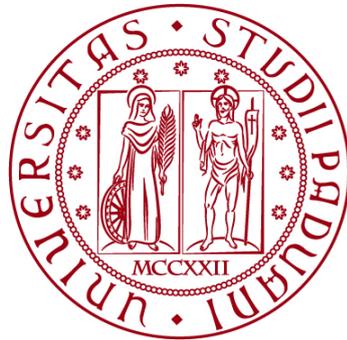


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA

**ALIMENTI BIOFORTIFICATI CON CAROTENOIDI:
UTILIZZO E IMPATTO SOCIALE IN AFRICA.**

Relatore: Prof.ssa Elide Formentin

Dipartimento di Biologia

Laureanda: Francesca Graizzaro

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Indice

CAPITOLO 1.

Introduzione	3
1.1. Biofortificazione.....	3
1.1.1. Di cosa si tratta?.....	3
1.1.2. Perché?	3
1.1.3. È una valida soluzione?.....	4
1.2. Carotenoidi	5
1.2.1. Vitamina A	5
1.2.2. Biosintesi dei carotenoidi.....	6

CAPITOLO 2.

Piante biofortificate con carotenoidi e impatto sulla popolazione	9
2.1. Cereali	9
2.1.1. Ingegneria metabolica.....	9
2.1.2. Marker-assisted breeding.....	10
2.2. Mais	12
2.2.1. Mais fortificato e piccole comunità rurali in Africa	13
2.3. Patate dolci.....	13
2.3.1. Consumo della patata dolce biofortificata in Sudafrica	15
2.4. Manioca.....	16
2.4.1. Consumo di manioca biofortificata in provitamina A in età prescolare	19

CAPITOLO 3.

Conclusioni e prospettive future	21
BIBLIOGRAFIA	22

CAPITOLO 1

Introduzione

La carenza di vitamina A (VAD) è un problema di salute pubblica causato da un basso apporto di questa vitamina o dei suoi precursori nella dieta. Tale carenza è un problema anche maggiore nei paesi in via di sviluppo in cui la povertà e la scarsa disponibilità di alimenti ancora oggi rappresentano gravi problemi per la salute.

Per esempio, in Africa, la VAD affligge circa 33 milioni di bambini in età prescolastica ed è responsabile di un 20-24% di morte dei bambini per diarrea, morbillo e malaria, e per il 3% di mortalità per malattie infettive. [1]

La biofortificazione della provitamina A nelle coltivazioni è una strategia a basso costo per garantire alla popolazione un suo adeguato apporto. Oggi esistono delle specie vegetali che, per sopperire alle carenze nutrizionali in determinate aree geografiche, sono state biofortificate con β - carotene (es. cereali in generale e nello specifico mais, patate dolci, manioca).

In questa tesi verrà analizzata la biofortificazione degli alimenti sopracitati; per ogni alimento verrà considerata l'effettiva presenza di carotenoidi anche dopo la lavorazione che serve per il suo consumo (macinazione, cottura); inoltre per ogni alimento verranno valutati i vantaggi e gli svantaggi della biofortificazione in termini nutrizionali.

1.1 Biofortificazione

1.1.1 Di cosa si tratta?

Quando parliamo di biofortificazione stiamo considerando un processo che consente di migliorare la qualità nutrizionale di una pianta o di una porzione di essa. Questo vuol dire che l'alimento che questa produrrà avrà una maggiore quantità e biodisponibilità di nutrienti.

Si tratta di un processo diverso rispetto a quello della fortificazione. In quest'ultima, infatti, i nutrienti vengono aggiunti durante il processo di lavorazione degli alimenti, mentre con la biofortificazione l'aggiunta avviene prima della raccolta. [2]

1.1.2 Perché?

I nutrienti sono il carburante del nostro organismo, assumendone una giusta quantità siamo in grado di compiere le normali funzioni metaboliche e di crescita.

Se si dovesse presentare una situazione in cui alcuni di questi vengono a mancare per un determinato periodo di tempo potremmo trovarci di fronte ad una serie di

problemi di salute. Se questo avviene in bambini che non hanno ancora completamente concluso lo sviluppo, le patologie che ne possono derivare avrebbero una gravità tale da portare a malformazioni fisiche e malfunzionamenti dei vari distretti corporei.

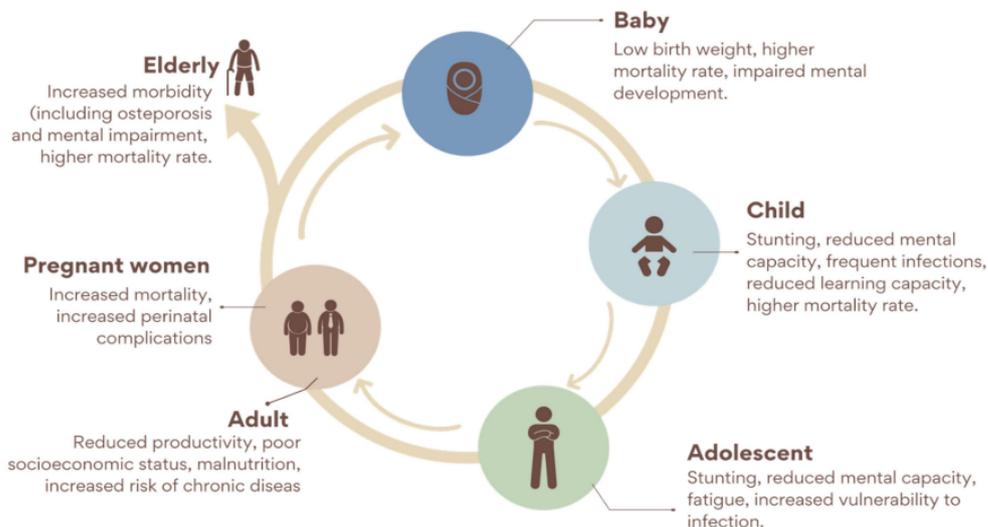


Figura 1 [2]: Conseguenze della carenza di nutrienti nel corso della vita

Una carenza di questo tipo si ha nel caso in cui non si riesce ad assumere una sufficiente quantità di nutrienti con la dieta. Spesso questo avviene soprattutto nei paesi poveri in cui la scarsa possibilità economica si accompagna all'impossibilità di acquistare cibi di buona qualità o di avere a disposizione una grande variabilità di ingredienti.

In particolare, nel caso dei carotenoidi, la biofortificazione dei vegetali rappresenta una delle soluzioni migliori per raggiungere uno stato di nutrizione ottimale e una dieta sana. Questo perché la combinazione di carotenoidi con antiossidanti e altri fitonutrienti già presenti in un alimento è molto più efficace che assumere singolarmente tutte le varie componenti e anche perché in ogni caso i carotenoidi alimentari sono ottenuti dalla frutta e verdura (importanti nella dieta di un individuo). [3]

1.1.3 È una valida soluzione?

Al giorno d'oggi aggiungere nutrienti a determinati alimenti sembra essere una valida soluzione per aiutare a combattere la malnutrizione e la fame in modo sostenibile, sia a livello ambientale che economico. Nonostante ciò, molti sono contrari alla biofortificazione in quanto si tratta di prodotti geneticamente modificati che l'opinione pubblica fa ancora fatica ad accettare.

1.2 Carotenoidi

I carotenoidi sono pigmenti di natura lipidica che vengono prodotti da tutti gli organismi fotosintetici. Si tratta di composti importanti, essendo precursori di molecole con attività biologica come l'acido abscissico (ormone vegetale che troviamo anche negli animali dove aiuta a regolare la glicemia) e strigolattone (ormoni vegetali che regolano la crescita delle piante e la loro risposta agli stress).

Negli organismi fotosintetici i carotenoidi hanno funzione di fotoprotettori, cioè dissipano l'energia luminosa sotto forma di calore.

Inoltre, essi sono anche potenti antiossidanti, promuovendo la disintossicazione dai radicali liberi, e limitando in questo modo i processi infiammatori causati dallo stress ossidativo. [4]

L'azione antiossidante dei carotenoidi è fondamentale anche negli animali, e in particolare nell'uomo, in quanto il danno ossidativo contribuisce alla patogenesi di alcune malattie croniche, come la degenerazione maculare legata all'età, il diabete di tipo 2, malfunzionamenti cognitivi, obesità, malattie cardiovascolari e alcuni tipi di tumore.[3]

Tuttavia, poiché gli animali non riescono a sintetizzare i carotenoidi, è necessario che essi vengano assunti con la dieta.

Infatti, una dieta ricca in carotenoidi è associata a un ridotto rischio di malattie croniche sopracitate. [3]

1.2.1 **Vitamina A**

La vitamina A (o retinolo) fa parte delle vitamine liposolubili. Essa viene quindi immagazzinata nel fegato, e rilasciata gradualmente; per tale motivo non è necessaria un'assunzione regolare attraverso il cibo. [5]

Si tratta di una molecola termolabile, ossia facilmente degradata durante la cottura degli alimenti.[5]

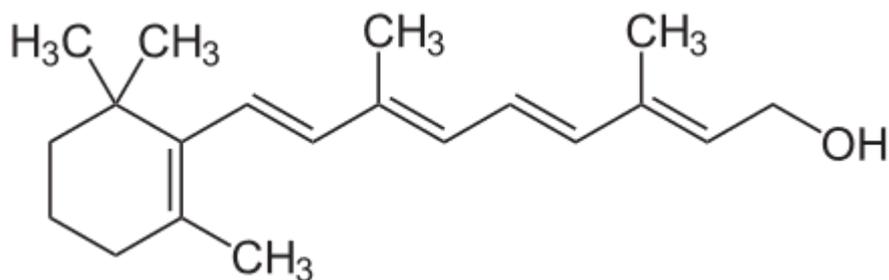


Figura 2 [6]: struttura della vitamina A

Questa vitamina ha un'importanza fondamentale per la vista perché fa parte della rodopsina (molecola fotosensibile presente nell'occhio) e, insieme a luteina e zeaxantina (altri tipi di carotenoidi), permette la percezione della luce e riduce il rischio di insorgenza di malattie della retina e la cataratta [5]. È inoltre utile per lo sviluppo delle ossa, per il loro rafforzamento nel tempo, per la crescita dei denti e contribuisce a fornire una risposta immunitaria nel nostro organismo.[7]

La vitamina A si trova soprattutto negli alimenti di origine animale (es. fegato, latte e derivati, uova), ma i suoi precursori si trovano anche negli alimenti di origine vegetale (frutta e verdura di colore giallo, rosso, arancione). [7]

La carenza di questa vitamina presenta uno dei maggiori problemi nei paesi in via di sviluppo. Nei bambini in età prescolastica provoca difetti alla vista che possono anche portare a cecità, difficoltà nella crescita e sviluppo dell'organismo, elevata sensibilità alle infezioni e, nelle donne in gravidanza, può provocare delle malformazioni fetali.[5]

Al contrario l'eccessivo accumulo di vitamina A può provocare danni a fegato e milza. [7]

1.2.2 Biosintesi dei Carotenoidi

I carotenoidi sono sintetizzati dai precursori universali degli isoprenoidi C5 isopentenil difosfato (IPP) e dal suo isomero dimetilallil difosfato (DMAPP). Nelle piante, questi composti derivano da due vie indipendenti: la via del mevalonato nel citosol e la via del metileritritolo 4-fosfato (MEP) nei plastidi. I carotenoidi presenti nelle piante derivano principalmente dalla via del MEP nei plastidi. Dalla fusione di tre molecole di IPP e una di DMAPP si forma il C₂₀ geranylgeranyl difosfato, il precursore diretto dei carotenoidi e di altri isoprenoidi plastidiali come i diterpeni, le gibberelline e le clorofille. [3]

Il primo vero passo nella via dei carotenoidi è la formazione del fitoene C₄₀ da due molecole di geranylgeranyl difosfato, catalizzata dall'enzima fitoene sintasi (PSY). Il fitoene incolore è poi convertito tramite decolorazioni sequenziali e reazioni di isomerizzazione al lycopene (pigmento rosso). La ciclizzazione dei due estremi delle molecole lineari di lycopene è il primo livello di ripiegamento della via biosintetica. L'introduzione di due anelli β genera il β -carotene, se invece aggiungo un anello ϵ ed uno β si origina l' α -carotene. Dall'idrolizzazione ed epossidazione quest'ultimo (carotene) si trasforma in tutti quei composti chiamati carotenoidi ossigenati (xantofille) come luteina, zeaxantina, violaxantina. [3]

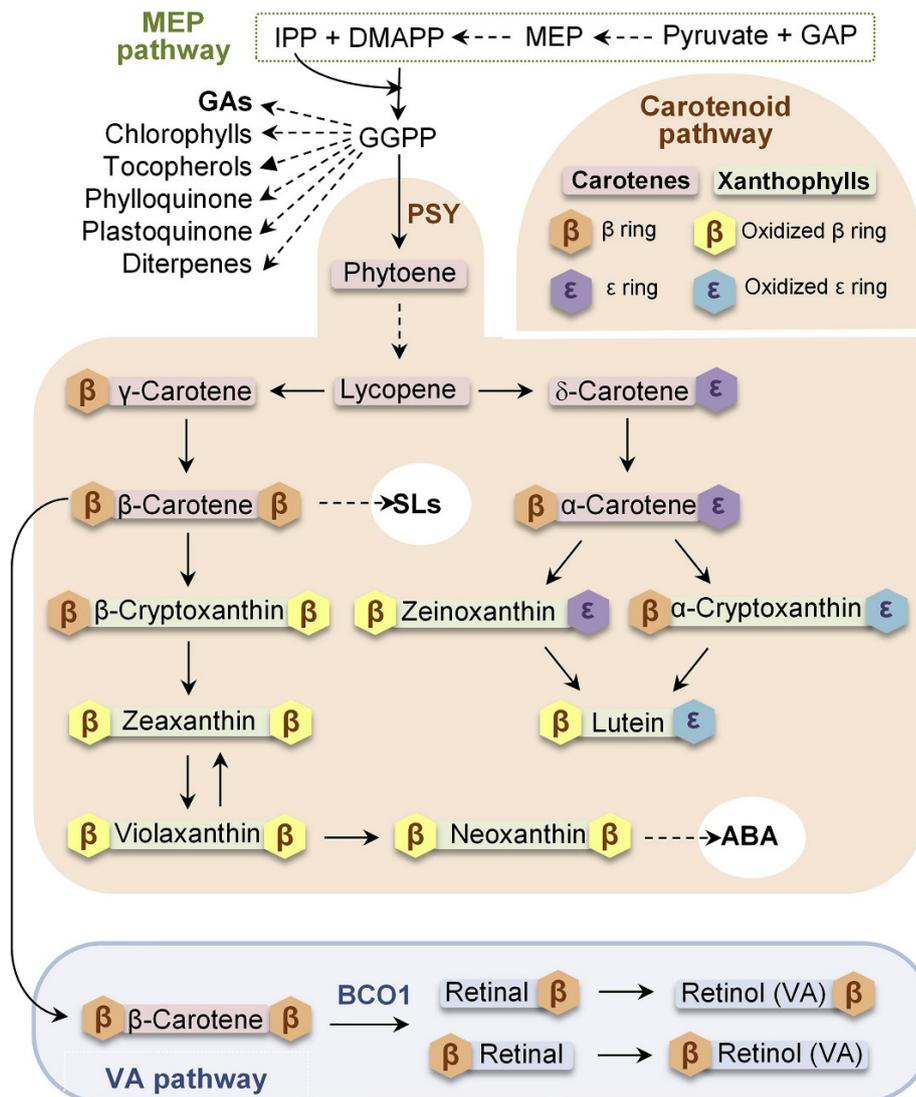


Figura 3 [4]: Biosintesi dei carotenoidi e relativi percorsi

I carotenoidi liberi sono metaboliti idrofobici che formano aggregati e si accumulano nei depositi ricchi di lipidi. [3], [4]

Il β -carotene viene anche chiamato provitamina A, questo perché è il precursore della vitamina A. Si tratta di un pigmento vegetale responsabile della colorazione rosso-giallo-arancio dei cibi nei quali è contenuto. La sua trasformazione in vitamina A avviene nell'intestino dove l'enzima deossigenasi lo scinde in due molecole di retinale che successivamente vengono trasformate in retinolo (vit A) dall'enzima retinale riduttasi NDPH dipendente. La trasformazione del β -carotene assunto con la dieta in vitamina A è inversamente proporzionale al livello della vitamina nell'organismo. [8]

CAPITOLO 2

Piante biofortificate con carotenoidi e impatto sulla popolazione

2.1 Cereali (mais, riso, grano)

Mais (*Zea mays L.*), riso (*Oryza sativa L.*) e grano (*Triticum spp*) sono gli alimenti principali dell'alimentazione umana. Poiché si tratta di piante povere in carotenoidi, una dieta costituita quasi solo da questi alimenti e poco diversificata, può presentare un problema per la salute. Per questo motivo la modifica della loro composizione con l'incremento del contenuto di carotenoidi è importante per bilanciare la dieta. [9]

Ci sono due strategie tramite cui viene attuata la biofortificazione: l'ingegneria metabolica e il marker-assisted breeding.

2.1.1 Ingegneria metabolica

I vari approcci dell'ingegneria metabolica puntano ad incrementare il livello di carotenoidi nutrizionalmente rilevanti nei cereali di base e ad utilizzare le piante come "fattorie cellulari" per indurre una loro produzione. Utilizzando questo metodo riusciamo a modificare la composizione dei carotenoidi al loro interno o ad incrementare quelli che già presentano. [9] A livello pratico, questo si riesce a fare con l'introduzione di geni che contengono le informazioni necessarie per sintetizzare i carotenoidi di interesse.

Il "Golden Rice" (riso biofortificato) ha rappresentato una svolta nell'ambito dell'ingegneria metabolica. Il riso wild type (*Oryza sativa L.*) è privo di vitamina A, in quanto non presenta i geni necessari per trascrivere i precursori della sua via biosintetica. Questi geni (presi da altre specie vegetali) devono quindi essere inseriti nell'endosperma del riso così da ottenere la sua biofortificazione in vitamina A. [10]

Nel lavoro di Burkhardt P. K., Beyer P. [10] si è riusciti a trasferire i geni PSY e LCYB del narciso, precursori della biosintesi di carotenoidi, insieme al gene CrtI batterico, da cui viene sintetizzato il fitoene desaturasi (enzima catalizzatore nella biosintesi dei carotenoidi), in una cultivar di riso japonica. Il contenuto di β -carotene nell'endosperma ha raggiunto una concentrazione di 1,6 $\mu\text{g/g}$ del peso secco del seme, riuscendo a fornire più della dose giornaliera raccomandata [10].

Recentemente si è riusciti ad aumentare ulteriormente il livello di accumulazione di carotenoidi attraverso l'aumento dell'espressione di questi geni nell'endosperma del riso. Questo ha suggerito che fornire precursori e catalizzatori della via biosintetica è un'importante fase nella modulazione della velocità della biosintesi dei carotenoidi [11].

Risultati simili sono stati riscontrati con l'incrocio del grano con il mais (con l'aiuto delle "marker-assisted breeding"), anche se con valori inferiori rispetto al semplice incremento metabolico del grano.

Nonostante l'incremento della biosintesi del β -carotene con l'utilizzo dell'ingegneria metabolica si sia dimostrato utile, le linee transgeniche create possono produrre feedback inaspettati per quanto riguarda la concentrazione degli altri nutrienti. Questo perché negli anni ci si è concentrati soprattutto sul combattere la carenza di vitamina A, rivolgendo minor attenzione agli effetti del suo aumento sulle concentrazioni degli altri nutrienti, tra cui diversi carotenoidi, anche questi importanti come, ad esempio, la luteina e la zeaxantina. [9]

2.1.2 Marker-assisted breeding

Le "marker-assisted breeding" sono strategie di incrocio genetico che possono essere utilizzate per incrementare le concentrazioni di carotenoidi nei cereali. Ci sono cinque diversi approcci che possono essere utilizzati:

- la selezione/delezione di germoplasmi (corredo genetico di una determinata specie), che genera diversità genetica e quindi diversa espressione nella concentrazione di carotenoidi e folato (acido folico);
- l'identificazione delle linee parentali migliori e la produzione di ibridi con caratteristiche eccezionali e diverse combinazioni geniche;
- l'introduzione di caratteristiche associate ad un'alta concentrazione di carotenoidi da specie wild type (con le caratteristiche tipiche che vi si ritrova in natura, quindi che non hanno subito mutazioni particolari) in specie coltivate attraverso ibridazione interspecifica (tra specie);
- l'incrocio per molte generazioni di linee parentali ad alto contenuto di carotenoidi e folato con le migliori linee generate nella coltivazione in modo da creare linee stabili;
- l'introduzione di mutazioni utilizzando mutageni chimici e fisici nelle linee germinali (d'origine) con bassi contenuti di carotenoidi e folati per aumentare la loro concentrazione con l'inserimento di altre vie biosintetiche.

Queste strategie sono elencate nella Figura 4 [12].

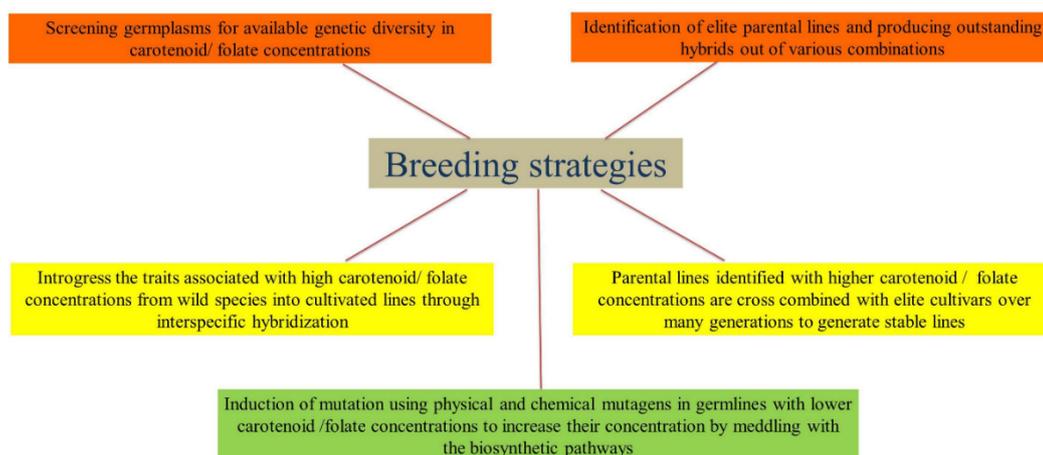


Figura 4 [12]: strategie di miglioramento genetico per incrementare l'apporto in carotenoidi dei cereali

Il riso (*Oryza sativa L.*) normalmente non contiene un'adeguata quantità di carotenoidi che il corpo umano può convertire in Vitamina A. Si è visto che le strategie di breeding non hanno molto successo nell'incremento del β - carotene nell'endosperma del riso. Questo è dovuto al fatto che nell'endosperma del seme non ci sono genotipi in grado di sintetizzare carotenoidi e la loro disponibilità è molto bassa. Infatti, è stato mostrato come il contenuto in carotenoidi del riso integrale si riduce notevolmente durante il processo di raffinazione [12], [13]. Per ottenere un risultato migliore nel loro incremento nel riso è necessario ricorrere all'ingegneria genetica.[12]

Il mais (*Zea mays L.*) ha già dei carotenoidi nel chicco, che con la biofortificazione aumentano. Presentandoli già nell'endosperma riesce a trattenerli maggiormente rispetto al riso anche durante i processi di lavorazione. Per questo le coltivazioni che mirano ad aumentare il livello di provitamina A in questo cereale riescono ad avere rese molto elevate. Queste risultano essere non solo vantaggiose per gli agricoltori che ne traggono profitto, ma anche preferibili dai consumatori che verificano un'effettiva riduzione della carenza di vitamina A. [14]

Anche nel grano (*Triticum spp*) l'aumento di provitamina A è facilmente raggiungibile. Questo probabilmente è dovuto alle caratteristiche dello sviluppo del grano e alla sua elevata suscettibilità agli effetti genetici della provitamina A. Se ci concentriamo sul contenuto di β -carotene vediamo che solo poche specie ne hanno un'elevata concentrazione, la quale rimane inferiore a quella del mais, in quanto quest'ultimo già ne contiene prima che venga biofortificato. [14]

2.2 Mais (*Zea mays L.*)

Il mais è un alimento di base per più di 1,2 miliardi di persone nell’Africa subsahariana (dove è l’alimento principale) e nell’America Latina ed è considerata una coltivazione di vitale importanza per la nutrizione globale.

In Europa la maggior parte delle persone pensa che esista soltanto una tipologia di mais ossia quello giallo perché è quello che siamo abituati a trovare e consumare, ma basta una semplice ricerca per scoprire che in natura se ne possono trovare altre tipologie. Al mondo, infatti, sono presenti moltissime varietà di mais, se ne può trovare di nero, bianco, blu, arancione, rosso o addirittura di vari colori. Ognuno di questi presenta delle differenze soprattutto dal punto di vista nutrizionale.

In particolare, il mais bianco, che viene consumato in sud Africa, è privo di β -carotene, per questo motivo in questa area geografica abbiamo il maggior numero di problemi di salute legati alla VAD. [14]

Maize	Carotenoids (nmol/g)				
	Lutein	Zeaxanthin	β -cryptoxanthin	β -carotene	β -carotene
White	1.1 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01	-	-	0.05 \pm 0.002
Yellow	16.8 \pm 0.6	5.4 \pm 0.5	2.6 \pm 0.4	0.44 \pm 0.04	0.77 \pm 0.14
Orange	15.7 \pm 0.3	11.6 \pm 0.3	5.4 \pm 0.05	0.58 \pm 0.02	5.6 \pm 0.1
Dark orange	19.1 \pm 4.5	11.8 \pm 2.9	5.3 \pm 0.7	1.53 \pm 0.04	13.9 \pm 0.7

Tabella 1 [15]: Concentrazione di carotenoidi nelle differenti varietà di mais

Nello studio di Pillay et al. [1], la capacità che il mais ha di trattenere la provitamina A durante il processo di macinazione non è stata analizzata, ma, andando a valutare i prodotti ottenuti a seguito dei processi di raffinazione e macinazione, si vede come una parte di questa viene persa. Questo dipende dalla capacità che il suo seme ha di trattenere una determinata molecola e dalla lavorazione che questo subisce.

Infatti, per quanto un cereale abbia un’elevata capacità di trattenere i nutrienti, se noi andiamo a disgregarlo o anche solo a scaldarlo avremmo sicuramente una perdita più o meno elevata di nutrienti anche semplicemente per la loro disgregazione dovuta al calore.

Sembra che l’unico piatto Africano che consenta di non avere una grossa perdita di provitamina A nel mais biofortificato sia il *phutu* (tradizionale polenta sudafricana di mais bianco, cucinata fino a quando assume una consistenza granulosa) che mantiene fino al 75.5% di β -carotene. Successivamente, sono stati analizzati i piatti cucinati con la farina di mais biofortificata e si è visto che si riesce a mantenere l’incremento di nutrienti se si evita la cottura al forno.

Purtroppo, essendoci una grande varietà di preparazioni tipiche in tutto il sud Africa, al momento si ha una carenza di dati per quanto riguarda la capacità del mais di mantenere il β -carotene in ogni processo. Questa scarsità di informazioni

impedisce lo sviluppo di nuove tecniche di biofortificazione che potrebbero portare ad una minor perdita di nutrienti anche in altri processi. [1]

2.2.1 Mais fortificato e piccole comunità rurali in Africa

In Sud Africa, per fare in modo che ci sia sempre disponibilità di mais biofortificato con provitamina A (PVABM) e che le popolazioni locali non si trovino obbligate a comprare questo mais da qualche multinazionale. Le quali potrebbero alzare i prezzi del prodotto a scopo di lucro. Si è cercato di introdurre delle cultivar nelle Smallholder Farms locali (aziende agricole a conduzione familiare).[15]

Nello studio di Zuma M., Kolanisi U. e Modi A., si è notato però che da parte di queste realtà non c'era una grande apertura nei confronti del PVABM in quanto i contadini prima di decidere di coltivare questa nuova varietà di mais dovevano "fidarsi" del prodotto. Uno dei motivi principali per cui erano restii a coltivarlo è il suo colore, in quanto si tratta di un mais giallo e non bianco motivo per cui inizialmente pensavano fosse cibo per animali. [15]

Per riuscire a superare questa credenza è risultato utile il lavoro di informazione e sensibilizzazione che viene fatto in questi paesi arrivando a convincere i produttori che questo mais avrà maggiori rese rispetto al mais bianco o ad altre varietà autoctone e spiegando inoltre l'importanza dell'introduzione della vitamina A nella loro dieta.[15]

2.3 Patate dolci (Ipomea batata L.)

Le patate dolci biofortificate vengono chiamate "Orange Sweet Potatoes" (OSP) per la colorazione arancione derivata dall'aumento di provitamina A. Queste vengono ampiamente distribuite ed utilizzate nei paesi poveri per combattere la VAD. Le OSP, come prodotto biofortificato, sembrano essere un'alternativa migliore al "Golden Rice" (riso con supplemento di provitamina A). Questo perché il riso tende a perdere gran parte dei carotenoidi contenuti nel suo endosperma durante i processi di raffinazione, mentre la patata ha una maggiore capacità di trattenerli.



Figura 5 [16]: Orange sweet potatoes

Recenti studi hanno però evidenziato come l'incremento di carotenoidi ha un effetto negativo sulla quantità di amido che queste contengono. Questo perché gli amiloplasti, plastidi presenti nelle radici di deposito che normalmente producono principalmente granuli di amido, si trovano a sintetizzare anche carotenoidi diventando un fenotipo misto di amilocromoplasti. La sintesi dell'amido viene quindi ridotta notevolmente e superata da quella dei carotenoidi.[17]

Sono state analizzate cinque varietà di patate dolci con diversi livelli di carotenoidi dopo aver effettuato analisi prossimali e profilazione dei metaboliti per mostrare la potenziale associazione tra carotenoidi, macromolecole (lipidi, amido e proteine) e metaboliti primari utilizzati come precursori (figura 6). Sulla base di quanto detto precedentemente, i dati generati dovrebbero riflettere una correlazione negativa tra il contenuto di carotenoidi e amido.[18] Effettivamente, l'analisi prossimale ha mostrato significativi livelli più bassi di amido nei fenotipi ricchi di carotenoidi. Tuttavia, l'analisi di correlazione di questi dati non ha mostrato alcuna correlazione significativa tra le tre macromolecole (lipidi, amido e proteine) e le due classi di metaboliti specializzati: carotenoidi e antociani (Fig. 6B). Un aumento del numero di fenotipi potrebbe aumentare la proporzionalità indiretta tra amido e carotenoidi (valore di correlazione 0,32) in un valore di correlazione statisticamente significativo 0,467 come precedentemente riportato per 89 patate dolci africane.[17], [18]

Successivamente anche altri studi hanno riportato una correlazione tra il contenuto di amido e carotenoidi, mettendo in relazione la valutazione biochimica (del legame fisico del locus Phytoene synthase (PSY) e Sucrose synthase (Susy) e la dipendenza dal glucosio ADP disponibile[19], (figura 6A)) con dei dati dei metaboliti [20](Fig. 6B).

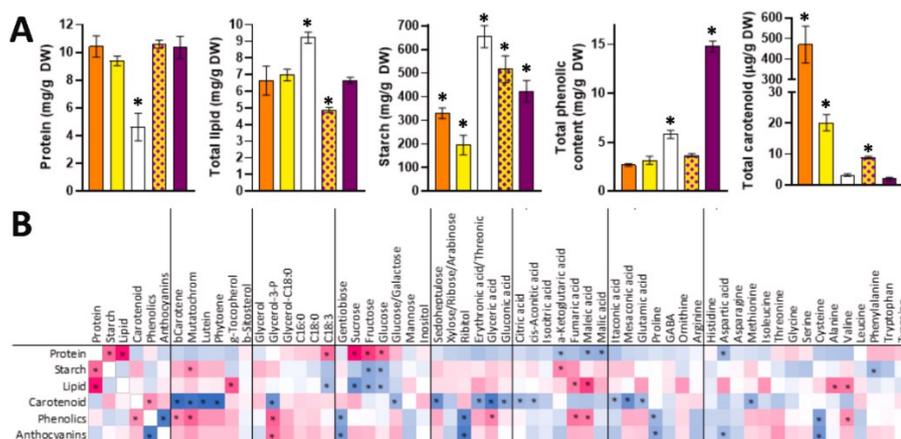


Figura 6 [17]: Valutazione biochimica delle radici di conservazione delle patate dolci (A) e correlazione con i metaboliti (B). I metaboliti, precedentemente analizzati da [20], sono stati raggruppati in vie biochimiche (isoprenoidi, precursori della parete cellulare, glicolisi, via dei pentosi fosfati, ciclo TCA, shunt di azoto e aminoacidi, rispettivamente), divisi per linee e correlati alla valutazione biochimica. La correlazione viene visualizzata in rosso (negativo da 1 a <0), bianco (nessuno; 0) e blu (positivo; >0 a 1). La significatività statistica (P-value <0.05) dei valori di correlazione è stata indicata con un asterisco.

Questa riduzione della produzione dei granuli di amido porta a una riduzione di materia secca. Ci troviamo quindi di fronte ad un problema: abbiamo un alimento che ha la capacità di trattenere i carotenoidi, ma questo presuppone una perdita importante di disponibilità energetica.

Viene spontaneo chiedersi quale tra i due possibili scenari sia il migliore: da una parte ho la possibilità di ridurre la VAD che altrimenti andrebbe a danneggiare ulteriormente l'organismo; dall'altra c'è il rischio di non riuscire a fornirgli abbastanza energia per continuare con le normali attività metaboliche.

Una possibile soluzione potrebbe essere un'integrazione parziale di patate biofortificate, ma bisogna vedere se questa è sufficiente a fornire un adeguato incremento di vitamina A. [17]

2.3.1 Consumo della patata dolce biofortificata in Sudafrica

Lo studio di Govender et al. va ad analizzare come la sostituzione del mais bianco e delle patate dolci a polpa cremosa, con un mais biofortificato e delle patate dolci a polpa arancione (entrambi prodotti biofortificati con provitamina A e che per questo hanno cambiato colore), viene accettata dai consumatori e introdotta nei piatti tradizionali delle comunità rurali del Sudafrica. [21]

Sono stati preparati differenti piatti tipici, tra cui il phutu, il pollo al curry, il cavolo al curry e le patate dolci. Questi poi sono stati presentati a un gruppo di 120 adulti africani selezionati casualmente tra uomini e donne. Durante la valutazione sensoriale è stata utilizzata una scala di valutazione a cinque punti a seguito della quale solo 56 persone (divise in gruppi da 7-10) hanno accettato di partecipare alla discussione. [21]

La maggioranza dei partecipanti ha valutato i piatti composti contenenti phutu biofortificato PVA come "4 = buono" e l'accettabilità dei piatti composti variava significativamente. Rispetto ad altri gruppi di età, il gruppo di età 50-59 anni mostrava una maggiore preferenza per il phutu bianco e il pollo al curry, mentre il gruppo di età 30-39 anni mostrava una maggiore preferenza per il phutu biofortificato PVA e il pollo al curry con un'accettabilità dei due alimenti molto simile. [21]

Fascia d'età (anni)	Phutu e pollo al curry		Phutu e cavolo al curry		Curry di arachidi Phutu e Bambara		Patata dolce	
	Phutu bianco e pollo al curry	PVA Phutu e pollo al curry	Phutu bianco e curry di cavolo	PVA phutu e cavolo al curry	Phutu bianco e curry di arachidi Bambara	PVA Phutu e Bambara Curry di arachidi	PESC	OFSP
20-29	7 ^{un} (50) ^b	7 (50)	9 (64)	5 (36)	9 (64)	5 (36)	5 (36)	9 (64)
30-39	7 (29)	17 (71) ^c	11 (46)	13 (54)	13 (54)	11 (46)	10 (42)	14 (58)
40-49	11 (39)	17 (61)	12 (43)	16 (57)	16 (57)	12 (43)	14 (50)	14 (50)
50-59	17 (68)	8 (32)	11 (44)	14 (56)	13 (52)	12 (48)	10 (40)	15 (60)
60+	17 (59)	12 (41)	18 (62)	11 (38)	15 (52)	14 (48)	16 (55)	13 (45)
Totale n. partecipanti	59 (49)	61 (51)	61 (51)	59 (49)	66 (55)	54 (45)	55 (46)	65 (54)

^{un} Numero di partecipanti; ^b Percentuale (%); ^c I valori in grassetto all'interno della stessa colonna sono significativamente diversi a $p < 0,05$ (Pearson Chi-square); PVA = Provitamina A; PESC = patata dolce a polpa crema; OFSP = Patata dolce a polpa arancione.

Tabella 2 [21]: Preferenza tra gruppi d'età (n=120)

I partecipanti allo studio hanno dato dei feedback positivi riguardo sia le patate dolci di polpa arancione che il phutu biofortificato PVA se servito con pollo al curry o con il cavolo. I risultati suggeriscono che entrambi possono sostituire il mais bianco e il CFSP, rispettivamente, in alcuni piatti tradizionali delle comunità rurali studiate per alleviare la VAD.[21]

Gli autori dello studio affermano che la scarsa accettabilità delle colture biofortificate, riscontrata nelle persone più anziane, va attribuita al colore giallo/arancione esibito dai pigmenti carotenoidi presenti nelle colture e al forte aroma e sapore presentati dalle colture biofortificate. [21]

2.4 Manioca (*Manihot esculenta* Cranz)



Figura 7 [22]: Tubero, foglia e farina di Cassava

La manioca, (anche chiamata cassava, è una pianta originaria del Sudamerica e dell'Africa Subsahariana. Ha una radice a tubero commestibile e per questo viene coltivata nei paesi tropicali e subtropicali del mondo, dove rappresenta una delle

fonti principali di carboidrati.[23] Nonostante sia ricca in carboidrati, risulta però essere povera di minerali (ferro e zinco) [24].

La manioca è una pianta molto resistente a patogeni e siccità, motivo per cui sembra essere un alimento che assumerà un'importanza sempre maggiore con l'avanzare degli anni e con i continui cambiamenti climatici.

Il terzo produttore a livello mondiale è la Nigeria e proprio per questo motivo è qui che vengono svolti molti studi riguardanti l'introduzione della manioca biofortificata. [23]

Nel 2011 in Nigeria sono state sviluppate delle cultivar (coltivazioni) di manioca biofortificata con carotenoidi (anche chiamata "Yellow cassava" perché le radici diventano di colore giallo). La biofortificazione porta la manioca ad avere una concentrazione di provitamina A pari a 5-11 $\mu\text{g/g}$ e permette di mantenere un prezzo contenuto (fattore rilevante trattandosi di paesi poveri). Nonostante il contenuto in carotenoidi aumenti, resta basso quello di ferro e zinco. Questo però non sembra essere un problema in quanto basta integrare nella dieta anche verdure a foglia che ne sono ricche. [24]

Nuovi alimenti a base di verdure a foglia e manioca migliorerebbero il valore nutrizionale di una dieta a base di amido. Un esempio di questi è la pasta di cassava gialla e foglie di amaranto (*Amaranthus retroflexus*). [24]

Sembra però che la manioca abbia una scarsa capacità di ritenzione di carotenoidi nell'alimento una volta che questo viene cucinato. Questo è un problema importante visto che la manioca può essere consumata solo se cotta a causa degli alti livelli di acido cianidrico (velenoso per l'uomo) che presenta da cruda. È stato dimostrato che una bassa capacità di ritenzione di carotenoidi è reale e questo si nota non solo dalle perdite che si verificano per motivi chimici (a causa della temperatura di cottura), ma anche da quelle per motivi fisici (a causa dei liquidi scartati che contengono anche carotenoidi).[25]

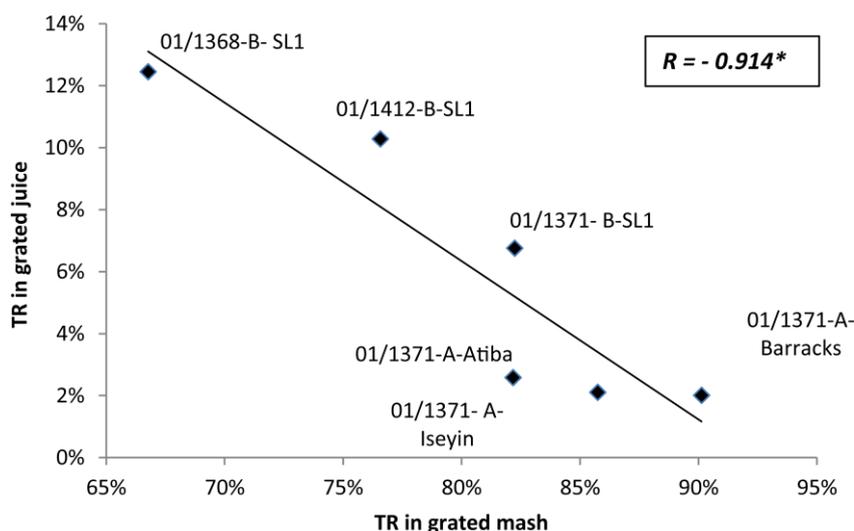


Figura 8 [25]: Relazione tra la ritenzione effettiva del *trans-β-carotene* (TR) nel liquido del mosto grattugiato e nel mosto grattugiato. Media dei triplicati dei campioni trattati. Le correlazioni sono state significative a $p < 0.05$ (test Pearson, a due code). Mancano i valori per tre campioni in SL2.

Per risolvere questo problema, un recente studio di Jaramillo A. M., *et al.* [26], ha indagato la correlazione tra l'espressione di alcuni geni (che esprimono la proteina ORANGE) e l'accumulo di carotenoidi nei genotipi di Cassava di colore giallo, utilizzando i tessuti di manioca *in vitro* come sistema modello.

La proteina ORANGE (OR) ha acquisito crescente interesse negli ultimi anni in quanto ha diverse funzioni legate all'accumulo e alla stabilizzazione dei carotenoidi. Il gene OR non fa parte della via biosintetica dei carotenoidi. Originariamente è stato trovato in un cavolfiore di cagliata arancione (*Brassica oleracea*) mutante con un elevato contenuto di carotenoidi, a cui però non era corrisposto un aumento dell'espressione dei geni OR o PSY (gene per la sintesi del fitoene, precursore nella biosintesi dei carotenoidi). Si pensa che la proteina OR induca la differenziazione dei cromoplasti e la formazione di cristalli di carotenoidi, portando così alla loro conservazione. Inoltre, OR interagisce fisicamente con PSY portando alla regolazione post-traslazionale di questa proteina e alla co-regolazione reciproca con un conseguente aumento della produzione di carotenoidi.[26]

In questo studio, è stato osservato un maggior accumulo di proteina OR e una up-regolazione di PSY1 nei genotipi gialli, il quale sembra indicare che sia OR che il gene PSY1 sono coinvolti nella sintesi di carotenoidi nei genotipi gialli. Inoltre, viene evidenziato come l'espressione eccessiva indipendente e simultanea delle varianti di OR che non sono state testate in questo studio e la loro co-espressione con i geni PSY endogeni potrebbero rivelare nuovi insight nella regolazione della produzione e accumulo di carotenoidi nella manioca.[26]

2.4.1 Consumo di manioca biofortificata in provitamina A in età prescolare

La manioca gialla biofortificata è stata sviluppata per alleviare la carenza di vitamina A. Nello studio di Afolami I., *et al.* [27] è stato esaminato il contributo potenziale della manioca gialla rispetto al totale di apporto di un equivalente attività di retinolo (RAE) sostituendo la manioca bianca con quella gialla tra i bambini prescolari nigeriani.

Ai 176 bambini prescolari sono state somministrate casualmente manioca bianca (WC) o manioca gialla (YC) per 17 settimane. Le valutazioni dell'assunzione dietetica sono state condotte una prima volta durante le 17 settimane e successivamente dopo 1 mese, quando i bambini avevano ripreso la loro dieta abituale. [27]

Variables	During intervention				After intervention				Total (n 158)		Projected intake*	
	Yellow cassava		White cassava		Yellow cassava		White cassava		Median	25th, 75th percentiles	Median	25th, 75th percentiles
	Median	25th, 75th percentiles	Median	25th, 75th percentiles	Median	25th, 75th percentiles	Median	25th, 75th percentiles				
Energy intake												
Low†												
n		20		11		16		12		28		
%		24		14		21		15		18		
<4 years, kJ/d	6301 ^a	5531–7791	6510 ^a	5184–7719	5987 ^a	5778–6381	6004 ^b	5832–6268	6000	5778–6381		
≥4 years, kJ/d	6527 ^a	5430–7021	6933 ^a	6008–7506	6150 ^b	5678–6364	6104 ^b	5870–6372	6113	5824–6372		
Girls, kJ/d	6498 ^a	5627–7050	6933 ^a	6150–7719	6025 ^a	5387–6548	6079 ^a	5983–6309	6079	5879–6431		
Boys, kJ/d	6385 ^a	5485–7138	6590 ^a	5845–7502	6075 ^a	5653–6305	6071 ^a	5766–6372	6075	5661–6314		
RAE intake												
Inadequacy												
n		7		23		38		32		70		
%		9		29		49		40		44		
<4 years, µg/d	563 ^a	374–623	293 ^b	260–392	249 ^b	178–649	370 ^b	170–622	307	177–625	475	313–626
≥4 years, µg/d	469 ^a	328–586	303 ^b	246–388	263 ^b	184–532	350 ^b	186–526	292	186–526	561	358–1017
Girls, µg/d	533 ^a	308–606	310 ^b	260–462	261 ^b	198–528	397 ^b	223–698	373	198–584	531	383–922
Boys, µg/d	542 ^a	350–614	288 ^b	251–363	254 ^b	178–555	300 ^b	162–450	273	163–480	475	318–743

Tabella 4 [27]: Apporto di energia e vitamina A durante e dopo l'intervento (numeri e percentuali; valori mediani e 25^o, 75^o percentili)

Le differenze nell'apporto di RAE tra i gruppi e i momenti temporali sono state confrontate utilizzando un'analisi di regressione a modello misto lineare. Durante l'intervento, l'apporto mediano di RAE era 536 µg/d nel gruppo YC e 301 µg/d nel gruppo WC. YC ha contribuito approssimativamente al 40% del totale di apporto di RAE. Dei bambini, il 9% nel gruppo YC e il 29% nel gruppo WC avevano un apporto di RAE al di sotto del Requisito Medio Stimato. [27]

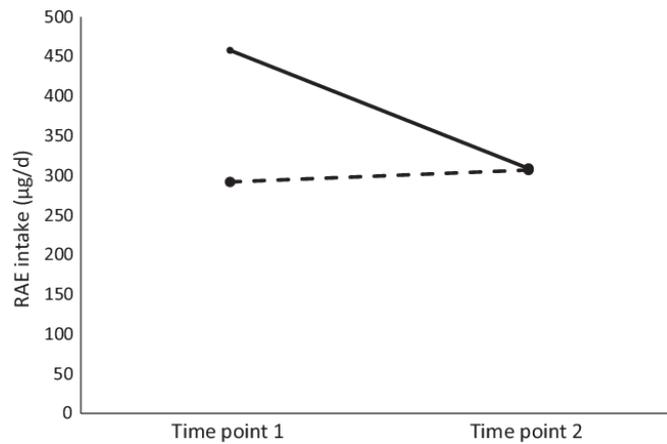


Figura 9 [27]: Stima dell'assunzione di retinolo equivalente (RAE) medio marginale nei gruppi della manioca gialla e della manioca bianca.

Punto 1 = primo ciclo di valutazione dell'assunzione alimentare (durante l'intervento);

punto 2 = secondo ciclo di valutazione dell'assunzione alimentare (dopo l'intervento).

Cassava gialla (linea continua); cassava bianca (linea tratteggiata).

Dopo l'assunzione, l'apporto mediano di RAE era 300 µg/d e non differiva tra i gruppi di intervento. L'effetto di interazione tra gruppo e tempo ha mostrato una diminuzione del 37% dell'apporto di RAE nel gruppo YC dopo l'intervento. Se WC fosse sostituito da YC dopo l'intervento, il potenziale contributo di YC al totale di apporto di RAE sarebbe stato stimato essere approssimativamente del 32%. [27]

YC ha aumentato il totale di apporto di RAE e ha mostrato un'inadeguatezza sostanzialmente inferiore dell'apporto. Pertanto, è risultato essere una buona fonte di provitamina A nelle regioni che consumano manioca. [27]

CAPITOLO 3

Conclusioni e prospettive future

Come evidenziato nei paragrafi precedenti, usando la biofortificazione tramite ingegneria metabolica con tutti gli alimenti (mais, patate dolci, manioca) si è riusciti ad ottenere un elevato incremento di carotenoidi.

Ognuno di questi alimenti presenta però delle criticità: il mais e la manioca perdono buona parte dei carotenoidi integrati nella maggior parte dei processi di lavorazione; le patate biofortificate presentano un rilevante calo di amido al loro interno perdendo così anche parte del loro valore nutrizionale.

Per ovviare a questi problemi è necessario ricercare nuovi metodi di biofortificazione in modo che la quantità di β -carotene introdotto non venga persa durante i processi di lavorazione. Inoltre, potrebbe essere utile integrare nuovi alimenti da biofortificare che non chiedano particolari processi di lavorazione per essere consumati.

L'accettazione dei prodotti biofortificati presenta un ulteriore ostacolo da superare, soprattutto nelle persone più anziane (perché gli alimenti hanno un colore, odore, gusto diverso da quello conosciuto). Questo limite è emerso quando si è provato a studiare l'indice di gradimento delle patate dolci.

Una possibile soluzione è fornire una adeguata informazione spiegando i vantaggi di una alimentazione equilibrata e più completa, così da far capire l'importanza dell'introduzione di questi alimenti, anche se presentano delle caratteristiche diverse, per riuscire a risolvere il problema della VAD. In futuro si spera di riuscire ad immettere nel mercato un numero sempre maggiore di questi prodotti riuscendo a superare le preoccupazioni sociali verso la manipolazione genica e ciò che da essa ne deriva. In piccola parte si sta già riuscendo a sensibilizzare più persone (soprattutto giovani), ma in modo non ancora sufficiente. Si prevede infatti che questa aversità nei confronti delle biotecnologie resterà l'ostacolo principale al loro sviluppo e diffusione.

Un altro limite emerso è che se l'alimento biofortificato non viene integrato ogni giorno, in tempi brevi il nostro organismo torna ai valori di vitamina A precedenti l'inizio della somministrazione (vedi 2.4). Per questo motivo bisogna utilizzare un alimento che possa essere consumato di frequente.

Per risolvere il problema della VAD sono sicuramente necessari ulteriori studi e ulteriori sforzi ma la via da percorrere sembra quella dell'utilizzo delle biotecnologie, in particolare della biofortificazione dei vegetali, e della corretta informazione.

BIBLIOGRAFIA

- [1] K. Pillay, M. Siwela, J. Derera, e F. J. Veldman, «Provitamin A carotenoids in biofortified maize and their retention during processing and preparation of South African maize foods», *J. Food Sci. Technol.*, vol. 51, fasc. 4, pp. 634–644, apr. 2014, doi: 10.1007/s13197-011-0559-x.
- [2] K. F. Ofori, S. Antoniello, M. M. English, e A. N. A. Aryee, «Improving nutrition through biofortification—A systematic review», *Front. Nutr.*, vol. 9, p. 1043655, dic. 2022, doi: 10.3389/fnut.2022.1043655.
- [3] M. Rodriguez-Concepcion e J.-A. Daròs, «Transient expression systems to rewire plant carotenoid metabolism», *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 66, p. 102190, apr. 2022, doi: 10.1016/j.pbi.2022.102190.
- [4] L. Morelli e M. Rodriguez-Concepcion, «Open avenues for carotenoid biofortification of plant tissues», *Plant Commun.*, vol. 4, fasc. 1, p. 100466, gen. 2023, doi: 10.1016/j.xplc.2022.100466.
- [5] M. Eggersdorfer e A. Wyss, «Carotenoids in human nutrition and health», *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 652, pp. 18–26, ago. 2018, doi: 10.1016/j.abb.2018.06.001.
- [6] C. D’Errico, «Vitamina A», *BioPills*, 27 novembre 2017. <https://www.biopills.net/vitamina-a/> (consultato 25 febbraio 2023).
- [7] «Vitamina A (retinolo)», *Humanitas*. <https://www.humanitas.it/enciclopedia/vitamine/vitamina-a-retinolo/> (consultato 11 febbraio 2023).
- [8] Staff, «Beta Carotene - Farmaco Naturale», *ARTOI*, 3 luglio 2011. <https://www.artoi.it/beta-carotene/> (consultato 21 febbraio 2023).
- [9] S. Zhai, X. Xia, e Z. He, «Carotenoids in Staple Cereals: Metabolism, Regulation, and Genetic Manipulation», *Front. Plant Sci.*, vol. 7, ago. 2016, doi: 10.3389/fpls.2016.01197.
- [10] P. K. Burkhardt *et al.*, «Transgenic rice (*Oryza sativa*) endosperm expressing daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) phytoene synthase accumulates phytoene, a key intermediate of provitamin A biosynthesis», *Plant J.*, vol. 11, fasc. 5, pp. 1071–1078, 1997, doi: 10.1046/j.1365-313X.1997.11051071.x.
- [11] C. Bai *et al.*, «Bottlenecks in carotenoid biosynthesis and accumulation in rice endosperm are influenced by the precursor–product balance», *Plant Biotechnol. J.*, vol. 14, fasc. 1, pp. 195–205, 2016, doi: 10.1111/pbi.12373.
- [12] K. Ashokkumar, M. Govindaraj, A. Karthikeyan, V. G. Shobhana, e T. D. Warkentin, «Genomics-Integrated Breeding for Carotenoids and Foliates in Staple Cereal Grains to Reduce Malnutrition», *Front. Genet.*, vol. 11, p. 414, mag. 2020, doi: 10.3389/fgene.2020.00414.
- [13] J. Tan *et al.*, «The screening of rice germplasm, including those transgenic rice lines which accumulate β -carotene in their polished seeds, for their carotenoid profile», *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 40, fasc. 5, pp. 563–569, mag. 2005.
- [14] H. E. Bouis e R. M. Welch, «Biofortification—A Sustainable Agricultural Strategy for Reducing Micronutrient Malnutrition in the Global South», *Crop Sci.*, vol. 50, fasc. S1, p. S-20-S-32, 2010, doi: 10.2135/cropsci2009.09.0531.
- [15] M. Zuma, U. Kolanisi, e A. Modi, «The Potential of Integrating Provitamin A-Biofortified Maize in Smallholder Farming Systems to Reduce Malnourishment in South Africa», *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 15, fasc. 4, p. 805, apr. 2018, doi: 10.3390/ijerph15040805.

- [16] «Vitamin A Orange Sweet Potato», *HarvestPlus*.
<https://www.harvestplus.org/crop/vitamin-a-sweet-potato/> (consultato 25 febbraio 2023).
- [17] M. Drapal, C. Gerrish, e P. D. Fraser, «Changes in carbon allocation and subplastidal amyloplast structures of specialised Ipomoea batatas (sweet potato) storage root phenotypes», *Phytochemistry*, vol. 203, p. 113409, nov. 2022, doi: 10.1016/j.phytochem.2022.113409.
- [18] S. Tumwegamire *et al.*, «Evaluation of Dry Matter, Protein, Starch, Sucrose, β -carotene, Iron, Zinc, Calcium, and Magnesium in East African Sweetpotato [Ipomoea batatas (L.) Lam] Germplasm», *HortScience Horts*, vol. 46, fasc. 3, pp. 348–357, 2011, doi: 10.21273/HORTSCI.46.3.348.
- [19] D. C. Gemenet *et al.*, «Quantitative trait loci and differential gene expression analyses reveal the genetic basis for negatively associated β -carotene and starch content in hexaploid sweetpotato [Ipomoea batatas (L.) Lam.]», *Theor. Appl. Genet.*, vol. 133, fasc. 1, pp. 23–36, gen. 2020, doi: 10.1007/s00122-019-03437-7.
- [20] M. Drapal, G. Rossel, B. Heider, e P. D. Fraser, «Metabolic diversity in sweet potato (Ipomoea batatas, Lam.) leaves and storage roots», *Hortic. Res.*, vol. 6, p. 2, gen. 2019, doi: 10.1038/s41438-018-0075-5.
- [21] L. Govender, K. Pillay, M. Siwela, A. T. Modi, e T. Mabhaudhi, «Consumer Perceptions and Acceptability of Traditional Dishes Prepared with Provitamin A-Biofortified Maize and Sweet Potato», *Nutrients*, vol. 11, fasc. 7, p. 1577, lug. 2019, doi: 10.3390/nu11071577.
- [22] A. Codignola, «Cassava o manioca: la pianta del futuro, resiliente alla siccità e alla CO₂», *Il Fatto Alimentare*, 27 novembre 2020. <https://ilfattoalimentare.it/cassava-manioca-pianta.html> (consultato 25 febbraio 2023).
- [23] «Storia e proprietà manioca».
<https://www.tacuinigastrosofici.it/ita/news/moderna/verdure-frutti/Storia-e-proprietà-manioca.html> (consultato 23 febbraio 2023).
- [24] O. M. Lawal, E. F. Talsma, E. Bakker, V. Fogliano, e A. R. Linnemann, «Novel application of biofortified crops: consumer acceptance of pasta from yellow cassava and leafy vegetables», *J. Sci. Food Agric.*, vol. 101, fasc. 14, pp. 6027–6035, nov. 2021, doi: 10.1002/jsfa.11259.
- [25] A. Bechoff, K. I. Tomlins, U. Chijioke, P. Ilona, A. Westby, e E. Boy, «Physical losses could partially explain modest carotenoid retention in dried food products from biofortified cassava», *PLOS ONE*, vol. 13, fasc. 3, p. e0194402, mar. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0194402.
- [26] A. M. Jaramillo *et al.*, «Characterization of cassava ORANGE proteins and their capability to increase provitamin A carotenoids accumulation», *PLOS ONE*, vol. 17, fasc. 1, p. e0262412, gen. 2022, doi: 10.1371/journal.pone.0262412.
- [27] I. Afolami *et al.*, «The contribution of provitamin A biofortified cassava to vitamin A intake in Nigerian pre-schoolchildren», *Br. J. Nutr.*, vol. 126, fasc. 9, pp. 1364–1372, nov. 2021, doi: 10.1017/S0007114521000039.