm$ 1,03 | 22,9   |
| Media    | 2,0            | 5,6            | 47,2                 | 41,0            | 23,9   |
| CV%      | 3,9            | 13,9           | 8,7                  | 5,4             | 5,5    |



**Figura 5.1.** Tracciato GC degli acidi grassi della quinoa

**Tabella 5.2.** Composizione in acidi grassi (% acido grasso/totale acidi grassi) della quinoa

| Campione | C14:0    | C16:0     | C18:0    | C18:1     | C18:2     | C20:0    | C18:3    | C20:1    | C22:0    | C22:1    | C23:0    | altri    |
|----------|----------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| KA       | 0,3±0,01 | 10,6±0,28 | 0,5±0,02 | 16,6±0,06 | 58,8±0,16 | 0,3±0,02 | 5,6±0,06 | 1,1±0,00 | 0,4±0,04 | 1,1±0,01 | 2,2±0,27 | 2,6±0,07 |
| KM       | 0,3±0,06 | 10,4±0,35 | 0,5±0,03 | 15,5±0,06 | 60,0±0,11 | 0,3±0,01 | 5,5±0,01 | 1,1±0,06 | 0,5±0,01 | 1,2±0,01 | 2,3±0,08 | 2,6±0,00 |
| RB       | 0,3±0,04 | 10,8±0,98 | 0,5±0,08 | 14,8±0,05 | 59,2±0,23 | 0,3±0,13 | 5,3±0,08 | 1,1±0,02 | 0,5±0,08 | 1,3±0,08 | 3,5±0,25 | 2,5±0,26 |
| Media    | 0,3±0,04 | 10,6±0,54 | 0,5±0,04 | 15,7±0,06 | 59,3±0,17 | 0,3±0,05 | 5,5±0,03 | 1,1±0,03 | 0,5±0,04 | 1,2±0,03 | 2,6±0,2  | 2,6±0,11 |

### 5.1.2 Valutazione quanti/qualitativa delle saponine della quinoa

La quinoa si caratterizza per la presenza di specifiche sostanze, le saponine, localizzate negli strati più esterni dell'achenio. L'analisi GC ha rilevato la presenza di specifiche saponine idrolizzate (sapogenine) rappresentate da: acido oleanolico, ederagenina e fitolaccagenina.

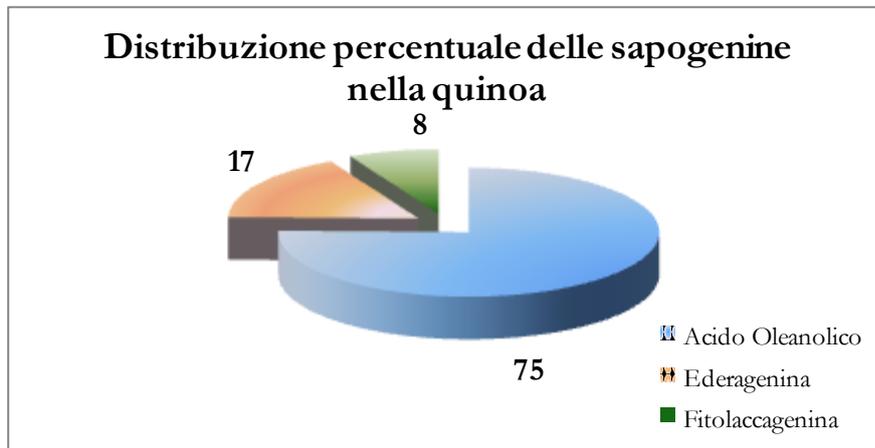
Dal punto di vista quantitativo nelle varietà di quinoa analizzate si è riscontrato un contenuto in sapogenine totali pari a 244,0-228,9 mg/100g s.s. per le varietà KA e KM; per la varietà RB si è riscontrato un contenuto maggiore di sapogenine pari a 333,5 mg/100g. s.s. (Tabella 5.4).

**Tabella 5.4.** Contenuto in sapogenine della quinoa (mg/100g s.s.)

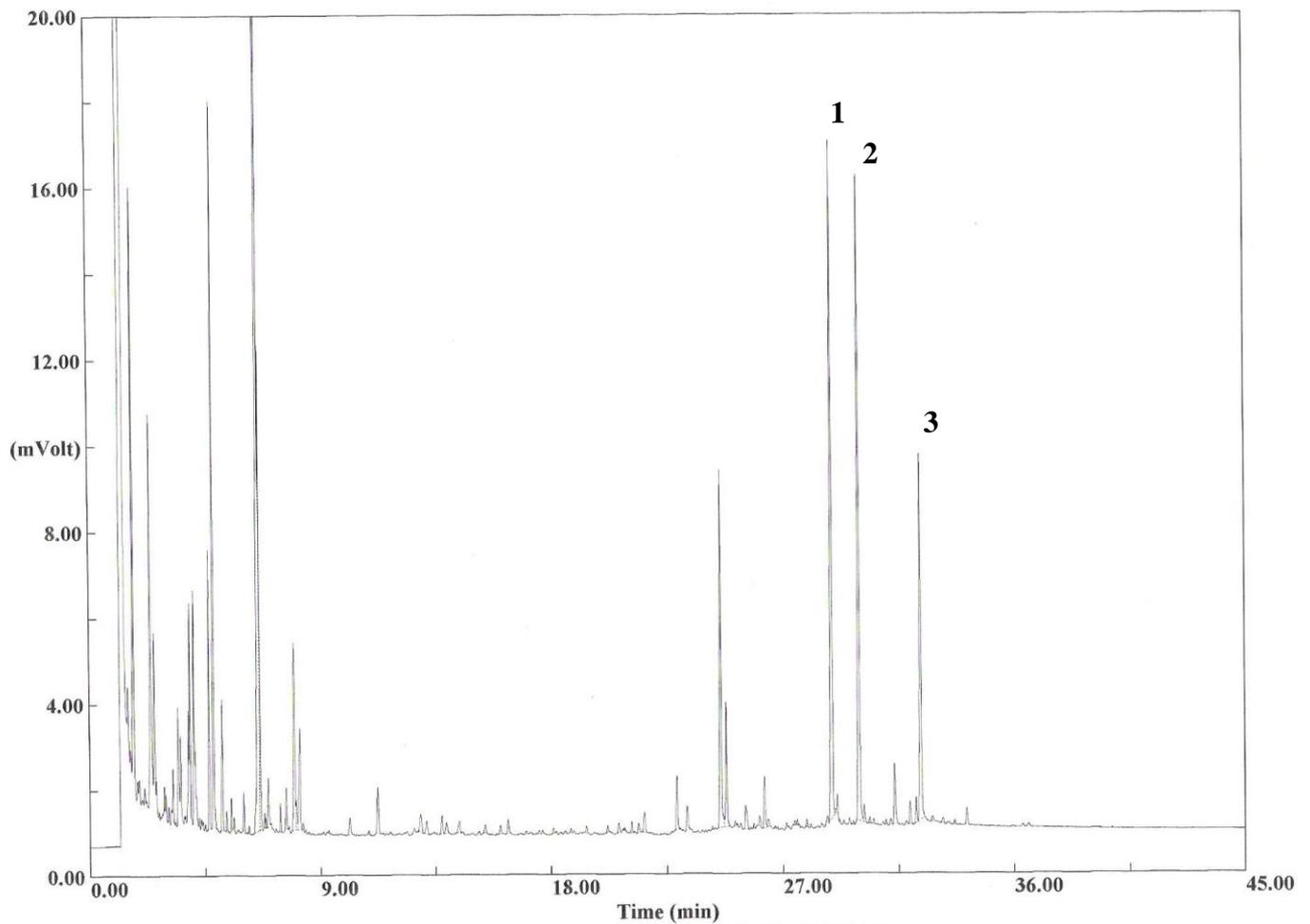
| Campione     | Sapogenine       |             |                 | Totale      |
|--------------|------------------|-------------|-----------------|-------------|
|              | Acido oleanolico | Ederagenina | Fitolaccagenina |             |
| <b>KA</b>    | 179,9±11,66      | 45,1±5,30   | 19,0±3,58       | 244,0±9,21  |
| <b>KM</b>    | 180,7±6,42       | 32,3±5,80   | 16,0±1,66       | 228,9±13,89 |
| <b>RB</b>    | 247,0±19,06      | 59,7±5,90   | 26,7±4,66       | 333,5±8,49  |
| <b>Media</b> | 202,5            | 45,7        | 20,6            | 268,8       |
| <b>CV%</b>   | 19,0             | 30,0        | 26,8            | 21,0        |

La quantificazione delle saponine è un parametro che permette di distinguere le varietà di quinoa “sweet” (contenuto in saponine < di 110 mg/100g ) dalle varietà “bitter”(contenuto in saponine > di 110 mg/100g) (Gee *et al.*, 1993); questa distinzione è di notevole interesse in quanto per fini tecnologici è importante utilizzare le varietà “sweet” a basso contenuto in saponine. L'analisi GC ha evidenziato che tutte le varietà di quinoa analizzate (KA, KM, RB) si collocano in una posizione intermedia tra i genotipi “sweet” e i genotipi “bitter”.

Dal punto di vista qualitativo come confermato dai dati bibliografici (Ridout *et al.*, 1991; Gee *et al.*, 1993) l'acido oleanolico rappresenta il principale componente delle saponine della quinoa con una percentuale del 75,35%, seguono l'ederagenina (17,00%) e la fitolaccagenina (7,65%) (Figura 5.2). La figura 5.3 riporta un tipico tracciato GC relativo alle sapogenine della quinoa.



**Figura 5.2.** Distribuzione percentuale media delle sapogenine nei campioni di quinoa analizzati



**Figura 5.3.** Tracciato GC delle sapogenine della quinoa: 1 acido oleanolico, 2 ederagenina, 3 fitolaccagenina

## **5.2 Impiego di tecniche fisiche per ridurre il contenuto in saponine**

Poiché le saponine sono principalmente localizzate negli strati più esterni dell'achenio di quinoa (Chauhan *et al.*, 1992), è stato applicato il processo di perlatura per allontanare tali composti. In particolare è stata sottoposta al processo di perlatura la varietà KA che presentava un basso contenuto in saponine. La perlatura è una tecnica fisica di separazione su base localizzativa ed è un processo ampiamente utilizzato per la produzione di cereali perlati da destinare all'alimentazione umana. Con la perlatura, i cereali vengono gradualmente privati dei tegumenti esterni mediante l'azione abrasiva di rulli.

Prove preliminari di decorticazione sono state effettuate, utilizzando un perlatore da laboratorio, per individuare le migliori condizioni operative per l'ottenimento del prodotto perlato senza depauperare l'achenio della componente nutrizionale. La perlatura è stata effettuata su 100g di acheni tal quali.

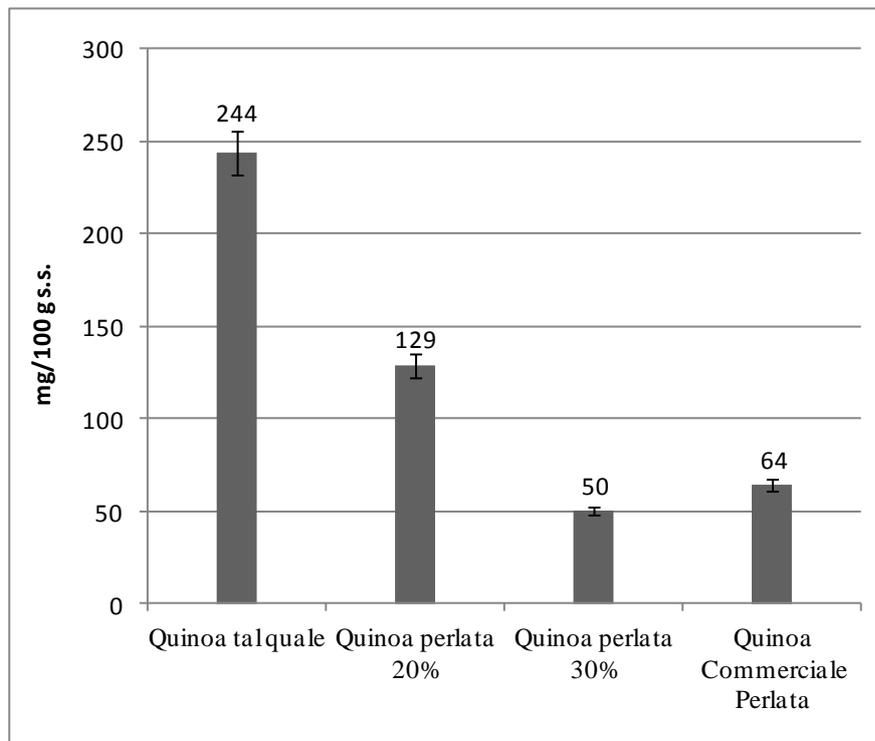
L'ampia disomogeneità degli acheni di quinoa ha reso necessario una preliminare setacciatura prima del processo di perlatura. Le dimensioni dell'achenio sono risultate essere, infatti, un elemento critico per il processo stesso sia in termini di resa che di omogeneità del prodotto trattato.

Inoltre, è stato valutato l'effetto del processo di perlatura sul contenuto in sostanze antinutrizionali. Modulando il tempo di perlatura si è osservato, in seguito ad analisi gas cromatografica, che la rimozione del 20% del pericarpo determina una riduzione in sapogenine totali di circa il 50% (129,6 mg/100g s.s.) rispetto al valore iniziale; tuttavia il prodotto che si ottiene contiene ancora una quantità di saponine percepibile a livello sensoriale. Infatti come indicato da Koziol (1993) l'amaro e dell'astringente nei prodotti a base di quinoa si percepiscono quando il contenuto in sapogenine è pari a circa 90-110 mg/100g.

L'applicazione di un grado di perlatura del 30% ha consentito di ridurre notevolmente il contenuto in sapogenine, con valori paragonabili a quanto riscontrato nel campione di quinoa perlata utilizzata come riferimento.

Infatti si è passati da valori iniziali di 244,0 mg/100g s.s. a valori di 50,9 mg/100g s.s. nel prodotto perlato con una riduzione in sapogenine totali di circa l'80% (Figura 5.4). Oltre ai campioni di quinoa oggetto della ricerca, è stato valutato il contenuto in sapogenine in un campione di quinoa commerciale perlato (QC). In quest'ultimo, si è osservato un contenuto in sapogenine totali pari a 64,3 mg/100g s.s. più alto del campione di quinoa perlata al 30%. I

risultati evidenziano pertanto che il processo di abrasione può essere utilizzato efficacemente per ridurre il contenuto in sapogenine della quinoa.



**Figura 5.4.** Contenuto in sapogenine in campioni di quinoa perlata a differenti livelli

Sugli sfarinati a diversa percentuale di perlatura è stata inoltre effettuata la caratterizzazione chimica (Tabella 5.5).

**Tabella 5.5.** Composizione chimica (g/100g) di sfarinati di quinoa tal quale, commerciale e dopo perlatura al 20 e 30%

| Campione           | Proteine  | Grassi   | Fibra     | Ceneri    | Amido     |
|--------------------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| Quinoa Tal Quale   | 19,7±0,22 | 5,4±0,09 | 11,7±0,41 | 7,97±0,11 | 55,9±0,64 |
| Quinoa perlata 20% | 17,7±0,16 | 5,4±0,23 | 7,7±0,33  | 4,05±0,06 | 66,2±0,81 |
| Quinoa perlata 30% | 17,1±0,19 | 6,5±0,14 | 6,4±0,27  | 2,51±0,03 | 67,4±0,48 |
| Quinoa commerciale | 15,7±0,11 | 6,2±0,17 | 6,0±0,32  | 2,23±0,05 | 69,8±0,73 |

### 5.3 Caratterizzazione chimico-nutrizionale di varietà di quinoa

Nella seconda fase, le attività di ricerca sono state svolte nell'ambito del Progetto finanziato dalla Regione Campania, PSR 2007/2013 misura 124, dal titolo "Introduzione della quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*) in Campania per la produzione di alimenti a valenza funzionale ad elevato valore nutrizionale".

Tra gli obiettivi del progetto era prevista la valutazione delle caratteristiche eco-fisiologiche e colturali nelle diverse fasi fisiologiche e delle potenzialità produttive e qualitative di varietà di quinoa, coltivate in asciutto, con eventuale irrigazione di soccorso. Sono state identificate due varietà, Titicaca e Puno, in precedenza valutate in Campania e già selezionate per l'adattamento alle condizioni di fotoperiodo europeo.

Le due varietà Titicaca e Puno, coltivate nell'annata 2013 sono state quindi caratterizzate dal punto di vista chimico-nutrizionale e visivo. Dall'analisi visiva delle due varietà di quinoa oggetto di studio, sono emerse differenze sia nel colore che nelle dimensioni dei semi (Figura 5.5).



**Figura 5.5.** Confronto visivo tra le varietà di quinoa Titicaca e Puno

Le sensazioni percepite visivamente sono state confermate dall'analisi del peso dei mille semi e dalla valutazione colorimetrica degli indici  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ .

I valori numerici  $a^*$  e  $b^*$  rappresentano le coordinate di cromaticità;  $L^*$  esprime, la luminosità del colore. I valori di  $L^*$  rappresentano l'intera scala dei grigi, dal nero (0) al bianco (100), mentre i valori di  $a^*$  e  $b^*$  rappresentano, rispettivamente, il grado di rosso/verde e il grado di giallo/blu del colore.

La quinoa Puno oltre ad avere semi di dimensione e peso più piccoli, risultava più luminosa ( $L^*=48.97$ ) e con un indice di rosso ( $a^*$ ) meno marcato (Tabella 5.6).

**Tabella 5.6.** Peso di mille semi (g) e analisi del colore di acheni di quinoa tal quale

| <b>Campione</b> | <b>Peso 1000 semi (g)</b> | <b>L</b> | <b>a*</b> | <b>b*</b> |
|-----------------|---------------------------|----------|-----------|-----------|
| <b>Titicaca</b> | 3,23                      | 46,68    | +0,97     | 18,97     |
| <b>Puno</b>     | 2,47                      | 48,97    | +0,31     | 18,20     |

I risultati relativi alle caratteristiche chimiche dei campioni di quinoa sono invece riportati nella tabella 5.7.

**Tabella 5.7.** Composizione centesimale (g/100g) di quinoa tal quale

| <b>Campione</b> | <b>Umidità</b> | <b>Proteine</b> |      | <b>Grassi</b> |      | <b>Ceneri</b> |      | <b>Amido</b> |      |
|-----------------|----------------|-----------------|------|---------------|------|---------------|------|--------------|------|
|                 |                | tq              | s.s. | tq            | s.s. | tq            | s.s. | tq           | s.s. |
| <b>Titicaca</b> | 10,8±0,11      | 13,5±0,03       | 15,2 | 5,9±0,17      | 6,7  | 3,26±0,07     | 3,65 | 49,4±0,68    | 55,4 |
| <b>Puno</b>     | 10,7±0,06      | 12,9±0,14       | 14,5 | 5,4±0,14      | 6,0  | 3,06±0,02     | 3,42 | 47,2±0,56    | 52,9 |
| <b>Media</b>    | 10,8           | 13,2            | 7,9  | 5,7           | 6,4  | 3,2           | 3,5  | 48,3         | 54,1 |
| <b>CV %</b>     | 0              | 0,10            | 0,04 | 0,08          | 0,10 | 0,01          | 0,01 | 1,18         | 1,54 |

La quinoa è un alimento altamente nutritivo e la sua valorizzazione in campo alimentare è strettamente correlata alle sue caratteristiche compositive.

Dalle analisi effettuate sulle varietà Titicaca e Puno non sono emerse marcate differenze dal punto di vista compositivo. In generale, la varietà Titicaca ha mostrato valori dei nutrienti leggermente superiori alla varietà Puno.

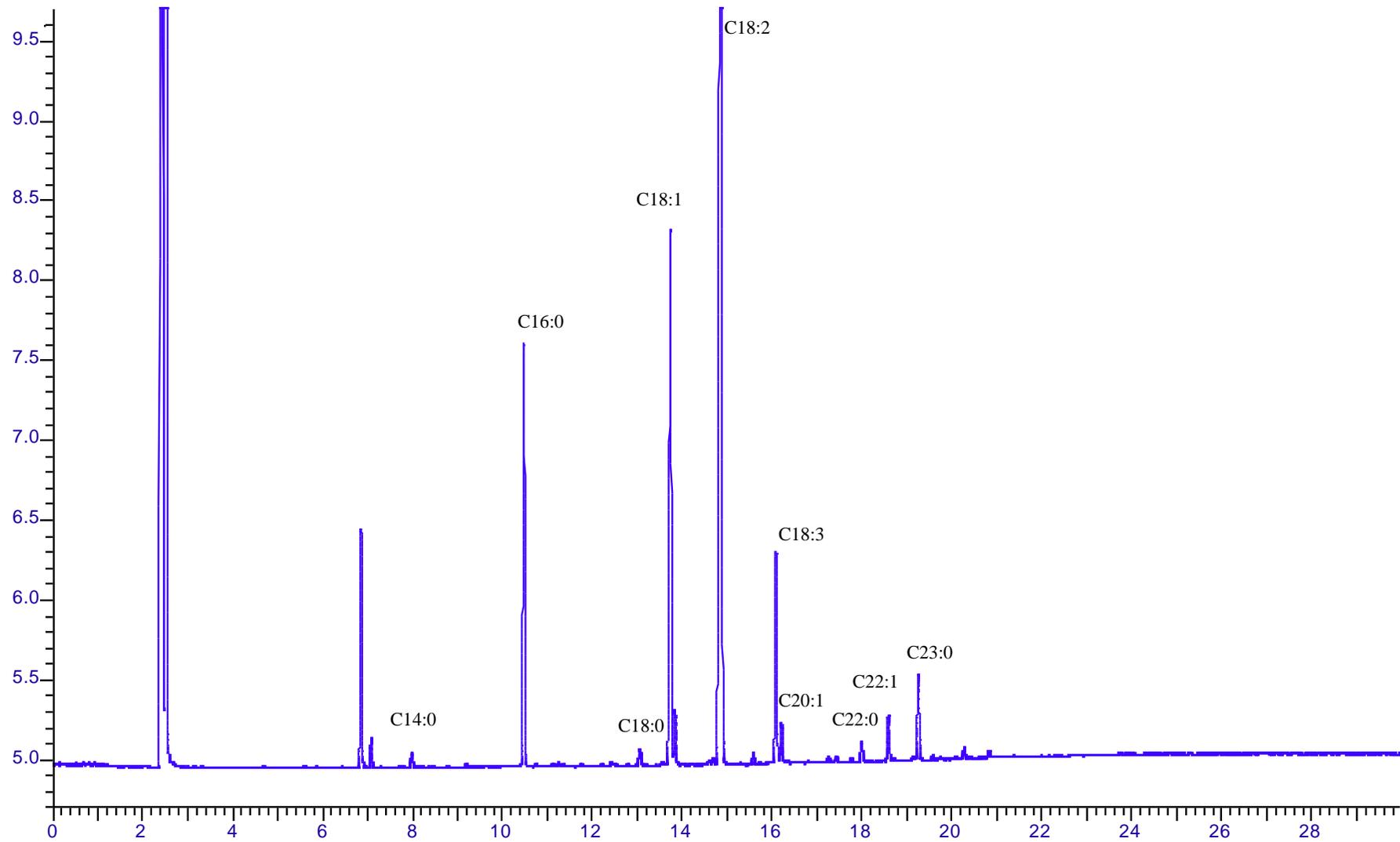
Il contenuto in grasso della quinoa è risultato piuttosto alto (6,03-6,67% s.s.) se paragonato ai comuni cereali e dal punto di vista qualitativo la frazione lipidica della quinoa si caratterizzava per la presenza di acidi grassi polinsaturi che complessivamente rappresentavano circa l'87% degli acidi grassi totali (Tabella 5.8).

L'acido linoleico (C18:2) è stato il principale acido grasso insaturo presente (circa 59,8-60,8%), seguono l'acido oleico (C18:1) (16,8-19,1%) e l'acido linolenico (C18:3) (5,3-6,9%). Tra i saturi, invece, si è registrata la presenza dell'acido palmitico (C16:0) (8,1-8,5%) (Figura 5.6).

L'alto livello di insaturazione dovrebbe aumentare in maniera significativa la suscettibilità della frazione lipidica all'irrancimento, tuttavia la presenza di antiossidanti naturali, come i tocoferoli, limita in maniera considerevole l'innesco dell'ossidazione.

**Tabella 5.8.** Composizione in acidi grassi (% acido grasso/totale acidi grassi) di quinoa tal quale

| <b>Acidi grassi</b>           | <b>Titicaca</b>    | <b>Puno</b>        |
|-------------------------------|--------------------|--------------------|
| <b>C14:0</b>                  | 0,2 ± 0,00         | 0,2 ± 0,00         |
| <b>C16:0</b>                  | 8,5 ± 0,10         | 8,1 ± 0,07         |
| <b>C18:0</b>                  | 0,5 ± 0,03         | 0,4 ± 0,00         |
| <b>C18:1</b>                  | 19,1 ± 0,21        | 16,8 ± 0,01        |
| <b>C18:2</b>                  | 59,8 ± 0,15        | 60,8 ± 0,05        |
| <b>C20:0</b>                  | 0,4 ± 0,01         | 0,3 ± 0,00         |
| <b>C18:3</b>                  | 5,3 ± 0,03         | 6,9 ± 0,03         |
| <b>C20:1</b>                  | 1,3 ± 0,02         | 1,2 ± 0,02         |
| <b>C22:0</b>                  | 0,5 ± 0,03         | 0,5 ± 0,01         |
| <b>C22:1</b>                  | 1,4 ± 0,14         | 1,5 ± 0,04         |
| <b>C23:0</b>                  | 3,0 ± 0,04         | 3,3 ± 0,03         |
| <b><i>Totale saturi</i></b>   | <b><i>13,1</i></b> | <b><i>12,8</i></b> |
| <b><i>Totale insaturi</i></b> | <b><i>86,9</i></b> | <b><i>87,2</i></b> |



**Figura 5.6.** Tracciato GC degli acidi grassi della quinoa

Come si può notare dalla composizione centesimale dei campioni di quinoa (Tabella 5.6), l'amido è il principale componente ed è presente in quantità comprese tra 53 e 55% s.s. Si presenta sotto forma di piccoli granuli di 1,5 µm di diametro localizzati nel perisperma singolarmente o aggregati. Nel complesso le proprietà tecnologiche dell'amido di quinoa in prodotti da forno lievitati è simile a quella di altri amidi non di natura cerealicola, come l'amido di amaranto e patate, ma inferiori all'amido di orzo e frumento.

Per quanto riguarda le proteine, dati di letteratura dicono che le proteine della quinoa sono maggiormente localizzate nell'embrione anche se quantità significative sono state riscontrate in tutti i tessuti dell'achenio. L'elevato interesse per questo pseudocereale, manifestato da più parti (industrie alimentari, enti di ricerca), è correlato sia all'assenza delle proteine del glutine che alla elevata qualità della componente proteica.

Nella quinoa sono infatti presenti, in maniera bilanciata, tutti gli amminoacidi essenziali ed in modo particolare la lisina, amminoacido limitante per la maggior parte dei cereali (Tabella 5.9). L'alto contenuto di lisina fa sì che la quinoa rappresenti un ottimo complemento ai cereali (Tabella 5.10). Infine il contenuto in ceneri piuttosto elevato (3,42-3,65% s.s.), è strettamente correlato alla presenza del pericarpo, frazione dove sono concentrati principalmente i minerali.

**Tabella 5.9.** Composizione amminoacidica di quinoa tal quale (g/100g di proteine)

| <b>Amminoacidi</b> | <b>Titicaca</b> | <b>Puno</b> |
|--------------------|-----------------|-------------|
| lisina             | 8,95±0,62       | 9,12±0,52   |
| alanina            | 4,78±0,26       | 5,43±0,02   |
| treonina           | 3,30±0,16       | 3,89±0,06   |
| glicina            | 4,86±0,18       | 5,89±0,16   |
| valina             | 6,51±0,18       | 7,32±0,55   |
| serina             | 4,57±0,25       | 5,47±0,10   |
| prolina            | 3,62±0,33       | 4,66±0,05   |
| isoleucina         | 3,06±0,24       | 3,67±0,07   |
| leucina            | 5,66±0,55       | 6,63±0,18   |
| metionina          | 0,86±0,01       | 0,84±0,01   |
| istidina           | 5,08±0,20       | 5,31±0,01   |
| fenilalanina       | 6,08±0,40       | 6,79±0,62   |
| glutammato         | 20,78±1,44      | 23,64±0,47  |
| aspartato          | 10,27±0,65      | 12,63±0,14  |
| cistina            | 2,65±0,07       | 2,70±0,03   |
| tirosina           | 3,14±0,17       | 3,79±0,15   |

**Tabella 5.10.** Contenuto amminoacidico medio di diversi cereali (g/100g di proteine)

| Amminoacido    | Quinoa | Grano saraceno | Riso  | Mais  | Frumento |
|----------------|--------|----------------|-------|-------|----------|
| Istidina       | 4,09   | 5,40           | 8,51  | 6,31  | 2,48     |
| Isoleucina     | 3,02   | 3,47           | 4,47  | 3,41  | 3,37     |
| Leucina        | 6,88   | 6,31           | 9,96  | 17,33 | 7,62     |
| Lisina         | 6,30   | 7,82           | 5,54  | 3,03  | 2,58     |
| Metionina      | 2,27   | 1,63           | 2,82  | 2,54  | 1,50     |
| Cistina        | 1,39   | 2,77           | 3,25  | 2,09  | 2,45     |
| Fenilalanina   | 4,52   | 5,85           | 12,63 | 7,90  | 5,90     |
| Tirosina       | 3,66   | 5,06           | 9,03  | 5,93  | 3,37     |
| Treonina       | 4,41   | 4,04           | 4,42  | 3,97  | 3,09     |
| Triptofano     | 1,10   | 1,12           | 1,30  | 0,78  | 1,09     |
| Valina         | 3,67   | 6,46           | 9,76  | 7,71  | 4,07     |
| Indice Chimico | 100    | 95,6           | 95,5  | 52,2  | 44,5     |

#### **5.4 Prove di decorticazione/perlatura della quinoa con impianto pilota**

Successivamente sono state effettuate prove per realizzare la perlatura mediante impianto pilota (Figura 5.7). L'impianto, sito presso il PST Molise Innovazione di Campobasso, prevedeva una tramoggia di carico con la possibilità di lavorare 1 Kg di prodotto per volta. Sono state ottimizzate le condizioni operative per ottenere perlature di circa il 30%.

Il grado di perlatura ottimale è stato definito sulla base dei risultati ottenuti con il perlatore da laboratorio.



**Figura 5.7.** Impianto pilota utilizzato per le prove di perlatura

La composizione chimica della quinoa perlata mediante impianto pilota, è stata confrontata con la composizione di uno sfarinato commerciale di quinoa (Tabella 5.11). Rispetto alla farina commerciale, l'abrasione degli strati superficiali ha procurato una riduzione del contenuto in fibra e ceneri, con un aumento del contenuto in amido.

**Tabella 5.11.** Confronto tra quinoa perlata e farina di quinoa commerciale (g/100g di s.s.)

| <b>Campione</b>                          | <b>Proteine</b> | <b>Grassi</b> | <b>Amido</b> | <b>Zuccheri solubili</b> | <b>Fibra</b> | <b>Ceneri</b> |
|--|-----------------|---------------|--------------|--------------------------|--------------|---------------|
| <b>Farina di quinoa Titicaca perlata</b> | 12,4±0,08       | 5,1±0,11      | 70,0±0,13    | 0,71±0,04                | 7,5±0,21     | 1,9±0,03      |
| <b>Farina di quinoa commerciale</b>      | 14,6±0,16       | 6,2±0,07      | 61,7±0,10    | 0,77±0,06                | 12,3±0,18    | 3,2±0,05      |

Al fine di valutare la percentuale di rimozione delle saponine, sugli sfarinati di quinoa tal quale, quinoa perlata e farina commerciale di quinoa sono state effettuate valutazioni del loro contenuto in acido oleanolico, ederagenina e fitolaccagenina (Tabella 5.12).

**Tabella 5.12.** Contenuto in saponine nella quinoa tal quale e oggetto di perlatura

| <b>Campioni</b>                   | <b>Saponine mg/100g</b> |                    |                              |               |
|-----------------------------------|-------------------------|--------------------|------------------------------|---------------|
|                                   | <b>Acido oleanolico</b> | <b>Ederagenina</b> | <b>Acido fitolaccagenico</b> | <b>Totale</b> |
| Quinoa Titicaca                   | 90,4 ± 0,83             | 125,7 ± 2,64       | 52,9 ± 1,80                  | <b>269,0</b>  |
| Farina di quinoa Titicaca perlata | 23,8 ± 1,19             | 36,3 ± 1,82        | 21,2 ± 1,03                  | <b>81,5</b>   |
| Farina di quinoa Commerciale      | 16,5 ± 1,80             | 75,1 ± 2,35        | 44,6 ± 1,20                  | <b>136,2</b>  |

Dal punto di vista quantitativo nelle varietà di quinoa analizzate si può osservare come in seguito al processo di perlatura, la farina di quinoa presenti una riduzione del contenuto totale di saponine (81,5 mg/100g) sia rispetto a quella commerciale (136,2 mg/100g) che alla quinoa tal quale, pertanto in seguito a queste prove con impianto pilota, è possibile affermare che il processo di perlatura dell'achenio di quinoa risulta utile ad allontanare circa il 70% delle saponine presenti all'interno del campione.

## 5.5 Impiego di sfarinati di quinoa per la produzione di prodotti da forno

Un'altra attività di ricerca è stata quella di avviare un'indagine preliminare volta a conoscere i possibili impieghi della farina di quinoa, pseudocereale privo di glutine, per la produzione di nuovi prodotti da forno. A tal proposito sono state messe a punto ricette per la produzione di prodotti da forno lievitati (pane) e non lievitati (biscotti). In particolare sono state testate due distinte linee di lavorazione a base di quinoa: "Panificati" e "Prodotti dolciari".

Tali prodotti sono stati sottoposti a valutazione delle principali caratteristiche tecnologiche quali lavorabilità dell'impasto e struttura del prodotto finito, fortemente influenzate dalla quantità di farina di quinoa utilizzata.

I risultati conseguiti hanno evidenziato che per la produzione di pani speciali a base di farina di quinoa la quantità massima di farina di quinoa utilizzabile è pari al 20-25%. È emerso infatti che quantità superiori al 25% determinano problemi legati alla lavorabilità dell'impasto e conferiscono al prodotto finito note sensoriali non sempre gradite al consumatore.

Per la linea "Prodotti dolciari", invece, la farina di quinoa è stata utilizzata per la formulazione di biscotti tipo krumiri. In dettaglio le ricette hanno previsto la miscelazione della farina di quinoa con farina di frumento tenero. Tutti i prodotti realizzati hanno mostrato ottimi risultati sia dal punto di vista tecnologico che sensoriale.

### 5.5.1 Studio di formulazioni e caratterizzazione delle materie prime

La tabella 5.13 riporta le caratteristiche chimiche della quinoa perlata e degli ingredienti utilizzati per la produzione di pane e biscotti con quinoa.

**Tabella 5.13.** Composizione centesimale della quinoa perlata e degli ingredienti utilizzati per le prove

| Sfarinati                      | Umidità<br>% | % s.s.   |        |        |                     |                            |
|--------------------------------|--------------|----------|--------|--------|---------------------|----------------------------|
|                                |              | Proteine | Ceneri | Grassi | Fibra<br>Alimentare | Carboidrati<br>disponibili |
| Sfarinato di<br>quinoa perlata | 10,3         | 13,5     | 3,14   | 6,5    | 12,3                | 64,6                       |
| Farina<br>Manitoba             | 12,1         | 15,6     | 0,51   | 0,9    | 3,5                 | 79,49                      |
| Farina "0"                     | 12,5         | 12,8     | 0,60   | 1,2    | 3,4                 | 82,0                       |
| Farina "00"                    | 12,5         | 11,6     | 0,64   | 1,0    | 2,2                 | 84,6                       |
| Glutine vitale                 | 1,8          | 82,9     | 1,69   | 7,6    | -                   | -                          |

Come si osserva gli sfarinati convenzionali (semola, farina) che normalmente vengono utilizzati per la produzione dei prodotti cerealicoli rispondono ai requisiti chimici riportati nel D.P.R. 187/2001 relativo alla produzione e commercializzazione di sfarinati e derivati (pane e pasta).

Rispetto agli sfarinati di cereali la quinoa presenta, un più alto contenuto in fibra pari a 12,3%, in ceneri (3,14%), proteine (13,5%), grassi (6,5%).

La mancanza di proteine del glutine, però, rende assai critica la loro lavorabilità e trasformabilità in un impasto viscoelastico. Al fine di superare tale limite, e ottenere un impasto coeso, sono state effettuate prove di panificazione con miscele di sfarinati di quinoa ed altre farine o semole con lo scopo di migliorare le caratteristiche tecnologiche e sensoriali dei prodotti da forno ottenuti.

### 5.5.2 Linea di lavorazione panificati

In questa sperimentazione è stato prodotto del pane ottenuto sostituendo il 20% di farina tipo “0” con sfarinato di quinoa perlata al fine di ottenere un prodotto nutrizionalmente valido e che presenta, al contempo, caratteristiche sensoriali soddisfacenti.

In particolare la tabella 5.14 riporta le caratteristiche chimico-fisiche dei due pani prodotti.

**Tabella 5.14.** Parametri chimico-fisici del pane prodotto utilizzando sfarinato di quinoa

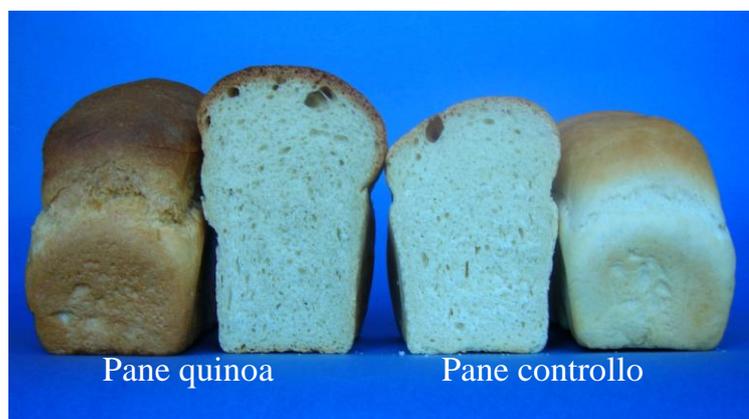
| <b>Campioni</b> | <b>Acqua<br/>impasto<br/>(%)</b> | <b>Umidità<br/>(%)</b> | <b>Volume<br/>(mL)</b> | <b>Peso<br/>(g)</b> |
|-----------------|----------------------------------|------------------------|------------------------|---------------------|
| Pane quinoa     | 53                               | 35,6                   | 201,1                  | 296,5               |
| Pane controllo  | 54                               | 35,2                   | 158,9                  | 301,3               |

Pane quinoa = 20% sfarinato di quinoa perlata + 77,5% Farina Manitoba + 2,5% glutine di frumento tenero

Pane controllo = 100% Farina Manitoba

Il pane di quinoa presenta un assorbimento di acqua nell'impasto e un peso simile al pane controllo (53% contro il 54% del controllo per l'acqua, 296,5 g contro i 301,3 g del pane controllo per il peso). Il pane di quinoa presenta tuttavia un volume maggiore (Figura 5.8), confermando i risultati di uno studio di Lorenz e Coulter (1991), i quali hanno dimostrato che

l'aggiunta del 5% di sfarinato di quinoa permette di ottenere un pane con un volume superiore al pane ottenuto con sola farina. Gli stessi autori riportano che l'aumento del volume del pane di quinoa è da correlare alla notevole presenza di enzimi amilolitici che degradano l'amido con un conseguente aumento di zuccheri disponibili per la fermentazione.



**Figura 5.8.** Confronto tra Pane quinoa e Pane controllo

Dal punto di vista compositivo (Tabella 5.15) il pane di quinoa presenta rispetto al prodotto controllo un contenuto più alto in proteine, lipidi e fibra alimentare, mentre mostra un contenuto inferiore in carboidrati pari al 44,2% contro il 50,0% nel prodotto controllo.

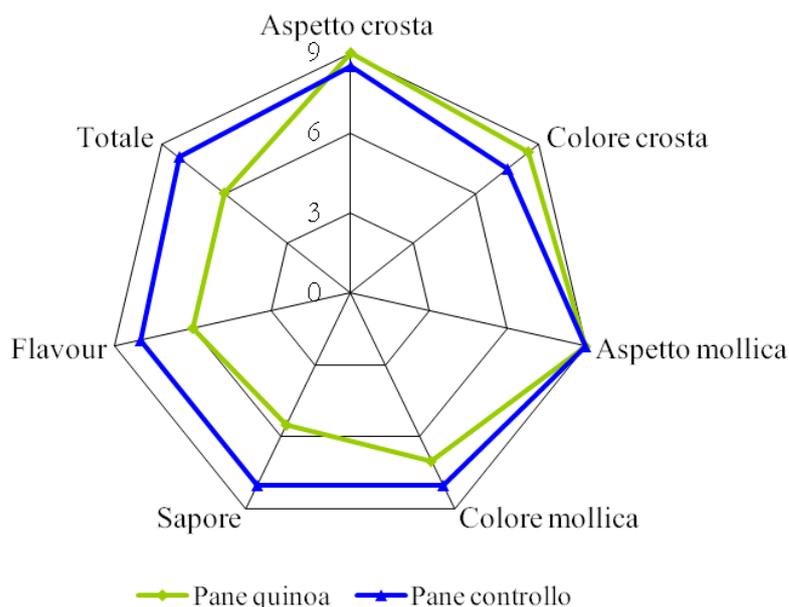
**Tabella 5.15.** Composizione chimica del pane di quinoa e del pane controllo (g/100g di prodotto)

|                         | <b>Pane quinoa</b> | <b>Pane controllo</b> |
|-------------------------|--------------------|-----------------------|
| Energia (100 g)         |                    |                       |
| Kcal                    | 233,0              | 247,8                 |
| KJ                      | 988,5              | 1051,9                |
| Umidità                 | 35,6               | 35,2                  |
| Proteine                | 10,9               | 9,7                   |
| Lipidi                  | 1,4                | 1,0                   |
| Ceneri                  | 1,00               | 1,09                  |
| Fibra alimentare        | 6,9                | 3,1                   |
| Carboidrati disponibili | 44,2               | 50,0                  |

Pane quinoa = 20% sfarinato di quinoa perlata + 77,5% Farina Manitoba  
+2,5% glutine di frumento tenero

Pane controllo = 100% Farina Manitoba

Relativamente al contenuto in saponine l'analisi GC ha evidenziato la presenza di un basso contenuto in tali composti nel pane di quinoa pari a 9,97 mg/100g s.s., evidenziando la possibilità di impiego degli sfarinati di quinoa perlata come ingredienti nei prodotti da forno. La valutazione sensoriale è stata eseguita utilizzando alcuni descrittori sensoriali specifici per il pane (Figura 5.9). Per il pane di quinoa il gruppo di assaggiatori ha espresso un giudizio estremamente positivo per l'aspetto e colore della crosta, aspetto della mollica, tuttavia il sapore e l'odore considerati anomali, hanno inciso sul giudizio globale del prodotto risultato sufficiente.



**Figura 5.9.** Profilo sensoriale del pane di quinoa e del pane controllo

In particolare il gruppo di assaggiatori ha evidenziato un retrogusto amaro ed erbaceo e una nota olfattiva riconducibile ai broccoli. Ciò è dovuto al fatto che la quinoa e i broccoli appartengono alla stessa famiglia (*Chenopodiaceae*).

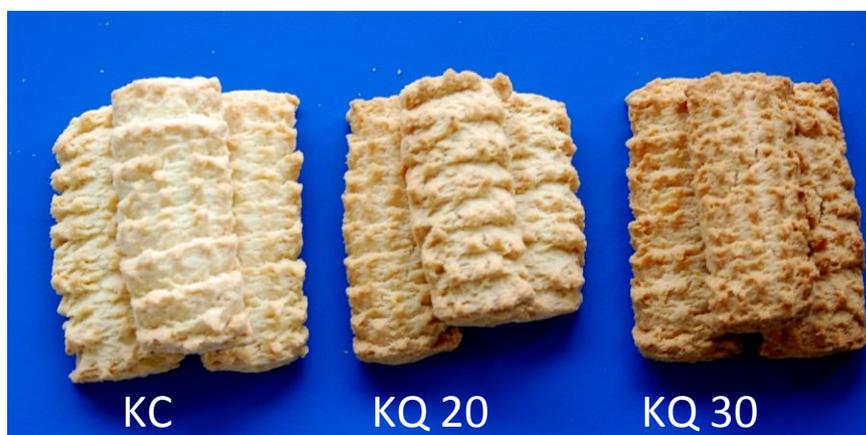
### **5.5.3 Linea di lavorazione prodotti dolciari (biscotti)**

La caratterizzazione chimica dei biscotti realizzati utilizzando lo sfarinato di quinoa è riportata in tabella 5.16. Per le prove di produzione sono stati realizzati biscotti con il 20% (KQ 20) e il 30% (KQ 30) di sfarinato di quinoa.

Tutti i biscotti presentano un contenuto di umidità di circa il 4-5%, inoltre il contenuto in proteine e lipidi è pressoché simile ai biscotti controllo. I biscotti con quinoa mostrano un maggior contenuto in ceneri e fibra, rispetto a quelli controllo, derivanti dall'alto contenuto degli stessi composti nella quinoa.

Come si osserva, il valore energetico dei biscotti con quinoa risulta essere leggermente inferiore rispetto a quello del prodotto controllo per l'elevato contenuto di fibra alimentare.

La figura figura 5.10 mostra le tre tipologie di biscotti prodotti.



**Figura 5.10.** Confronto tra Krumiro con il 20% di sfarinato di quinoa (KQ 20), Krumiro con il 30% di sfarinato di quinoa (KQ 30) e Krumiro Controllo (KC)

**Tabella 5.16.** Composizione chimica e valore energetico dei biscotti con il 20 e il 30% di quinoa (KQ 20, KQ 30) e dei biscotti controllo (KC) (g/100g di prodotto)

|                         | <b>Biscotti</b> |              |           |
|-------------------------|-----------------|--------------|-----------|
|                         | <b>KQ 30</b>    | <b>KQ 20</b> | <b>KC</b> |
| Energia (100 g)         |                 |              |           |
| Kcal                    | 444,9           | 446,0        | 455,2     |
| KJ                      | 1868,9          | 1873,7       | 1912,2    |
| Umidità                 | 4,0             | 4,5          | 4,9       |
| Proteine                | 10,2            | 9,8          | 9,7       |
| Lipidi                  | 17,4            | 17,5         | 17,8      |
| Ceneri                  | 1,3             | 1,1          | 0,96      |
| Fibra alimentare        | 5,2             | 4,8          | 2,6       |
| Carboidrati disponibili | 61,9            | 62,3         | 64,0      |

Krumiri con 30% quinoa (KQ 30) = 30% sfarinato di quinoa perlata + 70% farina tipo "00"

Krumiro con 20% quinoa (KQ 20) = 20% sfarinato di quinoa perlata + 80% farina tipo "00"

Krumiro controllo (KC) = 100% farina tipo "00"

Sui biscotti con il 20% e il 30% di quinoa è stato valutato anche il contenuto in saponine. Dall'analisi cromatografica si è rilevato un contenuto in saponine pari a 6 mg/100g s.s. e 14,3 mg/100g s.s. rispettivamente per KQ 20 e KQ 30.

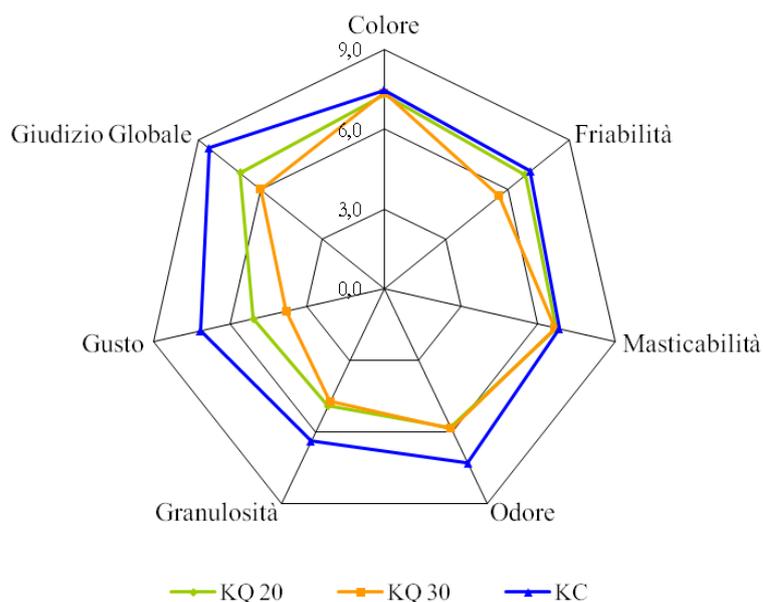
Come si osserva dalla foto i biscotti con quinoa presentano una più intensa colorazione confermata da un più alto valore di  $a^*$  (Tabella 5.17). Inoltre dal valore di furosina (KQ 30= 135,3 mg/100g proteine e KQ 20=111,0 mg/100g proteine) si è evidenziata una più intensa Reazione di Maillard.

**Tabella 5.17.** Contenuto in furosina nei biscotti con il 20 e il 30% di quinoa (KQ 20, KQ 30) e controllo (KC) (mg/100g di proteine) correlato con gli indici di colore

| Biscotti | Furosina<br>(mg/100g proteine) | Colore |       |       |
|----------|--------------------------------|--------|-------|-------|
|          |                                | $L^*$  | $a^*$ | $b^*$ |
| KQ 30    | 135,3 ± 2,78                   | 58,8   | 1,3   | 23,4  |
| KQ 20    | 111,0 ± 3,04                   | 59,9   | 0,7   | 23,0  |
| KC       | 87,8 ± 3,22                    | 62,9   | -1,3  | 21,9  |

L'alto contenuto in furosina è correlato alla presenza di zuccheri riducenti presenti nello sfarinato di quinoa che hanno favorito un imbrunimento non enzimatico del prodotto.

Sui biscotti è stata inoltre valutata la qualità sensoriale. La figura 5.11 riporta il profilo sensoriale, dei biscotti di quinoa (KQ 20 e KQ 30) in confronto con i krumiri controllo (KC).



**Figura 5.11.** Valutazione sensoriale dei krumiri con il 20% di sfarinato di quinoa (KQ 20), krumiri con il 30% di sfarinato di quinoa (KQ 30) e dei krumiri controllo (KC)

Rispetto al pane, gli assaggiatori non hanno percepito l'erbaceo, mentre la nota di amaro è stata percepita in eguale misura agli altri prodotti. Gli stessi panellisti hanno espresso un giudizio inferiore, per i biscotti di quinoa, anche per la masticabilità e per la friabilità. Il giudizio complessivo del krumiro 30 è risultato sufficiente, dimostrando il minor gradimento rispetto al krumiro con il 20% di quinoa il cui giudizio complessivo è risultato buono.

Dall'analisi dei risultati delle indagini, è emerso che la quinoa può essere utilizzata con successo in combinazione con altre farine (frumento tenero, duro, kamut, riso, etc.) per la produzione di differenti tipologie di prodotti da forno. Gli sfarinati di pseudocereali, tra cui la quinoa, trovano oggi sempre più largo impiego nel settore dei prodotti da forno, in virtù del loro contenuto in proteine di elevato valore biologico e in composti bioattivi.

## **Conclusioni**

Dalle analisi effettuate nel corso delle attività sperimentali, è stato possibile attestare le peculiari caratteristiche chimico-nutrizionali di germe di grano e quinoa.

Poco sfruttati nel settore alimentare, il germe di grano e la quinoa sono risultati validi ingredienti sia per la produzione di pasta fresca che per la produzione di prodotti da forno (pane, biscotti) che, oltre a presentare un miglioramento delle caratteristiche nutrizionali, hanno ottenuto il consenso del gruppo di assaggiatori coinvolti nelle analisi sensoriali.

La possibilità di allontanare le saponine presenti sulla superficie della quinoa, utilizzando tecniche alternative quali decorticazione/perlatura e le attestate potenzialità nell'utilizzo di germe di grano per contenere l'attività di microrganismi alteranti della pasta fresca, rendono entrambi i prodotti ingredienti alternativi ideali per l'ottenimento di prodotti alimentari che, attuando minimi cambiamenti sulle tecnologie tradizionali, offrono la possibilità di apportare innovazione nel mercato dei prodotti a base di cereali e pseudocereali.

### ***Sezione germe di grano***

Al-Reza, S. M., Rahman, A., Lee, J., & Kang, S. C., 2010. Potential roles of essential oil and organic extracts of *Zizyphus jujuba* in inhibiting food-borne pathogens. *Food Chemistry*, 119(3): 981-986.

Adom K.K., Liu R.H., 2002. Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6182-6187.

Adom K.K., Sorrells M.E., Liu R.H., 2003. Phytochemicals profiles and antioxidant activity of wheat varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7825-7834.

Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Çelik S.E., Bektaşoğlu B., Berker K.I., Özyurt D., 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12: 1496-1547.

Berteli M.N., Marsaioli A., 2005. Evaluation of short cut pasta air dehydration assisted by microwaves as compared to the conventional drying process. *Journal of Food Engineering*, 68 (2): 175-183.

Bonoli M, Verardo V., Marconi E, Caboni M.F., 2004. Antioxidant phenols in Barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 5195-5200.

Borrelli G.M., De Leonardis A., M., Fares C., Platani C., Di Fonzo N., 2003. Effects of modified processing conditions on oxidative properties of semolina dough and pasta. *Cereal Chemistry*, 80 (2): 225-231.

Brandolini A., Castoldi P., Plizzari L., Hidalgo A., 2013. Phenolic acids composition, total polyphenols content and antioxidant activity of *Triticum monococcum*, *Triticum turgidum* and *Triticum aestivum*: A two-years evaluation. *Journal of Cereal Science*, 58 123e131.

Bramley P.M., Elmadfa I., Kafatos A., Kelly F.J., Manios Y., Roxborough H.E., Schuch W., Sheehy P.J.A., Wagner K.H., 2000. Vitamin E, reviews. *Journal of The Science of Food and Agricultural*, 80: 913-938.

Brown J., 1993. <<Advances in breadmaking technology>>, in Kamel B.S., Stauffer C.E., *Advances in baking technology*, pp 38-87, Chapman & Hall, London.

Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94 (3): 223-253.

- Buttner G.R., 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300: 535-543.
- Caboni M.F., Gallina Toschi T., Lercker G., Capella P., 1994. Analytical problems of oxisterol determination in lipid containing foods. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 71: 243-246.
- Cappelli P., Vannucchi V., 2005. *Chimica degli alimenti. Conservazione e trasformazione*. Zanichelli, Bologna.
- Carcea M., Bruschi G., Salvatorelli S., Schiavoni E., Perenzin M., Vaccino P., 2002. Agrotecnica biologica o convenzionale e qualità chimico-nutrizionale del grano tenero e duro. *Tecnica Molitoria*, 53 (10): 1002-1012.
- Carini E., Vittadini E., Curti E., Antoniazzi F., 2009. Effects of different shaping modes on physico-chemical properties and water status of fresh pasta. *Journal of Food Engineering*, 93: 400-406.
- Carratù B., Sanzini E., 2005. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. *Annuario Istituto Superiore della Sanità*, 41 (1): 7-16.
- Castelvetri F., 2005. Paste fresche e controllo delle cariche microbiche. *Pasta & Pastai*, 48: 46-48.
- Chargelegue A., Guinet R., Neyreneuf O., Onno B., Pointrenaud B., 1994. "La Fermentation", in Guinet R. & Godon B., *La panification française*, pp 280-325, Lavoisier, Paris.
- Clarke C., Schober T., Arendt E., 2002. Effect of single strain and traditional mixed strain starter cultures on rheological properties of wheat dough and bread quality. *Cereal Chemistry*, 79: 640-647.
- Corsetti A., Gobbetti M., De Marco B., Balestrieri F., Paoletti F., Rossi J., 2000. Combined effect of sourdough lactic acid bacteria and additives on bread firmness and staling. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 3044-3051.
- Cubadda R., Quattrucci E., 1996. Lo strato aleuronico del frumento. Quaderni della Nutrizione vol. XXVI, (5-6), Istituto Nazionale della Nutrizione, Roma, pp: 205-234.
- Daniels J.A., Krishnamurthi R., Rizvi S.S.H., 1985. A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. *Journal of Food Protection*, 6: 532-537.
- 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 (3): 275-281.
- Del Nobile M.A., Baiano A., Conte A., Mocci G., 2005. Influence of protein content on spaghetti cooking quality. *Journal of Cereal Science*, 41 (3): 347-356.

Domenichini G., 1996. Le confezioni, la loro progettazione e i rischi di contaminazione biologica degli alimenti confezionati. Protezione degli alimenti. Contaminazione biologica e sanità ambientale nell'industria alimentare. Domenichini Ed., Esta libri, Milano, 12: 189-204.

Duthie S.J., Collins A.R., 1996. Antioxidant supplementation decrease oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Research*, 56 (6): 1291-1295.

Eldin A.K., Appelquist L.A., 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31: 671-701.

European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), 2000. EUCAST Definitive Document E.DEF 3.1, June 2000: Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. 6 (9): 509-15.

Fessas D., Schiraldi A., (1998). Texture and staling of wheat bread crumb: effects of water extractable proteins and "pentosans", *Thermochimica Acta Journal*, 323: 17-26.

Flagella Z., 2006. Qualità nutrizionale e tecnologica del frumento duro. *Italian Journal of Agronomy*, 1: 203-239.

Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H., 1957. *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497.

Fu B., Labuza T.P., 1993. Shelf-life prediction: theory and application. *Food Control*, 4: 125-133.

Fulcher R.G., Rooney Duke T.K., 2002. *Whole-grain foods in health and disease*. Eagan Press, St Paul, Minnesota.

Georgé S., Brat P., Alter P., Amiot M.J., 2005. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1370-1373.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: overview. *Methods in Enzymology*, 186: 1-85.

Harborne E., 1989. Phytochemicals in plant cell cultures. In: *Cell culture and somatic cell genetics of plants serves*. Constabel F. and Vasil I.K (Eds), Academic Press, San Diego.

Havsteen B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96(2-3): 67-202.

Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10): 572-584.

Hernandez R.J., 1994. Effect of water vapor on the transport properties of oxygen through polyamides. *Journal of Food Engineering*, 22: 495-507.

Hidalgo A., Brandolini A., Pompei C., 2009. Kinetics of tocopherols degradation during the storage of einkorn (*Triticum monococcum* L. ssp. *monococcum*) and breadwheat (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*) flours. *Food Chemistry*, 116: 821–827.

Hsieh F., Hu L., Huff H.E., Peng I.C., 1990. Effects of water activity on textural characteristics of puffed rice cake. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 23: 471-473.

Ingold K.V., Burton G.W., Foster D.O., Hughes L., 1990. Is methyl-branching in  $\alpha$ -tocopherols “tail” important for its in vivo activity? Rat curative myopathy bioassay measurements of vitamin E activity of three 2rs-n-alkyl-2,5,7,8-tetramethyl-6-hydroxychromans. *Free Radical Biology and Medicine*, 9: 205-210.

Irakli M.N., Samanidou V.F., Biliaderis C.G., Papadoyannis I.N., 2012. Development and validation and validation of an HPLC-method for determination of free and bound phenolic acids in cereals after solid-phase extraction. *Food Chemistry*, 134:1624-1632.

Istituto Nazionale per la Ricerca degli Alimenti e la Nutrizione (INRAN), 2003. Linee Guida per una Sana Alimentazione Italiana.

Kabir Y, Kimura S., 1993. Biodistribution and metabolism of orally administered octacosanol in rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 37: 33-8.

Kähkönen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J.P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M., 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3954-3962.

Katz E.E., Labuza T.P., 1981. Effect of water activity on the sensory crispness and mechanical deformation of snack food products. *Journal of Food Science*, 46: 403-409.

Kilcast D., Subramaniam P. 2000. The stability and shelf-life of food, Woodhead Publ., Cambridge, UK.

Kim, S. J., Cho, A. R., & Han, J., 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extracts and their applications to meat product preservation. *Food Control*, 29 (1): 112-120.

Kruger J.E., 1981. Severity of sprouting as a factor influencing the distribution of amylase levels in pilot mill streams of Canadian wheats. *Canadian Journal of Plant Science*. 61: 817-828.

Krygier K., Sosulski F., Hogge L., 1982. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30: 330-334.

Labuza T.P., Hyman C.R., 1998. Moisture migration and control in multi-domain foods. *Trends in Food Science & Technology*, 9: 47-55.

Lampi A.M., Nurmi T., Ollilainen V., Piironen V., 2008. Tocopherols and tocotrienols in wheat genotypes in the HEALTHGRAIN diversity screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 9716-9721.

Legislazione Italiana, 1967. Legge n.580, 4 Luglio. Disciplina per la lavorazione e il commercio dei cereali, degli sfarinati, del pane e delle paste alimentari. G.U. n.189, 29 Luglio 1967. DPR n.187, 9 febbraio, 2001. G.U. n.117, 22 Maggio 2001. DPR n.502, 30 Novembre 1998. G.U. n.25, 1 Febbraio 1999.

Legislazione Italiana, 2005. Decreto Ministeriale (Ministero Attività Produttive), 22 Luglio. Disciplina della produzione e della vendita di taluni prodotti dolciari da forno. G.U. n.177, 1 Agosto 2005.

Li Y., Kloeppel K.M., Hsieh F., 1998. Texture of glassy corn cakes as a function of moisture content. *Journal of Food Science*, 63: 869-872.

Li L., Shewry P.R., Ward J.L., 2008. Phenolic acids in wheat varieties in the HEALTHGRAIN diversity screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 9732-9739.

Liu H.R., 2007. Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, 46: 207-219.

Liyana-Pathirana C.M., Shahidi F., 2006. Antioxidant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 477-485.

Lucisano A., 1993. Esigenze di refrigerazione delle paste fresche, analisi dei punti critici della catena del freddo. Farpasta '93. Atti congressuali, Rimini 16-18 maggio, Nuova Editrice, Padova: 35-42.

Lucisano M., Pagani M.A., 1997. Cereali e derivati. In: Draghetta A., Gli alimenti. Aspetti tecnologici e nutrizionali. Collana ITEMS, Istituto Danone, Milano, pp: 7-68.

MacMasters M., Hinton J.J.C., Bradbury D., 1971. Microscopic structure and composition of the wheat kernel. In: *Wheat chemistry and technology*. Pomeranz Y. Ed., American Association of Cereal Chemists Inc, St. Paul, Minnesota, USA, pp: 51-113.

Menga V., Fares C., Troccoli A., Cattivelli L., Baiano A., 2010. Effect of genotype, location and baking on the phenolic content and some antioxidant properties of cereals species. *International Journal of Food Science and Technology*, 45: 7-16.

- Meydani S.N., Meydani M., Blumberg J.B., Leka L.S., Siber G., Loszewski R., Thompson C., Pedrosa M.C., Diamond R.D., Stollar B.D., 1997. Vitamin E supplementation and in vivo immune response in healthy elderly subjects. *Journal of the American Medical Association*, 277: 1380-1386.
- Meydani S.N., Tengerdy R.P., 1993. Vitamin E and immune response. In: *Vitamin E in health and disease*. Packer L., Fuchs J. (Eds.), Marcel-Dekker, New York.
- Mignogna R., 2010. Valutazione di composti bioattivi ad attività antiossidante in alimenti di origine vegetale. PhD thesis, Unimol.
- Millar S., 2003. Controlling dough development, in Cauvain S.P., *Bread Making. Improving quality*, pp. 401-423, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge.
- Mondelli G., 2003. Approccio alla logica di processo per la pastorizzazione della pasta fresca. *Pasta&Pastai*, 32: 26-31.
- Mondelli G., 2008. Pastorizzare senza “invecchiare” la pasta fresca. *Pasta&Pastai*, 73: 9-20.
- Naczki M., Shahidi F., 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1523-1542.
- Okarter N., Liu C.S., Sorrells M.E., Liu R.H., 2010. Phytochemical content and antioxidant activity of six diverse varieties of whole wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 119: 249-257.
- Pagani M.A., Resmini P., Dalbon G., 1989. Influence of the extrusion process on the characteristics and structure of pasta. *Food Microstructure*, 8: 173-182.
- Pagani M.A., Lucisano M., Mariotti M., 2007. <<Traditional Italian products from wheat and other starchy flours>>, in Hui H.Y., *Handbook of food Products Manufacturing*, pp. 327-388. Wiley Interscience, New York, USA.
- Palozza P., Krinsky N.I., 1992. Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: an overview. *Methods in Enzymology*, 213: 403-420.
- Panatta G. B., 1997. Cereali e patate. In: *Nutrizione Umana*. Fidanza F. and Liguori G. (Eds), Idelson, Napoli.
- Panfili G., Fratianni A., Di Criscio T., Marconi E., 2008. Tocol and  $\beta$ -glucan levels in barley varieties and in pearling by-products. *Food Chemistry*, 107: 84-91.
- Panfili G., Fratianni A., Irano M., 2003. Normal-phase high performance liquid chromatography method for determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 6373-6377.

- Panfili G., Fratianni A., Irano M. 2004. Improved normal-phase high performance liquid chromatography procedure for determination of carotenoids in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 3940-3944.
- Pastore D., Laus M.N., Tozzi D., Fogliano V., Soccio M., Flagella Z., 2009. New tool to evaluate a comprehensive antioxidant activity in food extract: Bleaching of 4-nitroso-*N,N*-dymethylalanine catalyzed by soybean lipoxygenase-1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 9682-9692.
- Petty S., Scully C. 2009. Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of Dentistry*, 37: 413-423.
- Pomeranz Y., 1988. Chemical composition of kernel structures. In: Wheat chemistry and technology. Pomeranz Y. Ed., American Association of Cereal Chemists Inc, St. Paul, Minnesota, USA, cap.4, pp: 97-158.
- Pongtharangkul T, Demirci A., 2004. Evaluation of agar diffusion bioassay for nisin quantification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 10: 1007.
- Pylar E.J., 1988. Fundamental of baking technology, in Pylar E.J., *Baking Science and Technology*, Part three, Vol. II, Sosland Publishing Company, Merriam (KS).
- Rizzello C.G., Cassone A., Coda R., Gobbetti M., 2011. Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making. *Food Chemistry*, 127: 952-959.
- Robak J, Gryglewski R.J., 1996. Bioactivity of flavonoids. *Polish Journal of Pharmacology*, 48 (6): 555-564.
- Roudaut G., Dacremont C., Le Meste M., 1998. Influence of water on the crispness of cereal-based foods: acoustic, mechanical, and sensory studies. *Journal of Texture Studies*, 29: 199-213.
- Qureshi N., Qureshi A.A., 1993. Tocotrienols: novel hypocholesterolemic agents with antioxidant properties. In: *Vitamin E in health and disease*. Packer L., Fuchs J., (Eds), Marcel-Dekker, Inc., New York.
- Qureshi A.A., Burger W.C., Peterson D.M., Elson C., 1985. Suppression of cholesterologenesis by plant constituents. Review of Wisconsin contribution to NC-167. *Lipids*, 20: 817-824.
- Qureshi A.A., Chaudhary V., Weber F.E., Chicoye E., Qureshi N., 1991. Effects of brewer's grain and other cereals on lipid metabolism in chicken. *Nutrition Research*, 11: 159-168.
- Saija A., Scalese M., Lanza M., Marzullo D., Bonina F., Castelli F., 1995. Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes. *Free Radical Biology and Medicine*, 19: 481-486.

- Sannino A., Capone S., Siciliano P., Ficarella A., Vasanelli L., Maffezzoli A., 2005. Monitoring the drying process of lasagna pasta through a novel sensing device-based method. *Journal of Food Engineering*, 69 (1): 51-59.
- Sarghini F., Cavella S., Torrieri E., Masi P., 2005. Experimental analysis of mass transport and mixing in a single screw extruder for semolina dough. *Journal of Food Engineering*, 68 (4): 497-503.
- Serpen A., Gokmen V., Pellegrini N., Fogliano V., 2008. Direct measurement of the total antioxidant capacity of cereal product. *Journal of Cereal Science*, 48: 816-820.
- Sheppard A.J., Pennington J.A.T., Weihrauch J.L., 1993. Analysis and distribution of vitamin E in vegetable oils and foods. In: *Vitamin E in health and Disease*; Packer L., Fuchs J. (Eds), Marcel-Dekker, New York.
- Sosulski F., Krygier K., Hogge L., 1982. Free, esterified, and insoluble bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30: 337-340.
- Tebaldi E., 2001. Obiettivi e limiti dei trattamenti di pastorizzazione in funzione delle tipologie dei prodotti. *Pasta & Pastai*, 23: 42-48.
- Thompson U.L., 1994. Antioxidant and hormone-mediated health benefits of whole grains. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34: 473-497.
- Tiwari U., Cummins E., 2009. Nutritional importance and effect of processing on tocopherols in cereals. *Trends in Food & Technology*, 20: 511-520.
- Traber M.G., Sies H., 1996. "Vitamin E in humans: demand and delivery." *Annual Review of Nutrition*, 16: 321-47.
- Tremonte P., Succi M., Reale A., Di Renzo T., Sorrentino E., Coppola R., 2007. Interaction between strains of *Staphylococcus xilosus* and *Kocuria varians* isolated from fermented meats. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 743-751.
- Van Acker S.A., Koymans LM, Bast A., 1993. "Molecular pharmacology of vitamin E: structural aspects of antioxidant activity". *Free Radical Biology and Medicine*, 15: 311-28.
- Van Hecke E., Allaf K., Bouvier J.M., 1998. Texture and structure of crispy-puffed food products. Part II: mechanical properties in puncture. *Journal of Texture Studies*, 29: 617-632.
- Vignaux N., Doehlert D.C., Elias E.M., Mc Mullen M.S., Grant L.A., Kianian S.F., 2005. Quality of spaghetti made from full and partial waxy durum wheat. *Cereal Chemistry*, 82 (1): 93-100.
- Zardetto S., Dalla Rosa M., Placucci G., Capozzi F., 2005. Effect of extrusion process on chemical and physical properties of fresh egg pasta. *Tecnica molitoria*: 505-514.

Zardetto S., Di Fresco S., Pasqualetto K., 1999. La pastorizzazione nella pasta fresca farcita. *Tecnica Molitoria*, 6: 643-650.

Zhou J.F., Cai D., Zhu Y.G., Yang J.L., Peng C.H., Yu Y.H., 2000. A study on relationship of nitric oxide, oxidation, peroxidation, lipoperoxidation with chronic chole-cystitis. *World Journal of Gastroenterology*, 6 (4): 501-507.

Waladkhani A.R., Clemens M.R., 2001. Effect of dietary phytochemicals on cancer development. In: *Vegetables, Fruits, and Herbs in Health Promotion*. Watson R. R., Ph.D. (Eds), CRC Press.

Wang H., Cao G., Prior R.L., 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 701-705.

Zielinski H., Kozowska H., Lewczuk B., 2001. Bioactive compounds in the cereal grains before and after hydrothermal processing. *Innovative Food Science & Emerging*, 2: 159-169.

[http://www.ilsentiero.net/2010/05/germe-di-grano-benefici-e-proprieta\\_5005.html](http://www.ilsentiero.net/2010/05/germe-di-grano-benefici-e-proprieta_5005.html)

### ***Sezione quinoa***

Ahamed N.T., Singhal R.S., Kulkarni P.R., Pal M., 1996. Physicochemical and functional properties of *Chenopodium quinoa* Willd. starch. *Carbohydrate Polymers*. 31: 99-103.

Alvarez-Jubete L., Wijngaard H., Arendt E.K., Gallagher E., 2009. Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chemistry*. 119: 770-778.

Atwell W.A., Patrick B.M., Johnson L.A., Glass R.W., 1983. Characterization of quinoa starch. *Cereal Chemistry*. 60: 9-11.

Bahnassey Y., Khan K., 1986. Forfication of spaghetti with edible legumes. Rheological, processing and quality evaluation studies. *Cereal Chemistry*. 63: 216-219.

Basu N., Rastogi R.P., 1967. Triterpenoid saponins and sapogenins. *Phytochemistry*. 6: 1249-1270.

Bean M.M., Fellers D.A., 1982. Composite flour breads in Bolivia: technical aspects. In: *Proceedings of 7th World Cereal and Bread Congress, Prague*. pp 859-864.

Becker R., Hanners G.D., 1990. Compositional and nutritional evaluation of quinoa whole grain flour and mill fractions. *Lebensmittel Wissenschaft & Technologie*. 23: 441-444.

- Berti C., Ballabio C., Restani P., Porrini M., Bonomi F., Iametti S., 2004. Immunochemical and molecular properties of proteins in *Chenopodium quinoa* Willd. *Cereal Chemistry*. 81: 275-277.
- Bhargava A., Shukla S., Ohri D., 2006. Caryotypic studies on some cultivated and wild species of *Chenopodium* (*Chenopodiaceae*). *Genetic Resources and Crop Evolution*. 53:1309-1320.
- Bialy Z., Jurzysta M., Mella M., Tava A., 2006. Triterpene saponins from the roots of *Medicago hybrid*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 2520-2526.
- Breen M.D., 1977. Use of various protein sources in pasta. *Macaroni Journal*. 58: 26-34.
- Brinegar C., Goundan S., 1993. Isolation and characterization of chenopodin, the 11S seed storage protein from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41: 182-185.
- Brinegar C., Sine B., Nwokocha L., 1996. High-cysteine 2S seed storage proteins from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 1621-1623.
- Caperuto L.C., Amaya-Farfan J., Camargo C.R.O., 2000. Performance of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) flour in the manufacture of gluten-free spaghetti. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81:95-101.
- Casini P., 2002. Possibilità di introdurre la quinoa negli ambienti mediterranei. *Informatore Agrario*. 27: 29-32.
- Chauhan G.S., Eskin N.A.M., Tkachuk R., 1992. Nutrients and antinutrients in quinoa seed. *Cereal Chemistry*. 69: 85-88.
- Coulter L., Lorenz K., 1990. Quinoa - composition, nutritional value, food applications. *Lebensmittel Wissenschaft & Technologie*. 23: 203-207.
- Cornejo, G., 1976. *Hojas de la quinua* (*Chenopodium quinoa* Willd.) fuente de proteina. En: Convencion Internacional de Chenopodiaceas. 2da.Potosi, Bolivia. 26-29 abril. IICA. Serie informes de conferencias, cursos y reuniones. No. 96. Bolivia. pp. 177-180.
- Cuadrado C, Ayet G, Burbano C, Muzqiz M., 1995. Occurance of saponins and sapogenols in andean crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 67: 169-172.
- Dutchesses J. M., Danyluk T. A., 2002. Method and composition for protecting plants from disease. U.S. Pat. No. 6: 482-770.
- Fairbanks D.J., Burgener K.W., Robison L.R., Andersen W.R., Ballon E., 1990. Electrophoretic characterization of quinoa seed proteins. *Plant Breeding*. 104: 190-195.

Fleming J.E., Galwey N.W., 1995. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). In: *Cereals and Pseudocereals*. J.T. Williams (ed.). Chapman & Hall, London, pp. 3-83.

Galwey N.W., 1993. The potential of quinoa as a multi-purpose crop for agricultural diversification: a review. *Industrial Crops and Products*. 1: 101-106.

Gandarillas H., 1979. Botanica. In: Tapia ME (ed) Quinoa kaniwa. Cultivos Andinos Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Bogota, Colombia. pp 20-44.

Gee J.M., Price K.R., Ridout C.L., Johnson I.T., Fenwick G.R., 1989. Effect of some purified saponins on the transmural potential difference in the mammalian small intestine. *Toxicology in Vitro*. 3: 85-90.

Gee J.M., Price K.R., Ridout C.L., Wortley G.M., Hurrell R.F., Johnson I.T., 1993. Saponins of quinoa (*Chenopodium quinoa*): effects of processing on their abundance in quinoa products and their biological effects on intestinal mucosal tissue. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 63:201-209.

González J.A., Roldán A., Gallardo M., Escudero T., Prado F.E., 1989. Quantitative determination of chemical compounds with nutritional value from Inca crops: *Chenopodium quinoa* Willd (quinoa). *Plant Foods for Human Nutrition*. 39: 331-337.

Gross R., Koch F., Malaga I., De Miranda, A.F., Schoeneberger H., Trugo, L.C., 1989. Chemical composition and protein quality of some local Andean food sources. *Food Chemistry*. 34: 25-34.

Guzmán-Maldonado S.H., Paredes-López O., 1998. Functional products of plants indigenous to Latin America: amaranth, quinoa, common beans, and botanicals. In: *Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects*. G. Mazza (ed.) Technomic Publishing, Lancaster. pp 293-328.

Haber T.A., Seyan A.A., Banasik O.J., 1978. Functional properties of same high protein product in pasta. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 26: 1191-1194.

Hanna M.A., Satterlee L.D., Thayer K.W., 1978. Sensory and selected textural properties of pasta fortified with plant proteins and whey. *Journal of Food Science*. 43: 231.

Haralampidis K., Trojanowska M., Osbourn A.E., 2002. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 75: 31-49.

Holstein S.A., Hol R.J., 2004. Isoprenoids: remarkable diversity of form and function. *Lipids* 39 (4):293-309.

Hoseney R.C., 1994. Principles of cereal science and technology, 2<sup>nd</sup> (ed.) *American Association of Cereal Chemists*, St Paul, MN. 40: 147-148, 194-195, 197, 342-343.

- Hunziker A.T., 1943. Los esperie alimenticias de *Amarantus* y *Chenopodium* cultivadas por los Indios de America. *Rev. Argen. Agron.* 30: 297-353.
- Iafelice G., Aguzzi A., Marconi E., Ruggieri S., 2007. Cereali e pseudo cereali come fonti di folati. Atti del 70 convegno convegno AISTEC: Cereali tra tradizione e innovazione: il contributo della Scienza. Cubadda R., Marconi E., Campobasso. pp 123-128.
- Inouchi N., Nishi K., Tanaka S., Asai M., Kawase Y., Hata Y., Konishi Y., Shaoxian Y., Fuwa H., 1999. Characterization of amaranth and quinoa starches. *Journal of Applied Polymer Science.* 46: 233-240.
- Jacobsen S.E., Mujica A., Jensen C.R., 2003. The resistance of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) to adverse abiotic factors. *Food Reviews International.* 19: 99-109.
- Jane J.L., Kasemsuwan T., Leas S., Ia A., Zobel H., Il D., Robyt J.F., 1994. Anthology of starch granule morphology by scanning electron microscopy. *Starch/Staerke.* 46: 121-129.
- Javid M.S., 1997. Functional Properties of Buckwheat and Quinoa Starches. MSc Thesis Food Science and Technology. University of Nebraska, Lincoln, NE.
- Johnson, R., Aguilera R., 1980. Processing Varieties of Oilseeds (Lupine and Quinoa), In: Report to Natural Fibers and Foods Commission of Texas, 1978-1980 (Reported by D. Cusack, 1984, *The Ecologist* 14:21-31).
- Johnson D.L., Croissant R.L., 1990. Alternate Crop Production and Marketing in Colorado Technical Bulletin LTB90-3, Cooperative Extension, Colorado State University.
- Johnson D.L., Ward S.M., 1993a. Quinoa. In: Janick J., Simon J.E. (eds) *New crops*. Wiley, New York, pp 219-222.
- Johnson D.L., Ward S.M., 1993b. In: Janick J., Simon J.E. (ed.), *Quinoa*. *New Crops*. Wiley, New York. pp. 222-227.
- Kent N.L., Evers A.D., 1994. *Kent's Technology of Cereals*, 4<sup>th</sup> (ed.) Pergamon Sciencen, Kidlington, UK. pp. 74-75, 178, 284-295.
- Kim G, Price KR, Fenwick GR., 1994. A TLC method for the analysis of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) saponins. 1994. *Food Chemistry.* 49: 311-315
- Koziol M.J., 1993. Quinoa: a potential new oil crop. In: Janick J., Simon J.E. (eds) *New crops*. Wiley, New York, pp 328-336.
- Koziol M.J., 1992. Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Food Composition and Analysis.* 5: 35-68.
- Lorenz K. 1990., Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) starch: physico-chemical properties and functional characteristics. *Starch/Staerke.* 42: 81-86.

- Lorenz K., Nyanzi F., 1989. Enzyme activities in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *International Journal of Food Science and Technology*. 24: 543-551.
- Lorenz K., Coulter L., 1991. Quinoa flour in baked products. *Plant Foods for Human Nutrition*. 41: 213-224.
- Mabry T.J., Taylor A., Turner B.L., 1963. The betacyanins and their distribution. *Phytochemistry*. 2:61-64.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remsesy C., Jimenez L., 2004. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 79 (5): 727-747.
- Mastebroek H.D., Limburg H., Gilles T., Marvin H.J.P., 2000. Occurrence of saponins in leaves and seeds of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80: 152-156.
- Mazza G., Biliaderis C.G., Przybylski R., Oomah B.D., 1992. Composition and morphological characteristics of cow cockle (*Saponaria Vaccaria*) seed, a potential alternative crop. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40: 1520-1523.
- Mizui F., Kasai R., Ohtani K., Tanaka O., 1988. Saponins from bran of quinoa *Chenopodium quinoa* Willd. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 36: 1415-1418.
- Moore S., Spackman D.H., Stein W.H., 1985. Chromatography of amino acid sulphonated resins. *Analytical Chemistry*. 30: 1190-1196.
- Morita N., Hirata C., Park S.H., Mitsunaga T., 2001. Quinoa flour as a new foodstuff for improving dough and bread. *Journal of Applied Polymer Science*. 48: 263-270.
- Mujica A., Jacobsen S.E., Ezquierdo J., Marathe J.P., 2001. Resultados de la Prueba Americana y Europea de la Quinoa. FAO, UNA-Puno, CIP, pp. 51.
- Oakenfull D., Sidhu G.S., 1990. Could saponins be a useful treatment for hypercholesterolaemia. *European Journal of Clinical Nutrition*. 44: 79-88.
- Pagani M.A., De Noni I., Resini P. & Pellegrino L., 1986. Processing and heat damage of dry pasta. *Tecnica Molitoria*, 47: 345-361.
- Pelillo M., Iafelice G., Marconi E., Caboni M.F., 2003. Identification of plant sterols in hexaploid and tetraploid wheats using gas chromatographic with mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 17: 2245-2552.
- Penaloza W., Davey C.L., Hedger J.N., Kell D.B., 1992. Physiological studies on the solid-state quinoa tempeh fermentation, using on-line measurements of fungal biomass production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 59: 227-235.

- Praznik W., Mundigler N., Kogler A., Pelzl B., Huber A., 1999. Molecular background of technological properties of selected starches. *Starch/Staerke*. 51: 197-211.
- Prego I., Maldonado S., Otegui M., 1998. Seed structure and localization of reserve in *Chenopodium quinoa* Willd. *Annals of Botany*. 82: 481-488.
- Przybylsky R., Chauhan G.S., Eskin N.A.M., 1994. Characterization of quinoa (*Chenopodium quinoa*) lipids. *Food Chemistry*. 51: 187-192.
- Ranhotra G.S., Gelroth J.A., Glaser B., Lorenz K.J., Johnson D.L., 1993. Composition and protein nutritional quality of quinoa. *Cereal Chemistry*. 70: 303-305.
- Rea J., 1969. Biología floral de la quinoa. *Turrialba*. 19: 91-96.
- Reichert R.D., Tatarynovich J.T., Teyler R.T., 1986. Abrasive dehulling of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Effect on saponin content as determined by an adapted haemolytic assay. *Cereal Chemistry*. 63:471-475.
- Resmini P., Volontario G., Saracchi S., Piergiovanni L., 1975. Caratteri chimici e nutrizionali di paste alimentari integrate con proteine non convenzionali. *Rivista della Società Italiana di Scienze dell'Alimentazione*. 4: 321-330.
- Ridout C.L., Price K.R., DuPont M.S., Parker M.L., Fenwick G.R., 1991. Quinoa saponins-analysis and preliminary investigations into effects of reduction by processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 54: 165-176.
- Risi J.C., Galwey N.W., 1989. Chenopodium grains of the Andes: a crop for temperate latitudes. In: Wickens GE, Haq N, Day P (eds) *New crops for food and industry*. Chapman and Hall, London, pp 222-234.
- Ruales J., 1998. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): nutritional quality and technology aspects as human food. In: *Increasing the utilization of sorghum, buckwheat, grain, amaranth and quinoa for improved nutrition*. Institute of food research, Norwich. pp 49-64.
- Ruales J., Nair B.M., 1993a. Content of fat, vitamins and minerals in quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd.) seeds. *Food Chemistry*. 48: 131-136.
- Ruales J., Nair B.M., 1993b. Saponins, phytic acid, tannins and protease inhibitors in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 54: 211-219.
- Ruales J., Nair B.M., 1994. Effect of processing on in vitro digestibility of protein and starch in quinoa seeds. *International Journal of Food Science and Technology*. 29: 449-456.
- Ruales J., Valencia S., Nair B., 1993. Effect of processing on the physicochemical characteristics of quinoa flour (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Starch/Staerke*. 45: 13-19.

- Saltini A., 1996. I semi della civiltà. Frumento, riso e mais nella storia delle società umane, pp 182-188 (nuova edizione Bologna 2009 Nuova terra antica ISBN 9788896459010).
- Sanders M, Addis PB, Park SW, Smith DE., 1989. Quantification of cholesterol oxidation products in a variety of food. *Journal of Food Protection*. 52: 109-114.
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C., Jimenez L., 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Critical review *Food Science & Nutrition*. 45(4): 287-306.
- Schlick G., Bubenheim D.L., 1996. Quinoa, candidate crop for NASA's controlled ecological life support systems. In: *Progress in New Crops*. J. Janick (ed.) ASHS Press, Arlington., pp. 632-640.
- Serraino M.R., Thompson L.U., Savoie L., Parent G., 1985. Effect of phytic acid on the in vitro rate digestibility of rapeseed protein and amino-acid. *Journal of Food Science*. 50: 1689-1692.
- Simmonds N.W., 1965. The grain chenopods of the tropical American highlands. *Economic Botany*. 19: 223-235.
- Southon S., Wright A.J.A., Price K.R., Fairweather-Tait S.J., Fenwick G.R., 1988. The effect of three types of saponin on iron and zinc absorption from a single meal in the rat. *British Journal of Nutrition*. 59: 389-396.
- Sweeley CC, Bentley R, Makita M, Wells WW., 1963. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugar and related substances. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 85: 2497.
- Tang H., Watanabe K., Mitsunaga T., 2002. Characterization of storage starches from quinoa, barley and adzuki seeds. *Carbohydrate Polymers*. 49: 13-21.
- Taylor J.R.N., Parker M.I., 2002. Quinoa. In: *Pseudocereals and Less Common Cereals: Grain Properties and Utilization Potential*. P.S. Belton, J. R.N. Taylor (ed.) Springer Verlag, Berlin. pp.38.
- Theurer-Wood R., 1985. Tale of food survivor: Quinoa. E. W. J. pp. 63-68.
- Thompson T., 1997. Do oats belong in a gluten-free diet? *Journal of the American Dietetic Association*. 97: 1413-1416.
- Valencia S., Svanberg U., Sandberg A.S., Ruales J., 1999. Processing of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): effects on in vitro iron availability and phytate hydrolysis. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 50: 203-211.
- West L.G., Greger J.L., White A., Nonnamaker R.J., 1978. In vitro studies on saponin-mineral complexation. *Journal of Food Sciences*. 43: 1342-1343.

Whistler R.L., 1995. Compositions using small granule starch. U.S. Pat. No. 5: 453-281.

Wilhelm E., Themeier H.W., Lindhauer M.G., 1998. Small granule starches and hydrophilic polymers as components for novel biodegradable two-phase compounds for special applications. Part 1: Separation and refinement techniques for small granule starches from amaranth and quinoa. *Starch/Staerke*. 50: 7-13.

Wolf M.J., MacMasters M.M., Rist C.E., 1950. Some characteristics of the starches of three South American seeds used in food. *Cereal Chemistry*. 27: 219-222.

Wood S.G., Lawson L.D., Fairbanks D.J., Robinson L.R., Andersen W.R., 1990. Seed lipid content and fatty acid composition of three quinoa cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*. 6: 41-44.

Xu S., Patterson G.W., Lusby W.R., Schmid K.M., Salt T.A., 1990. The distribution and phylogenteic significance of desmethylsterols in *Chenopodium* and atrilpex: coexistence of  $\Delta^7$ - and  $\Delta^5$  sterols. *Lipids*. 25: 61-64

Zhu N., Sheng S., Li D., Lavoie E.D., Karwe M.V., Rosen R.T., Ho C.T., 2001. Antioxidative flavonoid glycosides from quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.). *J. Food Lipids*. 8: 37-44.

[www.wikipedia.org/altromercato](http://www.wikipedia.org/altromercato)

[www.associazionequinoa.it](http://www.associazionequinoa.it)