

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e
Ambiente

Corso di laurea magistrale in Scienze e Tecnologie Alimentari

**Effetto dell'arricchimento alimentare
con semi di canapa (*Cannabis sativa L.*) sulla
qualità delle uova di galline ovaiole**

Relatore

Prof.ssa Angela Trocino

Correlatore

Dott.ssa Marija Bošković Cabrol

Laureanda: **Antonella Latrofa**

Matricola n.:**2062836**

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Indice

Abstract	1
Riassunto	3
Introduzione	6
1. Il mercato delle uova da consumo	6
1.1. Scenario produttivo europeo ed italiano	8
1.2. Legislazione e classificazione delle uova	9
1.3. Andamento della domanda da parte del consumatore	12
2. Le uova (composizione chimica e nutrizionale)	14
2.1. Qualità delle uova	19
2.1.1. Fattori di variazione della qualità delle uova.....	20
2.1.2. Alimentazione delle galline e miglioramento delle proprietà funzionali delle uova	23
3. La canapa	26
4. Obiettivi.....	32
5. Materiali e metodi.....	34
5.1. Struttura di stabulazione	34
5.2. Disegno sperimentale.....	35
5.3. Analisi fisiche e reologiche delle uova.....	37
5.4. Analisi chimiche.....	39
5.5. Analisi sensoriale	41
5.6. Analisi statistica	42
6. Risultati	44
7. Discussione	52
8. Conclusioni.....	56
9. Bibliografia.....	58

Abstract

Increasing global population implies a growing demand for animal products such as meat, milk and eggs. However, this leads to increased pressure on natural resources for the production of animal feed raw materials, which compete with human food resources. Therefore, there is a growing interest in finding alternative and sustainable protein sources for animal feed.

In Italy the egg market, despite various adversities that have occurred in recent periods, has guaranteed national needs, succeeding in the goal of producing safe food for the end consumer. Over the past 40 years, egg consumption has tripled, and consequently so has its demand, a result of increased consumer awareness and knowledge about their nutritional value. Eggs, in fact, are perceived by consumers as a complete food, rich in high biological value protein, low in cost and with high nutritional value. Although there has been misinformation in the past regarding the association between egg consumption and increased cholesterol in humans, in addition to traditional table eggs, a new profitable segment has been added to the egg market in recent years, which has enabled the growth in demand for eggs and egg products. This segment refers to eggs enriched with nutrients, specifically omega-3 fatty acids, resulting in products with greater functional properties: so-called '*omega-3 enriched eggs*' or '*designer eggs*'; mainly affecting lipid characteristics, toward which there has long been great attention in correlation with cardiovascular disease.

With this in mind, the present thesis evaluated the effect of the dietary supplementation with whole hemp (*Cannabis sativa L.*) seeds on the quality and nutritional value of eggs. For this purpose, 1800 HyLine Brown laying hens aged 36 to 40 weeks were used. The animals were placed in an experimental aviary divided into 8 pens. Hemp seeds (10% inclusion level of the daily feed intake), from a mixture of the two *cultivars* Felina 32 and Futura 75 were distributed daily in circular feeders (two pens) or on the litter (two pens). All hens (four enriched pens and four control pens without hemp seed enrichment) were fed a commercial diet of soybean meal and corn *ad libitum*. A total of 480 eggs (60 per pen) were collected at two different times, after 14 and 28 days of enrichment with hemp seeds. On average of the two samplings, enrichment with whole hemp seeds did not bring about any changes on physical, rheological and nutritional quality of eggs ($P > 0.05$),

except for the increase of L* index and yolk pH ($P < 0.001$) and of albumen pH ($P < 0.05$). On the contrary, such enrichment led to a change in the lipid composition of the yolk, with a reduction in total saturated ($P < 0.001$) and monounsaturated ($P < 0.05$) fatty acids, and an increase in total polyunsaturated fatty acids, especially those of the omega-3 ($P < 0.001$) and omega-6 ($P < 0.05$) series.

Sensory analysis conducted on hard-boiled eggs showed that 46% of the tasters detected the difference between the two eggs coming from hens enriched or not enriched with hemp seeds, with no preference found between the two samples ($P > 0.05$).

In conclusion, enrichment with whole hemp seeds for 10% of the daily feed intake of laying hens did not result in any negative effects on egg quality, bringing an increase in the n-3 fatty acids of the yolk after 4 weeks of experimentation without any influence on consumers' preference.

Riassunto

L'aumento della popolazione globale implica una crescente richiesta di prodotti di origine animale come carne, latte e uova. Tuttavia, questo porta ad una maggiore pressione sulle risorse naturali per la produzione di materie prime dei mangimi per animali, che entrano in competizione con le risorse alimentari umane. Pertanto, c'è un interesse in crescita nella ricerca di fonti proteiche alternative e sostenibili per l'alimentazione animale.

A livello italiano, la produzione di uova ha garantito il fabbisogno nazionale, riuscendo nell'obiettivo di produrre alimenti sicuri per il consumatore finale. Negli ultimi 40 anni il consumo di uova è triplicato, e di conseguenza la sua domanda, risultato di una maggiore consapevolezza e conoscenza da parte del consumatore riguardo al loro valore nutrizionale. Le uova sono percepite dal consumatore come un alimento completo, ricco di proteine ad alto valore biologico, a basso costo e con elevato valore nutrizionale. Nonostante in passato ci sia stata l'associazione fra consumo di uova e incremento del colesterolo nell'uomo, oltre alle tradizionali uova da tavola, negli ultimi anni si è aggiunto al mercato delle uova un nuovo segmento redditizio, che ha permesso la crescita della domanda di uova e prodotti derivati. Tale segmento si riferisce a uova arricchite con nutrienti, nello specifico acidi grassi omega-3, ottenendo prodotti con maggiori proprietà funzionali: le cosiddette 'uova arricchite con omega-3' o 'uova di design'; incidendo principalmente sulle caratteristiche dei lipidi, verso cui da tempo c'è grande attenzione in correlazione alle malattie cardiovascolari.

Premesso ciò, l'attività sperimentale del seguente elaborato ha avuto come scopo la valutazione dell'effetto dell'integrazione alimentare con semi di canapa interi (*Cannabis sativa L.*), su qualità e valore nutrizionale delle uova. A questo scopo sono state utilizzate 1800 galline ovaiole di razza HyLine Brown di età compresa tra le 36 e 40 settimane. Gli animali sono stati collocati in un aviario sperimentale suddiviso in 8 recinti. I semi di canapa (livello di inclusione del 10% rispetto al fabbisogno giornaliero), di una miscela delle due *cultivar* Felina 32 e Futura 75 sono stati distribuiti giornalmente in mangiatoie circolari (due recinti) e sparsi sulla lettiera (due recinti). Tutti gli animali (4 recinti con arricchimento e 4 recinti senza arricchimento con semi di canapa) sono stati alimentati con una dieta commerciale a base di farina di soia e mais ad *libitum*. Un totale di 480 uova (60 per recinto) è stato raccolto in due momenti differenti, dopo 14 e 28 giorni di

integrazione con la canapa. In media, l'arricchimento con semi di canapa interi non ha modificato le caratteristiche qualitative fisiche, reologiche e nutrizionali delle uova ($P > 0,05$), con l'eccezione dell'aumento dell'indice L^* e del pH del tuorlo ($P < 0,001$) e del pH dell'albume ($P < 0,05$). Al contrario, tale arricchimento ha modificato il profilo acido del grasso del tuorlo, con una riduzione degli acidi grassi saturi ($P < 0,001$) e monoinsaturi ($P < 0,05$), ed un incremento degli acidi grassi polinsaturi, soprattutto quelli della serie omega-3 ($P < 0,001$) ed omega-6 ($P < 0,05$), rispetto alle uova di controllo che non avevano ricevuto integrazione con i semi di canapa.

Dall'analisi sensoriale condotta su uova sode è risultato che il 46% degli assaggiatori ha rilevato la differenza tra le uova di gallina che avevano ricevuto integrazione e quelle che non avevano ricevuto l'integrazione, senza nessuna preferenza tra le uova dei due gruppi ($P > 0,05$).

In conclusione, l'arricchimento con semi di canapa interi al 10% del consumo giornaliero non ha modificato la qualità delle uova e ha modificato la composizione degli acidi grassi del profilo lipidico del tuorlo dopo 4 settimane di integrazione senza alcuna influenza sulla preferenza dei consumatori.

Introduzione

1. Il mercato delle uova da consumo

Secondo quanto riportato nella recente relazione annuale di Unaitalia (Unaitalia, 2023), seppur il settore delle carni avicole e quello delle uova da consumo siano un'eccellenza Made in Italy, sta subendo quelle che sono le ripercussioni degli avvenimenti accaduti a livello mondiale negli ultimi periodi.

Nel 2022, nonostante le diverse avversità - tra cui il rincaro dei costi energetici e delle materie prime, i problemi sanitari dovuti all'espandersi dell'influenza aviaria, le diverse tensioni geopolitiche e la sempre più presente ed evidente emergenza climatica - , la filiera avicola ha comunque garantito quello che è il fabbisogno nazionale, riuscendo nell'obiettivo di produrre alimenti sicuri per il consumatore finale totalizzando un fatturato pari a 7.350 milioni di €, di cui 2000 milioni sono solo del settore uova.

In particolare, per quanto riguarda il settore delle uova, la sua produzione ha avuto un lungo periodo di crescita continuo dal 2000 al 2019, come si può vedere in Figura 1.1, con un assestamento nel 2021 (ultimo anno con dati disponibili) intorno ad un valore pari ad 84,6 milioni di tonnellate rispetto agli 87,1 del 2020 e ai 70,9 del 2018 (Gautron et al., 2021).

Tra i principali produttori di uova al mondo la Cina risulta essere al primo posto, contando circa un terzo del mercato globale. Dati recenti sul consumo medio mondiale riportano un valore di 180 uova a persona per anno, con un picco per il Giappone con 320 uova pro-capite annui, quasi una al giorno.

Il consumo mondiale di tale alimento nei Paesi in via di sviluppo è destinato ad aumentare sia per l'ottimo apporto proteico che per l'eccellente rapporto qualità-prezzo; tenendo conto anche dell'aspetto etico visto l'attuale calo dei consumi dei prodotti di origine animale, quali carne e formaggi, le uova vengono ampiamente utilizzate anche dai vegetariani. Come già citato in precedenza, diversi sono gli avvenimenti che stanno incidendo sull'attuale mercato mondiale delle uova. Tra questi, l'ultimo è stato il conflitto Russia-Ucraina (iniziato nel febbraio 2022). Tale conflitto ha avuto ripercussioni su diversi aspetti, ma per lo più relativi ai costi energetici e delle materie prime, come si può vedere in Figura 1.2.

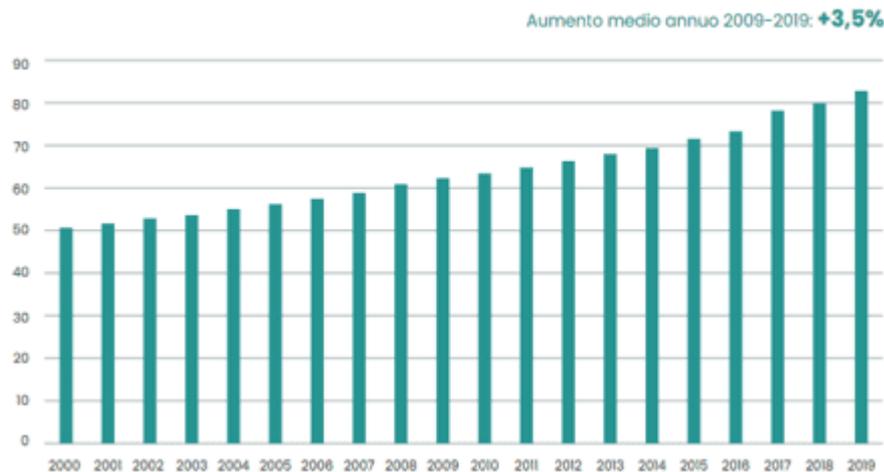


Figura 1.1. *Produzione mondiale di uova (milioni di tonnellate) (Unaitalia, 2023)*

Infatti, c'è stato un repentino aumento dei prezzi di mais ed orzo, materie prime di primaria importanza nella dieta delle ovaiole. I prezzi di vendita attuali delle uova non permettono di coprire quelli che sono i costi di produzione; l'indice della ragione di scambio, che definisce la relazione attraverso la quale avviene lo scambio tra due beni indicando il prezzo di un bene in termini dell'altro, in questo caso rappresentato dal rapporto tra i costi delle uova (comprensivi di energia necessaria alla produzione e costi dei mangimi) ed il prezzo di vendita delle uova, come si può vedere in Figura 1.3, è andato in discesa da fine 2021, non riscontrando una compensazione in termini di marginalità, abbassandosi poi ulteriormente nella prima parte del 2022 (ISMEA, 2022).

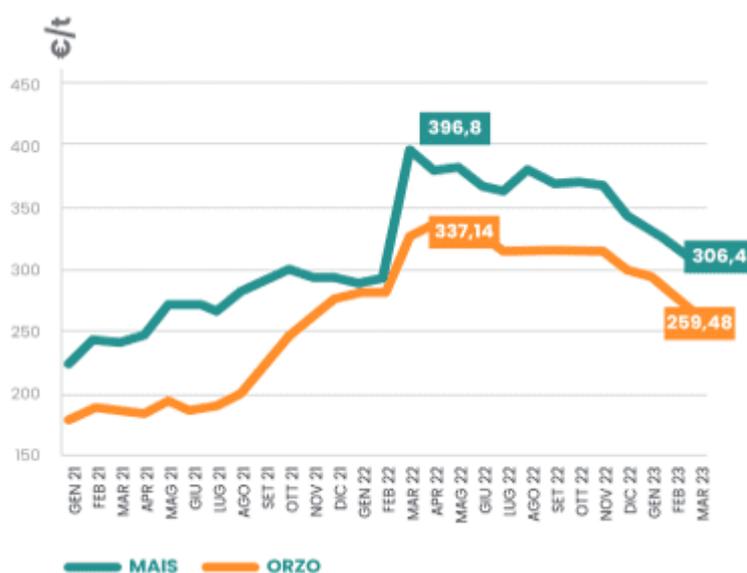


Figura 1.2. *Andamento dei prezzi di mais ed orzo (Unaitalia, 2023)*

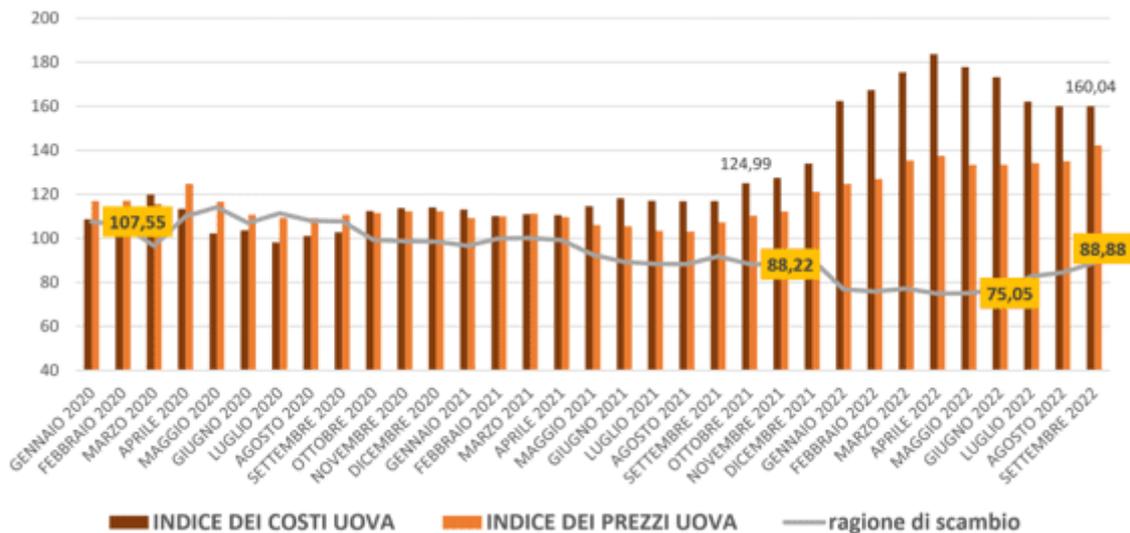


Figura 1.3. *Indice della ragione di scambio della filiera uova (ISMEA, 2022)*

1.1. Scenario produttivo europeo ed italiano

Nel corso del 2022, rispetto all'anno precedente, è stata registrata una riduzione del 3,4% nella produzione complessiva di uova all'interno degli Stati membri dell'Unione Europea, raggiungendo oltre 6,8 milioni di tonnellate. Mettendo a confronto il 2023 rispetto al 2022 si è verificato un incremento di circa l'1,2%.

In tale contesto, l'Italia ha confermato la sua posizione come quarto maggior produttore all'interno dell'Unione europea, preceduta da Germania, Francia e Spagna. All'interno del mercato, il numero di galline ovaiole ha raggiunto 380,1 milioni, allevate con vari sistemi di stabulazione (Unaitalia, 2023).

Riguardo l'andamento economico nel mercato, l'evoluzione settimanale del prezzo medio delle uova di categoria A ha subito un incremento del 17,2% nel 2022, seguito da un calo del 9,6% nel 2023. Nel contesto globale, infine, l'ultimo prezzo fissato alla data del 24 agosto 2023 è di 206,84 €/100 kg.

La filiera delle uova in Italia conta circa 40,5 milioni di ovaiole in 1724 allevamenti professionali, di cui il 75% è situato al Nord, e di questi 1/4 è in Veneto.

Con un indice di penetrazione del 95%, tra i più alti rilevati (ISMEA, 2022), la situazione italiana vede consumi in crescita contrapposti ad una produzione in calo. L'Italia ha prodotto 11,8 miliardi di uova con un decremento del 2,5% rispetto al 2021, mantenendo comunque un buon tasso di autoapprovvigionamento nel settore, pari all'87,4%.

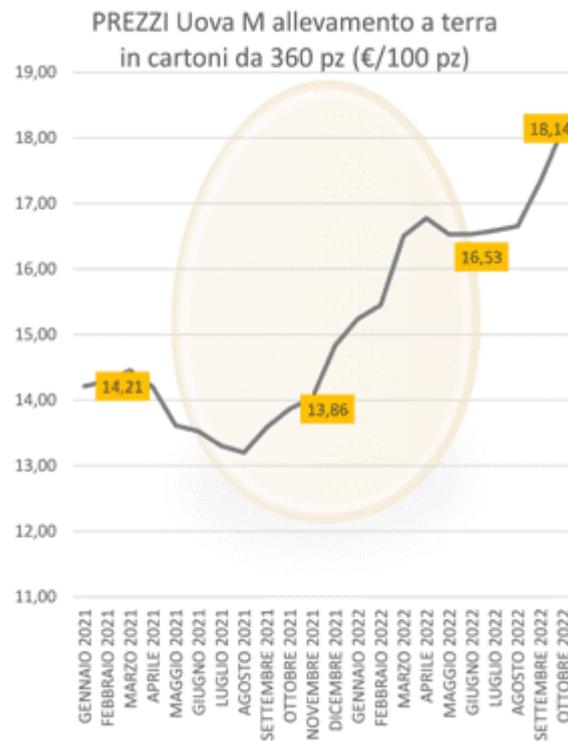


Figura 1.4. *Prezzi del mercato delle uova allevate a terra (ISMEA, 2022)*

Tenendo in considerazione il bilancio tra import ed export, c'è stato un consumo superiore ai 13 miliardi di uova (+7,0% rispetto al 2021), corrispondente a circa 227 uova pro-capite, di cui il 68% è consumato a livello casalingo ed il 32% a livello industriale (Unaitalia, 2023).

Seguendo l'andamento dei prezzi delle materie prime e dei costi energetici, il prezzo delle uova, nello specifico quelle allevate a terra, ha subito un aumento del 58% rispetto al 2021 (Figura 1.4), con un prezzo pari a 18,14 €/100 pz, corrispondenti a 0,18 €/pz (ISMEA, 2022).

1.2. Legislazione e classificazione delle uova

La normativa che definisce le caratteristiche di vendita delle uova da consumo nell'Unione Europea (UE) è il Regolamento (CE) n. 589/2008 relativo alle *norme di commercializzazione applicabili alle uova*, in attuazione del Reg. (CE) n. 1234/2007, il quale stabilisce i requisiti minimi che devono soddisfare le uova per poter essere commercializzate in Europa. Ad oggi quest'ultimo regolamento è stato abrogato e

sostituito dal Reg. (UE) n. 1308/2013 riguardante *l'organizzazione comune dei mercati dei prodotti agricoli*, di cui fanno parte le uova di gallina appartenenti alla specie *Gallus gallus*.

Tali Regolamenti sono stati stilati proprio per determinare le caratteristiche qualitative delle uova, in particolare di quelle di categoria A, per poter così garantire al consumatore finale l'acquisto di un prodotto con standard qualitativi elevati.

La legislazione europea classifica le uova in differenti categorie direttamente correlate a caratteristiche quali freschezza e igiene.

La classificazione commerciale, l'imballaggio e l'etichettatura delle uova vengono effettuati al momento del confezionamento, che avviene o direttamente presso le aziende produttrici o presso centri autorizzati di imballaggio.

La principale classificazione delle uova da consumo secondo le caratteristiche di qualità è la seguente:

- **Categoria A:** uova non lavate, né refrigerate o sottoposte a trattamenti di conservazione. Inoltre, possono essere apposte le diciture «extra» o «extra fresche» come indicazione supplementare della qualità sugli imballaggi, fino al settimo giorno dalla data di confezionamento o fino al nono giorno successivo alla deposizione.

Le uova appartenenti a questa categoria presentano condizioni quali guscio e cuticola integri, puliti e di forma normale; camera d'aria con altezza non superiore ai 6 mm e nel caso di quelle classificate con la dicitura «extra» non superiore ai 4 mm; l'aspetto dell'albume deve essere chiaro e traslucido, mentre il tuorlo deve essere visibile tramite speratura come leggera ombratura, senza contorni apparenti; ed infine non vi deve essere presenza di corpi estranei o odori anomali (Gautron et al., 2021).

- **Categoria B:** uova di seconda qualità, che eventualmente possono essere lavate, refrigerate e conservate. Sono uova di categoria A che non possiedono più le caratteristiche idonee per essere tali, vengono destinate esclusivamente all'industria alimentare e non alimentare per la formulazione di ovoprodotti o preparati a base di uova. Vengono declassate poiché possono presentare lievi difetti di colorazione o macchie sul guscio, retrocedendo così alla categoria

inferiore mantenendo comunque intatto l'aspetto igienico-sanitario per una sicurezza all'uso per i consumatori.

Le uova di categoria A, inoltre, vengono suddivise ulteriormente in classi di peso:

- **XL — grandissime:** peso pari o superiore a 73 g;
- **L — grandi:** peso pari o superiore a 63 g e inferiore a 73 g;
- **M — medie:** peso pari o superiore a 53 g e inferiore a 63 g;
- **S — piccole:** peso inferiore a 53 g.

Le uova da consumo possono essere classificate ulteriormente in base al sistema di allevamento delle ovaiole. Vengono definite a tal proposito tre categorie:

- **allevamento in gabbie:** sistema di allevamento più comune per le galline ovaiole tramite gabbie poste in batteria, che dal 2012 hanno subito modifiche di adeguamento sostituendole in gabbie arricchite per conformarsi alla Direttiva 1999/74/CE del consiglio dell'Unione Europea. I volatili devono essere alloggiati in gabbie di almeno 2000 cm²; questa tipologia di gabbie deve fornire una superficie disponibile di almeno 750 cm² per capo, di cui 600 cm² con un'altezza di 45 cm, con nidi separati, 15 cm di posatoio e 12 cm di mangiatoia per gallina, un'area per grattarsi, beccare e che serve per il bagno di polvere, con aggiunta di un dispositivo per accorcicare gli artigli (Gautron et al., 2021; Lordelo et al., 2017).
- **allevamento a terra:** sistema di allevamento di galline allevate in aviario o a terra con 30.000 galline mediamente per stabilimento.
- **allevamento all'aperto:** sistema di allevamento di galline (numerosità pari a 30.000) allevate in aviario o a terra con possibilità di uscita all'esterno, in un recinto all'aperto (free-range) con un'area di almeno 4 m² per gallina (cioè, 12 ettari di area di allevamento per un edificio con 30.000 galline) (Gautron et al., 2021).

A questi sistemi se ne aggiunge un ultimo, quello **biologico**. Si tratta di un sistema di allevamento all'aperto con galline alimentate con mangimi al 100% di tipo biologico costituiti per almeno il 65% da cereali, privi di organismi geneticamente modificati (OGM) e additivi sintetici. L'allevamento deve essere composto da un massimo di capi di 6.000, con non più di 3.000 per stabilimento, una densità massima di 6 galline/m² all'interno dell'edificio e l'area esterna di almeno 4 m²/capo con rotazione tra due aree differenti ogni 2 anni (Gautron et al., 2021; Lordelo et al., 2017).

Sempre secondo la distinzione dei vari sistemi di allevamento è stata definita una classificazione numerica, stampigliata sul guscio delle uova, corrispondente a:

- **0:** allevamento biologico
- **1:** allevamento all'aperto
- **2:** allevamento a terra
- **3:** allevamento in gabbie

Facendo sempre fede alla legislazione europea citata in precedenza, tale sistema di identificazione tramite codice numerico è stato predisposto per garantire ai consumatori una migliore ricezione di informazioni accurate sulla provenienza delle uova al momento dell'acquisto (Gautron et al., 2021).

1.3. Andamento della domanda da parte del consumatore

In tutto il mondo il consumo di prodotti di origine animale, quali carne, latte e uova, è in crescita, ciò è dovuto a diversi fattori. Primo tra tutti è il continuo incremento della popolazione globale. Infatti, si prevede che entro il 2050 si arrivi ad un totale di 10 miliardi di persone circa rispetto ai 7,7 attuali. Altri fattori poi sono l'aumento del livello dei redditi medi e dell'urbanizzazione (Bailoni et al., 2021; FAO, 2018).

Negli ultimi 40 anni, il consumo di uova è triplicato, e di conseguenza, la domanda di tale alimento è aumentata. Questo incremento è il risultato della crescente consapevolezza e conoscenza da parte dei consumatori riguardo al loro valore nutrizionale. Inoltre, le modalità di produzione negli ultimi 15 anni hanno subito variazioni significative, adattandosi sempre più all'attuale interesse per il benessere animale e alle modifiche delle normative europee. Questi cambiamenti hanno portato ad un rapido aumento delle aspettative dei consumatori in termini di qualità del prodotto (Adeoye et al., 2023; Gautron et al., 2021).

Le uova sono percepite dai consumatori generalmente come un alimento completo di origine animale, conveniente, a basso costo e con alto valore nutrizionale e che apporta un ottimo quantitativo di proteine. In passato, in particolare negli anni '80, è stata fatta disinformazione riguardo all'associazione fra consumo di uovo e incremento di colesterolo nell'uomo (Sirri e Meluzzi, 2011).

Oltre alle tradizionali uova da tavola, negli ultimi periodi, emerge un segmento redditizio

aggiuntivo, che non va a sostituire quello esistente, bensì genera un aumento supplementare della domanda di uova e dei relativi prodotti derivati. Nello specifico ci si riferisce alla produzione di uova arricchite con nutrienti, quali gli acidi grassi omega-3, vitamina E, xantofille, il cui arricchimento è ottenuto con l'introduzione nella dieta delle galline ovaiole. Attualmente tale produzione in termini numerici presenta un aumento del 5% rispetto alla produzione delle uova da consumo tradizionali. Il consumo di uova, quindi, risulta essere in continua crescita soprattutto nei Paesi in via di sviluppo (Leeson e Summers, 2012).

2. Le uova (composizione chimica e nutrizionale)

Le uova da consumo sono state un alimento base per la dieta umana per millenni, ampiamente riconosciute e apprezzate dai consumatori in tutto il mondo per la loro convenienza e ricchezza in nutrienti, intrinsecamente complete di tutti gli elementi essenziali per il sostentamento della vita e quindi preziose anche per l'alimentazione umana, contengono tutte le componenti nutrizionali necessarie e perfettamente bilanciate per il completo sviluppo di un essere vivente, quale l'embrione. Le uova sono comunemente considerate un'eccellente fonte di proteine ad elevato valore biologico, lipidi e vitamine, tra cui le liposolubili (ad esempio le vitamine A, D ed E) e le idrosolubili (ad esempio la vitamina B12), tranne la vitamina C che l'animale sintetizza in autonomia. Inoltre, le uova, alimento naturalmente povero di sodio, forniscono importanti micronutrienti, tra cui minerali come iodio, ferro, fosforo e selenio (Adeoye et al., 2023; McNamara, 2013; Sirri e Meluzzi, 2011; Wu, 2014).

Secondo la definizione contenuta all'interno del Regolamento (CE) n. 589/2008 relativo alle *norme di commercializzazione applicabili alle uova*, attualmente in vigore, le uova sono: “le uova in guscio, escluse le uova rotte, le uova incubate e le uova cotte, prodotte da galline della specie *Gallus gallus* e adatte al consumo umano diretto o alla preparazione di prodotti a base di uova”.

Negli ultimi anni, diverse ricerche hanno dimostrato come la complessità della struttura e la funzione dei vari costituenti abbiano implementato sempre più la richiesta di sfruttare maggiormente questa risorsa di origine animale (Li-Chan e Kim, 2008).

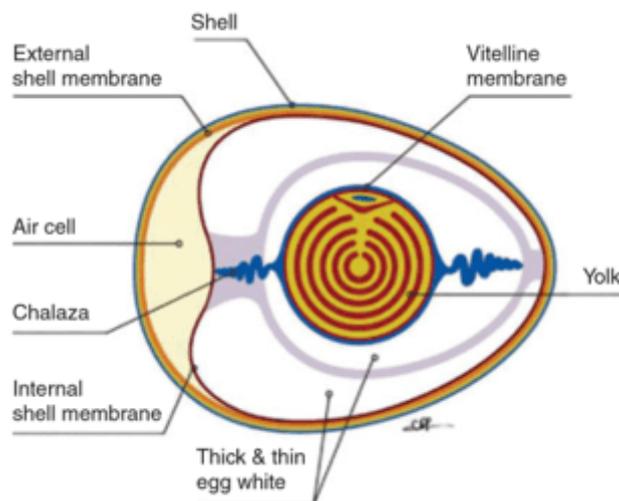


Figura 2.1. Struttura dell'uovo di gallina (Wu, 2014)

Le uova costituiscono una struttura caratterizzata da tre parti principali: il guscio comprensivo della sua membrana; l'albume, noto anche come bianco d'uovo; e il tuorlo. Dal punto di vista strutturale, come mostrato in Figura 2.1, il tuorlo è posto al centro avvolto dall'albume, a sua volta circondato dalle membrane testacee, esterna e interna, ed infine protetto ulteriormente dal guscio. Partendo dall'esterno il guscio è composto dalla cuticola protettiva, strato organico non calcificato spesso circa 10-30 μm , costituito principalmente da proteine, una piccola quantità di carboidrati e lipidi. A seguire c'è lo strato calcificato costituito da sostanze inorganiche per il 95%, in particolare carbonato di calcio, proteine per il 3,3% e 1,6% di umidità. Infine, sotto il guscio si trovano due membrane, una esterna ed una interna con struttura a rete a maglia casuale, ed è proprio tale caratteristica strutturale che permette, in unione alla cuticola esterna, di proteggere l'uovo dalla perdita di umidità e dall'invasione di microrganismi (Li-Chan e Kim, 2008; Wu, 2014). Le due membrane si separano all'estremità ottusa dell'uovo, creando così uno spazio noto come camera d'aria, con un diametro medio di circa 5 mm, che aumenta col proseguire della conservazione. A seguire l'albume, fluido pseudoplastico, viscoso, dal colore giallo paglierino, è una soluzione acquosa al 10% principalmente costituito da proteine e con altri componenti in quantità ridotte (Belitz et al., 2009). È strutturato in quattro strati distinti: un sottile strato esterno adiacente alla membrana interna del guscio, uno strato esterno più denso, un sottile strato interno e uno strato calazifero o interno più spesso (Wu, 2014). Nelle uova fresche, a pochi giorni dalla deposizione, l'albume denso ricopre quello sottile interno e lo strato calazifero (Li-Chan e Kim, 2008). Quest'ultimo, strato fibroso e spiraliforme ricopre completamente il tuorlo e gli consente di mantenere stabile la posizione centrale all'interno dell'uovo (Belitz et al., 2009; Wu, 2014). Infine, il tuorlo, emulsione di grasso e proteine in acqua con circa il 50% di sostanza secca. Sistema complesso di particelle sospese in una soluzione proteica, costituito da strati alternati scuri e chiari disposti in maniera concentrica, di cui la maggior composizione è data dal tuorlo giallo intenso e solo per il 2% dal giallo più chiaro, circondato poi esternamente dalla membrana vitellina (Belitz et al., 2009; Li-Chan e Kim, 2008). Oltre all'aspetto strutturale, come già menzionato, ciò che rende l'uovo una fonte nutrizionale eccezionale è la sua composizione chimica. L'uovo rappresenta, infatti, un concentrato di nutrienti essenziali che, nel loro insieme, contribuiscono in modo significativo al suo valore nutrizionale.

Tabella 2.1. Composizione media dell'uovo di gallina (Belitz et al., 2009)

Frazione	Percentuale sul peso totale	Sostanza secca (%)	Proteine (%)	Grassi (%)	Carboidrati (%)	Minerali (%)
Guscio	10,3	98,4	3,3 ^a			95,1
Albume	56,9	12,1	10,6	0,03	0,9	0,6
Tuorlo	32,8	51,3	16,6	32,6	1,0	1,1

^aComplessi di proteine mucopolisaccaridiche.

Sebbene, la composizione sia parzialmente influenzata da diversi fattori, tra cui ad esempio la razza, l'età, o anche la composizione della dieta fornita all'animale (Adeoye et al., 2023; McNamara, 2013), e quindi con una variabilità elevata, è composto per il 74% da acqua, 12% da proteine, 11% da lipidi, 1% da carboidrati e minerali in tracce (Wu, 2014). Mediamente, un uovo ha un peso di 58-60 grammi, con proporzioni specifiche delle sue tre parti principali, tuorlo, albume e guscio, elencate in Tabella 2.1, e rispettivamente pari al 32,8%, 56,9% e 10,3% (Belitz et al., 2009). Le proteine sono presenti nell'albume e tuorlo, i lipidi invece sono contenuti quasi esclusivamente nel tuorlo.

In particolare, osservando la parte edibile, albume e tuorlo; iniziando dall'albume i suoi costituenti principali sono acqua (90%~) e proteine (10%), seguiti da carboidrati (0,4 - 0,9%), lipidi (0,03%) e ceneri (0,5 - 0,6%) (Wu, 2014). L'albume può quindi essere considerato come un sistema proteico che contiene in soluzione proteine quali, ovoalbumina, ovotransferrina, ovomucoide, lisozima, ovoglobuline (G2 e G3), ovoidinibitore, ovomucina ed altre proteine minori, ognuna con caratteristiche funzionali che potenzialmente contribuiscono alla nutrizione umana (FAO, 2023). L'elevato contenuto dell'ovomucina, glicoproteina solfatata, dona maggiore viscosità all'albume denso rispetto a quello sottile. Per i carboidrati, il glucosio è lo zucchero maggiormente presente sotto forma libera o coniugato alla parte terminale delle glicoproteine. Nell'albume i minerali preponderanti sono zolfo, potassio, sodio e cloro, mentre fosforo, calcio e magnesio sono presenti in quantità inferiori. Infine, le vitamine contenute nell'albume data la sua natura sono quelle idrosolubili, tra cui biotina, niacina e riboflavina (Li-Chan e Kim, 2008). Inoltre, l'albume presenta un intervallo di pH che varia tipicamente da 7,6 a 7,9 appena depresso, salendo a 9,7 durante il periodo di conservazione. Questa variazione di pH è influenzata dal tempo e dalla temperatura di

conservazione, con un aumento più pronunciato registrato dopo 21 giorni di conservazione a temperatura ambiente.

L'altra componente della parte edibile dell'uovo è il tuorlo associato alla membrana vitellina (Wu, 2014). Un grande quantitativo di lipidi (circa 6 g su 60 g di uovo intero) sono concentrati in maniera esclusiva nel tuorlo, ed è proprio tale composizione lipidica su cui ci si è concentrati maggiormente in passato a causa del suo elevato contenuto in colesterolo (Sirri e Meluzzi, 2011).

Il tuorlo, quindi, è così costituito: acqua (51%), proteine (16%) e lipidi (32,6%), poi in minor quantità minerali (1,7%) e carboidrati (0,6%) (Wu, 2014). Mentre, la composizione della membrana vitellina è diversa da quella del tuorlo stesso, infatti, è più ricca in proteine (87%) e carboidrati (10%) piuttosto che di lipidi (3%). In entrambi la variazione della ripartizione dei costituenti è parzialmente influenzata dalla dieta somministrata alle galline ovaiole (Li-Chan e Kim, 2008).

I lipidi contenuti totalmente nel tuorlo (33% circa) sono ripartiti, come si può vedere in Figura 2.2, sotto forma di trigliceridi (63,1%), fosfolipidi (29,7%) e colesterolo libero (4,9%), oltre poi ad altri componenti minori quali esteri del colesterolo e acidi grassi liberi (modificato da Sirri e Meluzzi, 2011).

Quasi il totale dei lipidi è presente sotto forma di complessi lipoproteici con un rapporto complessivo lipidi/proteine di 2:1. A causa della diversità nelle proprietà fisiche queste lipoproteine si suddividono in quelle a bassa densità (LDL) per il 68%, e per il 16% quelle ad alta densità (HDL), poi lipoproteine (10%) e fosfolipine (4%) (Sirri e Meluzzi, 2011).

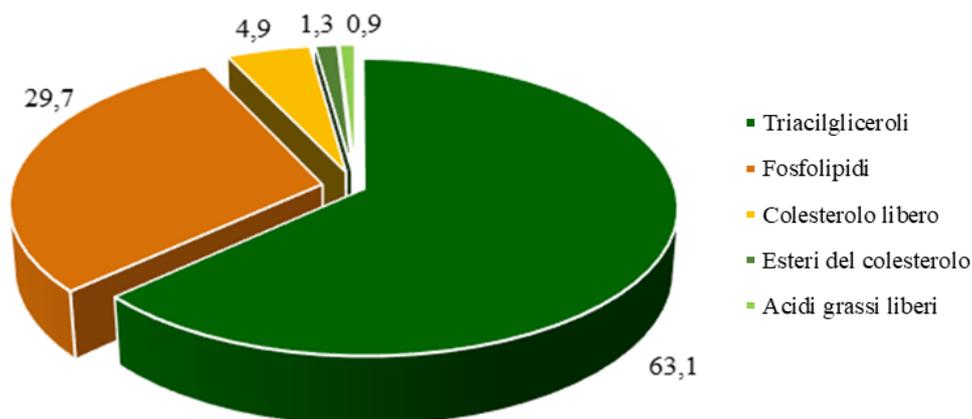


Figura 2.2. *Proporzione dei lipidi (% dei lipidi totali) del tuorlo d'uovo (Sirri e Meluzzi, 2011)*

All'interno del tuorlo le categorie rispetto agli acidi grassi di trigliceridi e fosfolipidi sono gli acidi grassi saturi, monoinsaturi e polinsaturi, ripartiti in modo abbastanza bilanciato. Tra gli acidi grassi saturi si presentano il palmitico con circa il 22-26% e lo stearico con l'8-10% del totale rispettivamente. Dei monoinsaturi, l'acido oleico è tra il 35 e il 46%, seguito dall'acido palmitoleico che costituisce il 2-3%.

Gli acidi grassi polinsaturi (PUFA-Poly-Unsaturated Fatty Acids) sono quelli di maggiore interesse per le loro proprietà salutistiche (Gakhar et al., 2012); il loro contenuto in norma oscilla tra il 14 e il 25%. Si dividono in due famiglie: quella costituita dagli acidi grassi della serie n-6 e quella della serie n-3 che tali acidi differiscono tra di loro per la posizione dell'ultimo doppio legame nella catena di atomi di carbonio. Per la serie omega-6, il principale è l'acido linoleico (LA - C18:2 n-6), che varia dall'11 al 21% del totale, seguito dall'arachidonico (C20:4) con l'1-2%. Per la serie omega-3, il più importante è l'acido α -linolenico (ALA - C18:3 n-3), precursore di acido eicosapentaenoico (EPA - C20:5 n-3), docosapentaenoico (DPA - C22:5 n-3) e docosaesaenoico (DHA - C22:6 n-3).

Un uovo ordinario contiene naturalmente una percentuale maggiore di acidi grassi polinsaturi n-6 e una più bassa di n-3, considerata al normale composizione della dieta che riceve la gallina a base di vegetali. Numerosi studi hanno sostenuto come l'insorgenza di malattie nei paesi d'Occidente sia correlata a quello che è il rapporto n-6/n-3, infatti, al fine di ridurre il rischio di tali malattie croniche si propende verso la diminuzione di tale rapporto sia nelle società occidentali che nei Paesi in via di sviluppo.

Il contenuto di PUFA con un numero di atomi di carbonio superiore a 20 di entrambe le famiglie nel tuorlo può variare notevolmente a seconda della composizione della dieta dell'animale (Sirri e Meluzzi, 2011).

È stato dimostrato come sia possibile modificare il rapporto tra queste due famiglie di acidi grassi arricchendo la dieta dell'animale con acidi grassi polinsaturi specifici (in prevalenza della serie n-3), andando a modificare tale proporzione in quanto l'animale riesce a dirottare l'acido linolenico nell'uovo quando la sua alimentazione ne è ricca.

Infine, per concludere, l'1% della frazione lipidica del tuorlo è rappresentato dalla presenza di carotenoidi, principalmente carotene e xantofille (luteina, criptoxantina e zeaxantina) che donano la caratteristica pigmentazione giallastra del tuorlo, oltre ad essere importanti nutrienti per l'essere umano (Leeson e Summers, 2012).

Se da un lato la presenza di carotenoidi contribuisce ad una percezione positiva del

prodotto, dall'altro la maggiore presenza di colesterolo rispetto agli altri alimenti di origine animale ha comportato una controversia, in particolare riguardo la contribuzione al rischio di malattie coronariche. Tuttavia, molti studi ad oggi non supportano tale ipotesi poiché differenti sono i fattori incidenti sui livelli del colesterolo nel sangue umano (FAO, 2023; Wu, 2014). È stato riscontrato come non siano il consumo di uova ed il colesterolo stesso contenuto in esse a comportare implicazioni significative nell'insorgenza di malattie cardiache nelle persone sane; anzi, quando le uova sono arricchite con acidi grassi polinsaturi, in particolar modo EPA e DHA, la loro assunzione esercita un effetto cardio-protettivo (Sirri e Meluzzi, 2011).

2.1. Qualità delle uova

La qualità in termini generici, come definita da Kramer (1951), riguarda le proprietà di un determinato alimento che influiscono sull'accettazione o sul rifiuto dello stesso da parte del consumatore.

Per quanto riguarda le uova la qualità è caratterizzata da diversi aspetti quali pulizia, freschezza, peso, qualità del guscio e composizione chimica. In generale, per la loro produzione si prendono in considerazione due tipologie di richieste, quella del produttore, che pone attenzione al peso dell'uovo e alla qualità del guscio; e quella del consumatore, che tiene in considerazione la conservabilità, l'aspetto sia esterno che interno, quale colore di guscio e tuorlo, e le caratteristiche sensoriali (Adeoye et al., 2023).

Differenti sono le proprietà caratterizzanti la qualità delle uova che possono essere classificate in sette ambiti principali: sanitario, commerciale, sensoriale, tecnologico, nutrizionale, valore d'uso e valore di immagine.

Andando nello specifico e iniziando dal primo ambito, per valutare e gestire al meglio l'aspetto igienico-sanitario delle uova si considera il rischio di contaminazione da Salmonella, il quale è influenzato dalla tipologia di alloggiamento delle galline, dalla loro densità di allevamento e, soprattutto, dalle pratiche di gestione e biosicurezza degli allevatori. Per l'aspetto commerciale, come già discusso nei precedenti capitoli, si segue la classificazione delle uova secondo caratteristiche di qualità, peso e sistema di allevamento. Sebbene una caratteristica sensoriale di rilevanza a livello commerciale sia il colore del tuorlo, influenzato principalmente dall'assunzione dei carotenoidi attraverso

la dieta dell'animale, la variabilità di tale aspetto, correlata al sistema di allevamento, non influenza le proprietà nutrizionali in maniera significativa. Le proprietà nutrizionali considerano il rapporto albume/tuorlo, dipendente dalla razza e dall'età delle galline allevate, nonché il contenuto in colesterolo, ed infine le variazioni dell'alimentazione degli animali, discusse che influiscono potenzialmente sul contenuto lipidico del tuorlo soprattutto in termini di qualità.

In conclusione, le proprietà d'uso e d'immagine sono impattanti in maniera limitata sull'aspetto nutrizionale e sensoriale delle uova, si contrappongono alle pressioni per la sostenibilità e per il benessere animale che hanno portato ad un'ulteriore segmentazione del mercato (Gautron et al., 2021).

2.1.1. Fattori di variazione della qualità delle uova

Per determinare la qualità delle uova aspetti importanti da considerare sono le loro dimensioni, la composizione nutrizionale interna, la resistenza della membrana vitellina e la qualità del guscio (Galea, 2011; Gerber, 2006). Essendo le uova messe in vendita intere, è proprio il guscio a dare la prima impressione ai consumatori, su cui si basa poi la loro percezione rispetto alla qualità dell'alimento, ponendo attenzione all'integrità del guscio, alla sua consistenza, forma, colore e pulizia (Gerber, 2006).

A definire e modificare la qualità complessiva delle uova vi sono differenti fattori: la razza delle galline ovaiole, l'età e la salute dell'animale, oltre che le condizioni ambientali e di stoccaggio delle uova (Adeoye et al., 2023; Galea, 2011).

I diversi genotipi di galline ovaiole possono mostrare variazioni della qualità del guscio, anche solo a livello di colorazione (bianco o bruno), e delle loro dimensioni (Roberts, 2004), ed è la quantità di pigmento presente nella cuticola a determinare il colore dell'uovo. Stress, età dell'animale ed eventuali malattie possono influire sul colore finale del guscio d'uovo, provocando un'interruzione della capacità di sintesi del pigmento o nella deposizione della cuticola (Gerber, 2006).

Diverse ricerche hanno poi dimostrato come con l'avanzare dell'età dell'animale la qualità delle uova diminuisca. Se da un lato con l'accrescersi della gallina le dimensioni dell'uovo aumentano e la forma varia verso quella rotonda piuttosto che ovoidale (Roberts, 2004), dall'altro lato lo spessore del guscio non aumenta in maniera

proporzionale, poiché le galline hanno una capacità limitata di depositare calcio nel guscio, la stessa quantità di minerale viene distribuita sia in quelle piccole che quelle grandi. Di conseguenza, le uova dalle dimensioni ridotte, avendo il calcio maggiormente concentrato, risultano con un guscio più resistente rispetto a quelle grandi, deposte in età dell'animale avanzata, la cui medesima quantità è però distribuita su una superficie più ampia. Tutto ciò può comportare una maggiore difficoltà nella gestione del prodotto nelle successive fasi di lavorazione (Galea, 2011; Gerber, 2006).

La pulizia del guscio è l'aspetto più facile da controllare per quanto riguarda la qualità delle uova ed una buona gestione dell'allevamento in questo svolge un ruolo importante. Buone pratiche di gestione, quali frequente raccolta delle uova, periodica pulizia dei nidi e delle gabbie, oltre che l'aspetto nutrizionale, inclusa la gestione del peso in base all'età dell'animale e l'illuminazione contribuiscono a ridurre il numero di uova sporche (Gerber, 2006). Anche la salute dell'animale è un fattore di variazione della qualità da tenere bene in considerazione, infatti, diverse sono le malattie che possono compromettere l'aspetto del guscio, causando difetti indiretti quali per esempio rugosità, colore più chiaro o deformità, comportando un declassamento, la non commerciabilità del prodotto e quindi una perdita a livello economico per il produttore (Roberts, 2004).

A differenza del guscio la qualità interna dell'uovo inizia il suo declino appena l'uovo viene deposto. Pertanto, sebbene i fattori legati alla gestione dell'allevamento e alla nutrizione dell'animale giochino un ruolo sulla qualità della composizione interna delle uova, maggiormente significative risultano essere le successive pratiche di gestione nelle fasi di produzione, confezionamento e commercializzazione. Ed è proprio la qualità interna in realtà ad essere rilevante per il consumatore, nonostante sia il guscio a dare le informazioni preliminari al momento dell'acquisto. La composizione interna dell'uovo è influenzata dalla qualità del tuorlo, dalla qualità dell'albume ed in generale dalla qualità complessiva. La qualità del tuorlo è determinata dal colore, dalla consistenza, e dalla presenza di eventuali odori anomali, e tutti questi aspetti sono condizionati da fattori nutrizionali, discussi nei capitoli a seguire. La qualità dell'albume, invece, è determinata dalla consistenza, dall'aspetto e dalle proprietà funzionali. La consistenza viene misurata in termini di Unità Haugh (HU), calcolate dal rapporto tra l'altezza dell'albume e il peso dell'uovo. Essa è influenzata da vari fattori quali: l'età delle galline ovaiole, le HU diminuiscono all'aumentare dell'età; la genetica, per cui alcuni genotipi producono

costantemente uova con albume più sottile; alcune malattie; il tempo di conservazione dell'uovo, man mano che i giorni passano dopo la deposizione l'anidride carbonica (CO₂) viene persa attraverso il guscio, l'albume diventa più alcalino causandone trasparenza e un aumento della frazione acquosa. Inoltre, ulteriore fattore incidente è la temperatura di conservazione, maggiore è e più rapidi saranno i processi di deterioramento (perdita di CO₂ e consistenza). Infine, per la qualità complessiva si considerano le macchie di carne e le macchie di sangue. Le prime sono generalmente associate all'albume piuttosto che al tuorlo, si tratta di pezzi di tessuto dell'animale o a volte macchie di sangue parzialmente decomposte. Quelle di sangue, invece, ritrovate principalmente nel tuorlo, si manifestano quando al rilascio del tuorlo durante il processo di formazione dell'uovo alcuni piccoli vasi sanguigni si rompono all'interno dell'ovaio. Ad incidere sulla presenza di tali macchie possono essere fattori quali: la carenza di vitamina K, che svolge un ruolo importante nella coagulazione del sangue; la genetica, in quanto alcuni ceppi di galline sembrano più predisposti anche se con una bassa incidenza; malattie come l'influenza aviaria; e micotossicosi (Gerber, 2006).

Diversi tipi di allevamento possono poi potenzialmente influire sulla qualità delle uova, sia per la densità di allevamento degli animali che per le modalità di gestione e manutenzione del sistema stesso. Complessivamente, lo stress della gallina e le elevate temperature possono incidere negativamente. Una condizione di stress generale può causare problematiche come uova danneggiate, ritardi nell'ovideposizione e deformità, mentre le elevate temperature riducono l'assunzione di cibo da parte dell'animale e di conseguenza limitano la disponibilità di calcio per la formazione di un guscio di qualità (Roberts, 2004).

L'ultimo aspetto da considerare riguarda la membrana vitellina, la cui resistenza è influenzata da fattori nutrizionali, tra cui il tipo di grasso presente nel mangime. La scelta del grasso influisce sul profilo degli acidi grassi presenti nella membrana, il che a sua volta incide sulla sua permeabilità ed elasticità (Galea, 2011).

Un contributo significativo al miglioramento delle uova è dato da una migliore gestione degli allevamenti, compresi gli aspetti strutturali ed una loro corretta pulizia, comportando una riduzione dell'incidenza di malattie. A contribuire alla qualità del prodotto finale poi è anche un'adeguata gestione nelle successive fasi di produzione e confezionamento. In conclusione, diversi fattori incidono sulla qualità delle uova, sia

interna che esterna (Gerber, 2006; Roberts, 2004).

2.1.2. Alimentazione delle galline e miglioramento delle proprietà funzionali delle uova

Come già accennato nei precedenti capitoli diversi sono i fattori influenti sulla qualità e sulla produzione delle uova e tra questi l'alimentazione ha un notevole effetto sui diversi parametri e di conseguenza sulla salute del consumatore finale (Adeoye et al., 2023; Gerber, 2006; Roberts, 2004).

Le galline ovaiole normalmente ricevono una dieta completa, formulata in modo da fornire all'animale tutti i nutrienti necessari per uno stato di salute e benessere ottimale, ed una massimizzazione nella produzione di uova (Bryden et al., 2021). Manipolando tale dieta, ad esempio, è possibile tenere sotto controllo le dimensioni delle uova limitando quella che è la componente proteica o andando a ridurre in maniera graduale l'apporto energetico durante il periodo di deposizione (Gerber, 2006; Leeson e Summers, 2012). Altro fattore importante, di continua preoccupazione per l'industria delle uova, è la qualità del guscio che può essere tenuta sotto controllo tramite modifiche nelle concentrazioni dietetiche di minerali quali calcio e fosforo, che tramite il loro bilanciamento reciproco contribuiscono a donare maggiore peso e resistenza alla rottura del guscio, motivo per cui bisogna accuratamente monitorare i livelli di tali composti durante le varie fasi di crescita dell'animale (Bryden et al., 2021). Ulteriore fattore modificabile tramite la dieta, che può corrispondere ad una maggiore qualità percepita dell'uovo, riguarda il colore del tuorlo. Tale colorazione è influenzata dall'assunzione di carotenoidi da parte delle galline tramite la dieta, con conseguente attività antiossidante sia per l'animale che per il consumatore a seguito del consumo di uova (Št'astník et al., 2022). Le galline però accumulano maggiormente xantofille rispetto ai caroteni, in particolare luteina e zeaxantina che trasferiscono poi nell'uovo, e sono questi ultimi due composti a dare la caratteristica pigmentazione gialla al tuorlo, molto apprezzata dal consumatore. Data la loro natura, tali composti, sono veicolati nell'organismo e nell'uovo dal contenuto lipidico che ne influenza l'assorbimento (Bryden et al., 2021).

A tal proposito, molti studi nei precedenti anni sono stati effettuati per dimostrare come arricchendo l'alimentazione degli animali, in questo caso galline ovaiole, con acidi grassi

polinsaturi della serie n-3 (PUFA) sia possibile modificare anche la composizione lipidica del tuorlo, mentre il contenuto di colesterolo nelle uova è generalmente stabile e legato alle dimensioni, razza ed età delle galline.

Il fine di tali modifiche è quello di ottenere un prodotto con maggiori proprietà funzionali, le cosiddette ‘uova arricchite con omega-3’ o ‘uova di design’, in grado di apportare benefici a chi le assume incidendo principalmente sulle caratteristiche dei lipidi, verso cui c’è da tempo grande attenzione da parte dei consumatori in correlazione alle malattie cardiovascolari. In particolare, la ricerca ha posto attenzione sul rapporto acidi grassi insaturi : saturi, sottolineando l’effetto positivo di un aumento degli acidi grassi insaturi a lunga catena (PUFA) della serie n-3 rispetto a quella n-6, favorendo l’arricchimento delle uova con n-3 PUFA mediante l’alimentazione delle galline con nuove fonti vegetali e animali ricche di tali acidi grassi (Sirri e Meluzzi, 2011), quali ad esempio semi di lino, olio di pesce, microalghe e farine di insetti, come mostrato dai risultati di alcune sperimentazioni da me riassunti in Tabella 2.2 (Alqazzaz, 2023; Baucells et al., 2000; Caston et al., 1994; Chung, 2023; Corrales-Retana et al., 2021; Jia et al., 2008; Meluzzi et al., 2000; Meluzzi et al., 2001; Sirri et al., 2001).

Tabella 2.2. Concentrazione di n-3 PUFA nel tuorlo (espressi in % sul totale degli acidi grassi) in relazione alle fonti di arricchimento nella dieta delle galline ovaiole

Fonte di n-3 PUFA	Inclusione (%)	ALA	EPA	DPA+DHA	Totale n-3	Riferimento
Semi di lino	5	15 ²	0,3 ²	7,3 ²	22,6 ²	Corrales-Retana et al. 2021
Semi di lino	10	6,79	0,03	2,03	24,96	Caston et al., 1994
Semi di lino	15	420 ¹	8,5 ¹	91,8 ¹	520 ¹	Jia et al., 2008
Olio di pesce	3	13,32 ¹	19,53 ¹	159,73 ¹	192,58 ¹	Meluzzi et al., 2000
Olio di pesce	4	0,4	0,9	3,65	5,06	Baucells et al., 2000
Microalghe (<i>Schizochytrium sp.</i>)	2	1,4 ²	0,43 ²	13 ²	14,7 ²	Sirri et al., 2001
Microalghe (<i>Cryptocodinium cooni</i>)	3	1,2 ²	0,39 ²	10,9 ²	12,6 ²	Meluzzi et al., 2001
Farina di insetto (<i>Hermetia illucens</i>)	1	0,57	0,90	3,18	4,66	Alqazzaz, 2023
Farina di insetto (<i>Ptecticus tenebrifer</i>)	4	0,02	0,07	0,19	0,21	Chung, 2023
Farina di insetto (<i>Hermetia illucens</i>)	5	0,65	0,97	2,36	3,99	Alqazzaz, 2023

¹ mg/uovo; ² espressi come mg/g di tuorlo;

ALA, acido α -linolenico; EPA, acido eicosapentaenoico; DPA+ DHA, acido docosapentaenoico + acido docosaesaenoico;

Pur utilizzando differenti materie prime come fonti di n-3 PUFA per l'arricchimento, tutte le sperimentazioni prese ad esempio, hanno lo stesso obiettivo. Sono stati presi in considerazione i principali acidi grassi della serie n-3, quali l'acido α -linolenico (ALA - C18:3 n-3), l'acido eicosapentaenoico (EPA - C20:5 n-3), la somma dell'acido docosapentaenoico (DPA - C22:5 n-3) con l'acido docosaesaenoico (DHA - C22:6 n-3) ed infine il contenuto totale di n-3.

Nonostante l'utilizzo di fonti differenti, e nel caso di medesime fonti diversi livelli di inclusione, in tutte le sperimentazioni si ottiene un prodotto con un quantitativo superiore di acidi grassi insaturi della serie n-3 rispetto al controllo seppur con un'ampia variabilità. D'altra parte, le proprietà intrinseche di ciascuna materia prima possono incidere anche sulla qualità sensoriale del prodotto finito: ad esempio, i semi di lino hanno un contenuto elevato di ALA, maggiormente suscettibile ai processi di irrancidimento ossidativo durante la conservazione; la farina di insetti a livelli di inclusione troppo elevati potrebbe conferire odori anomali al prodotto finale.

Nonostante le ricerche effettuate, l'immissione nel mercato è ancora limitata, o per lo meno la conoscenza di tale prodotto a livello di marketing è poco diffusa, probabilmente ancora a causa della mancanza di prove definitive ed ufficiali sui loro benefici e per le informazioni limitate fornite ai consumatori (Sirri e Meluzzi, 2011).

3. La canapa

La canapa è una pianta erbacea annuale, ad impollinazione anemofila, originaria dell'Asia centrale. In natura tale coltura si presenta sotto forma sessuale dioica, ma include anche una piccola proporzione di cultivar monoiche. Con una lunga storia di coltivazione, si è diffusa in tutto il mondo fino agli inizi del XX secolo, successivamente la produzione di tale coltura è diminuita (Galasso et al., 2016). Vanta una lunga storia d'uso sia come alimento che come medicina, e sebbene l'inizio preciso dell'utilizzo umano rimanga ancora incerto, esso risale ai primordi della nostra storia. Nonostante la mancanza di prove, i semi di canapa potrebbero essere stati in possesso degli esseri umani già oltre 70.000 anni fa (Phipps e Schluttenhofer, 2022).

La canapa, più generalmente nota come *Cannabis sativa* L., tassonomicamente appartiene alla famiglia delle Cannabaceae, in cui sono compresi dieci generi, dei quali il principale è il Cannabis. All'interno di tale genere si contano circa 120 specie, tra cui maggiormente riconosciute sono tre: *sativa*, *indica* e *ruderalis* (Flajšman e Ačko, 2022).

La natura dicotomica della Cannabis è probabilmente la motivazione principale per cui tale coltura è andata via via in disuso. A partire dal XX secolo è stata differenziata in due categorie distinte: marijuana e canapa. Tale differenziazione è stata effettuata in base a quelle che sono le definizioni legali e l'uso delle colture. In particolare, la marijuana è utilizzata a scopo medico o ricreativo, ed è proprio per quest'ultimo motivo che solitamente prende un'accezione negativa; la canapa, invece, prevede utilizzi a scopo alimentare, nello specifico come alimentazione umana, mangimistica animale ed infine fibra (Phipps e Schluttenhofer, 2022). Nel dicembre 2018, la Food and Drug Administration (FDA) degli Stati Uniti ha valutato ed approvato l'impiego di vari ingredienti alimentari ottenuti a partire dai semi di canapa, quali semi sgusciati, farina e olio, riconoscendoli come generalmente sicuri (Generally Recognised as Safe - GRAS) per il consumo umano. Successivamente, nel febbraio 2021, è stata formalizzata la richiesta per ottenere l'approvazione di prodotti a base di canapa come GRAS destinati all'alimentazione animale, con particolare riferimento al pollame (Coit, 2022).

La differenziazione della canapa (*Cannabis*), tra marijuana e canapa, è dovuta al Δ^9 -tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC), composto psicoattivo, principale principio attivo di tale pianta. A seconda del Paese, i valori ammessi a livello legislativo variano ma devono

rimanere comunque al di sotto di una certa soglia. In particolare, per Canada e Stati Uniti, la canapa ad uso alimentare deve avere un contenuto di $\Delta 9$ -THC inferiore al valore dello 0,03% in peso secco. Per l'Unione Europea, invece, il livello massimo di $\Delta 9$ -THC inizialmente era dello 0,02%; a fine 2020 il Parlamento europeo ha votato a favore dell'aumento di tale livello portandolo allo 0,03%, consentendo l'adeguamento con gli altri Paesi in modo da favorire per le imprese nuove opportunità di mercato, riduzione dei costi e facilità nel commercio.

Contrariamente alla canapa, la marijuana contiene un quantitativo superiore di $\Delta 9$ -THC, ed è proprio questo valore che contribuisce maggiormente a quell'accezione negativa attribuitale, come citato in precedenza (Phipps e Schluttenhofer, 2022).

Innumerevoli sono le cultivar esistenti del genere *Cannabis*, ma a livello legislativo le varietà di *C. sativa L.*, sia dioiche che monoiche, autorizzate per l'uso alimentare sono solo quelle a basso contenuto di THC, che rientrano nei limiti, tra cui le più comuni per la produzione di semi risultano essere Finola, Futura 75, Fedora 17, Carmagnola e Felina 32 (Flajšman e Ačko, 2022).

I semi di canapa hanno suscitato un notevole interesse per l'impiego in alimentazione animale soprattutto in relazione alla loro composizione chimica e nutrizionale. Tale composizione mostra tuttavia un'ampia variabilità tra le diverse cultivar di canapa, in funzione di fattori ambientali (come temperatura, precipitazioni, ecc.), fattori agronomici, oltre che variabilità genetica (Zhao et al., 2022).

Tipicamente, i semi di canapa delle due *cultivar* (Futura 75 e Felina 32), mostrati in Tabella 3.1, hanno un contenuto in estratto etereo del 25-35%, 20-25% di proteine, 20-30% di carboidrati, 27-38% di fibra grezza, vitamine e minerali tra il 4-6% (fosforo, potassio, magnesio, zolfo e calcio) (Galasso et al., 2016). I semi di canapa, quindi, hanno una composizione nutrizionale vantaggiosa essendo una ricca fonte di proteine, lipidi, minerali e vitamine (Flajšman e Ačko, 2022).

La frazione lipidica, e quindi l'olio dei semi è composto per oltre l'80% da acidi grassi polinsaturi (PUFA), in particolare due acidi grassi essenziali quali l'acido linoleico e l'acido α -linolenico, con un rapporto n6/n3 compreso tra 2,5/3:1, considerato benefico per l'uomo (Callaway, 2004; Galasso et al., 2016). Oltre a questi acidi grassi principali, l'olio di canapa contiene anche prodotti metabolici come l'acido γ -linolenico (GLA – C18:3 n-6) e l'acido stearidonico (SDA – C18:4 n-3). Questa combinazione offre alla

canapa un profilo acidico completo, contribuendo a fornire significativi benefici per la salute umana, rendendola unica tra le colture industriali. Sempre in riferimento alle due *cultivar* Futura 75 e Felina 32, il contenuto medio di acidi grassi all'interno dei semi è mostrato in Tabella 3.2. Sono per l'appunto l'acido stearidonico, ed in particolare, l'acido γ -linolenico a caratterizzare l'olio di semi di canapa. Tuttavia, è importante considerare come, a causa dell'elevato rapporto di acidi grassi insaturi contenuti al suo interno l'olio di semi di canapa sia molto suscettibile all'irrancidimento ossidativo durante la conservazione (Rabrenović e Vujasinović, 2022).

I semi di canapa oltre che un'eccellente fonte di acidi grassi sono anche fonte di proteine, le edestine e le albumine. Tali gruppi di proteine sono caratterizzati da un profilo amminoacidico ottimale paragonabile a quello del bianco d'uovo o della soia (Pihlanto et al., 2022). I carboidrati, che nella canapa sono costituiti da amido, solidi solubili, cellulosa ed emicellulosa, sono contenuti in quantità tali che si può concludere come tali semi siano una fonte a basso contenuto di amido e ricca in fibre.

All'interno dei semi di canapa si osserva anche una buona composizione in minerali, con macroelementi (P, K, Mg, Ca e Na) e microelementi (Fe, Mn, Zn, Cu e Cd) dei quali è riconosciuta la funzione in ruoli fisiologici e strutturali, coinvolti in molti processi biologici della salute umana (Zhao et al., 2022).

Infine, per concludere, i semi di canapa e il relativo olio sono vantaggiosi per le galline ovaiole grazie all'elevato contenuto di luteina, principale carotenoide della canapa e del tuorlo d'uovo. L'olio di canapa, ricco in luteina, offre un'efficace azione antiossidante sia per le galline che per i consumatori (Št'astník et al., 2022).

Tabella 3.1. Composizione chimica semi di canapa delle *cultivar* Futura 75 e Felina 32 (valori espressi in %) (Xu et al., 2021; Zhao et al., 2022)

Cultivar	Sostanza secca	Proteine grezze	Lipidi	Amido	Fibre grezze	Minerali
Felina 32	91,9	27,0 ± 0,03	32,9 ± 2,33	1,88 ± 0,20	32,4	5,84 ± 0,15
Futura 75	90,1	27,3 ± 0,06	21,0 ± 0,18	1,79 ± 0,07	34,3	5,70 ± 0,18

Tabella 3.2. Contenuto di acidi grassi nelle *cultivar* Futura 75 e Felina 32 (dati espressi come % sul totale degli acidi grassi) (Galasso et al., 2016)

	Futura 75	Felina 32
C16:0	6,34	6,03
C16:1	0,24	0,16
C18:0	3,03	2,57
C18:1cis9	11,9	13,9
C18:2n6	58,0	57,9
C18:3n6	2,14	2,28
C18:3n3	16,8	15,2
C18:4n3	0,71	0,77
C20:0	0,52	0,62
C20:1cis11	0,25	0,32
C22:0	0,15	0,20
PUFA-Poly-Unsaturated Fatty Acids	77,6	76,2

L'implementazione di pratiche agricole sostenibili è di cruciale importanza per garantire la sicurezza alimentare su scala globale. La sostenibilità, in generale, è declinata su tre pilastri (ambientale, sociale ed economico) e richiede di affrontare questioni cruciali come la biodiversità, l'uso efficiente del suolo, la conservazione dell'acqua e la protezione dell'aria, fattori essenziali per preservare la salute del nostro pianeta (Phipps e Schluttenhofer, 2022).

L'aumento della richiesta di oli e proteine di origine vegetale, unito alla crescente consapevolezza del loro ruolo nutrizionale e funzionale nella dieta umana, ha reso essenziale la caratterizzazione di nuove fonti vegetali (Galasso et al., 2016). Recentemente, sono state riscoperte e reintegrate nelle aree agricole piante alternative, che sfruttano maggiormente la resistenza alle condizioni avverse come siccità e patogeni, oltre ad avere un ruolo nel fitorisanamento e nella rivitalizzazione del suolo (Bailoni et al., 2021).

La canapa tra queste fonti emerge come una coltura promettente nel contesto della sostenibilità agricola. Si presenta per l'appunto come una risorsa sostenibile, versatile, con un buon potenziale nei diversi ambiti della sostenibilità in prospettiva futura a lungo termine, giocando un ruolo chiave nella promozione di pratiche agricole più equilibrate e rispettose per l'ambiente. Le opportunità derivanti dall'utilizzo della canapa si concentrano su due fronti, i.e. migliorare la sostenibilità e promuovere effetti benefici per

la salute umana. Le diverse varietà di colture e i prodotti a base di canapa offrono nuove opportunità di mercato sia per gli agricoltori che per le aziende. La produzione della canapa su larga scala ha un potenziale nella diversificazione dei mercati, con un impatto potenzialmente positivo sui prezzi. La canapa, sotto forma di semi, è considerata un alimento denso in nutrienti, e grazie allo status di sostanza GRAS proprio per olio e proteine nei prodotti alimentari, può contribuire ad implementare nuove opportunità commerciali e al contempo mitigare le malattie croniche globali (Phipps e Schluttenhofer, 2022).

In conclusione, l'aumento della produzione di canapa si configura nel contesto di una produzione non convenzionale da utilizzare come alimento per la produzione zootecnica in sostituzione alle fonti proteiche tradizionali, quali farina di soia e farina di pesce con la canapa industriale che risulta essere una delle fonti proteiche sostenibili e attuali per la mangimistica animale (Štastník et al., 2022).

4. Obiettivi

L'aumento della popolazione mondiale spinge verso una maggiore richiesta di prodotti di origine animale (carne, latte e uova), ciò mette sotto pressione le risorse naturali per la produzione di materie prime per i mangimi animali entrando in competizione con quelle utilizzate per l'alimentazione umana.

Il mercato delle uova, nonostante le recenti sfide, ha triplicato i consumi nell'ultimo periodo, grazie ad una maggiore consapevolezza e conoscenza del consumatore riguardo il loro valore nutrizionale. Aumento creato dall'aggiunta di nuovi segmenti redditizi quale quello di 'uova arricchite', come quelle con *omega-3*, offrendo prodotti con maggiori proprietà funzionali, specialmente riguardo la modifica del profilo di acidi grassi del tuorlo d'uovo, correlato al rischio di malattie cardiovascolari.

In questo contesto, la presente tesi sperimentale ha avuto come obiettivo quello di valutare l'effetto dell'integrazione con semi di canapa interi (10% del consumo giornaliero di alimento) sulla qualità delle uova prodotte da galline ovaiole, considerando aspetti fisici, reologici e nutrizionali, con un'attenzione specifica per l'arricchimento in acidi grassi polinsaturi (PUFA).

5. Materiali e metodi

5.1. Struttura di stabulazione

La ricerca è stata approvata dall'Organismo per la Protezione del Benessere Animale (OPBA), dell'Università di Padova (progetto 28/2020; Prot. n. 204398). Tutti gli animali sono stati trattati seguendo i principi della Direttiva EU 2010/63/EU, riguardante la protezione degli animali a fini scientifici e di sperimentazione. Tutto il personale coinvolto nella gestione degli animali era adeguatamente addestrato allo svolgimento di tale mansione nel rispetto del loro benessere.

La prova è stata condotta presso l'allevamento di galline ovaiole dell'Azienda Agraria Sperimentale "L. Toniolo" dell'Università degli Studi di Padova a Legnaro (PD) (Figura 5.1).

L'aviario sperimentale installato presso l'allevamento era dotato di un sistema di illuminazione artificiale. La temperatura all'interno veniva regolata e mantenuta costante mediante l'utilizzo di ventilatori ad estrazione e cooling system per il raffreddamento.

L'aviario aveva dimensioni pari a 2,50 m di larghezza × 19,52 m di lunghezza × 2,83 m di altezza; era articolato su 3 livelli, dotato di un corridoio, per cui lo spazio a terra a disposizione era di 5,55 m di larghezza × 19,20 m di lunghezza.



Figura 5.1. *Stalla di galline ovaiole presso l'Azienda Agraria Sperimentale "L. Toniolo" dell'Università di Padova, Legnaro (PD)*



Figura 5.2. Vista lato B (a sinistra) e vista lato A (a destra) dell'aviario sperimentale

L'aviario era suddiviso in 8 moduli, ciascuno dei quali con 2,50 m di larghezza \times 2,44 m di lunghezza \times 2,83 m di altezza poteva ospitare un numero massimo di 225 animali per una densità di 9 galline/m² di superficie utile a disposizione, compreso lo spazio relativo ai vari piani (Figura 5.2). Ogni modulo era dotato di 4 nidi collettivi all'interno dei quali le galline potevano deporre le uova che venivano successivamente raccolte ogni giorno tramite apposito nastro trasportatore azionato dagli operatori, opportunamente segnato per permettere l'identificazione dei nidi in cui erano state deposte le uova.

5.2. Disegno sperimentale

La prova sperimentale ha avuto una durata di 4 settimane (da lunedì 20 marzo 2023 a domenica 23 aprile 2023). È stata condotta su 1800 galline ovaiole di razza Hyline Brown (Hyline, Hyline Italia), di età compresa tra le 36 e le 40 settimane.

Le galline sono state alimentate mettendo a disposizione dell'animale una dieta commerciale a base di mais e farina di soia, studiata per soddisfare il fabbisogno di nutrienti degli animali, come mostrato dalle analisi della composizione chimica, minerale e del profilo di acidi grassi nelle Tabelle 6.1 e 6.2. Le analisi sono state effettuate presso il laboratorio chimico La.Chi. del Dipartimento di Agronomia, Alimentazione, Risorse Naturali, Animali e Ambiente (DAFNAE). Gli animali ricevevano alimento e acqua *ad libitum*.



Figura 5.3. *Arricchimento alimentare con semi di canapa interi in mangiatoie circolari a sinistra e mediante spargimento a spaglio a destra*

I semi di canapa (miscela delle cv Futura 75 e Felina 32) per l'arricchimento sono stati distribuiti dagli operatori una volta al giorno (alle ore 10:00) in 4 moduli, in due moduli in mangiatoie circolari e negli altri due tramite spargimento a terra a spaglio dei semi (Figura 5.3), in entrambi i lati dell'avaiario (lato A e lato B). Il gruppo sperimentale ha ricevuto un'integrazione di semi di canapa pari al 10% del consumo giornaliero di alimento.

I semi di canapa, così come la dieta sperimentale, sono stati analizzati presso il laboratorio La.Chi. per determinare la composizione chimica tipo e la composizione minerale (Tabella 6.1) oltre che il profilo di acidi grassi (Tabella 6.2).

Ai fini della valutazione della qualità, 480 uova sono state campionate e quindi analizzate in due momenti differenti. Il primo campionamento è stato effettuato dopo 14 giorni dall'inizio della somministrazione dell'integrazione alimentare con i semi di canapa (2 aprile 2023) su 240 uova, di cui la metà (120) da galline ovaiole alimentate con la sola dieta (30 per modulo, moduli 5, 6, 7 e 8) e le restanti (120) da galline ovaiole alimentate con integrazione di canapa (30 per modulo, moduli 1, 2, 3 e 4).

Il secondo campionamento è stato effettuato dopo 28 giorni (16 aprile 2023) con gli stessi numeri di uova e le stesse modalità utilizzate per il primo campionamento.

In entrambi i campionamenti sono stati effettuati i seguenti rilievi: caratteristiche fisiche e reologiche (aspetto esterno; frequenza di rotture, macchie di sangue e carne; peso e percentuale di guscio, tuorlo ed albume; colore di guscio e tuorlo; pH di albume e tuorlo),

analisi chimiche (composizione chimica tipo, colesterolo, acidi grassi e minerali).

Per le uova del secondo campionamento è stata effettuata anche una valutazione sensoriale tramite test triangolare e di classificazione su un campione di soggetti volontari.

5.3. Analisi fisiche e reologiche delle uova

Le uova intere sono state contrassegnate con un pennarello per facilitare la distinzione dei campioni raccolti dai vari moduli, a seguire pesate singolarmente e 60 uova per gruppo sperimentale visionate per determinare la percentuale di uova con rotture (Figura 5.4). Il diametro all'equatore e l'altezza di ogni singolo uovo (su 50 uova per gruppo) sono stati misurati utilizzando un calibro digitale (IP54, SHAHE Digital Caliper, Wenzhou, Zhejiang, China). L'indice di forma shape index (SI) (%) è stato calcolato usando l'equazione proposta da Khalafalla e Bessei (1995), $SI = 100 * \text{diametro equatore} / \text{altezza uovo}$.

La misurazione del colore del guscio, su 50 uova per gruppo sperimentale, è stata effettuata usando il colorimetro Minolta Chroma Meter CM-508 (Minolta Corp., Ramsey, NJ).

Le uova sono state successivamente aperte; tuorlo, albume e guscio sono stati separati ed inseriti in vaschette in alluminio contrassegnate col codice identificativo del campione.

I gusci di 30 uova per gruppo sperimentale sono stati posti in stufa per 24 h a 50°C ad essiccare, a seguire sono stati pesati per determinare la percentuale del guscio rispetto al totale. Dopo l'essiccazione lo spessore dei gusci d'uovo (con la membrana) è stato misurato in tre punti (un punto sulla camera d'aria, e due punti random all'equatore) utilizzando un calibro digitale (IP54, SHAHE Digital Caliper, Wenzhou, Zhejiang, China) (Figura 5.5).

Su un campione di 50 uova per gruppo, il peso del tuorlo è stato misurato tal quale, mentre il peso dell'albume è stato calcolato come differenza di peso tra l'uovo intero, il tuorlo e il guscio essiccato.

La presenza di macchie di sangue e carne nel tuorlo e nell'albume è stata rilevata visivamente su un campione di 60 uova per gruppo (Figura 5.6).



Figura 5.5. Gusci dopo essiccamento in stufa per 24 h (a sinistra); pesata del guscio (al centro); misurazione dello spessore del guscio con calibro digitale (a destra)



Figura 5.4. Marcatatura del campione di uova (a sinistra); uova contrassegnate (al centro); pesata di un singolo uovo intero (a destra)



Figura 5.6. Misurazione del pH di tuorlo ed albume tramite pH-metro (a sinistra); macchia di carne sul tuorlo (al centro); macchia di sangue sul tuorlo (a destra)

Il colore del tuorlo di 40 uova per gruppo è stato determinato con il Sistema CIE L* a* b* usando il colorimetro Minolta Chroma Meter CM-508 (Minolta Corp., Ramsey, NJ). Il pH di tuorlo ed albume è stato determinato usando un pH-metro (Basic 20, Crison Instruments, SpA, Carpi, Modena, Italy), equipaggiato con uno specifico elettrodo (cat. 5232, Crison Instruments, SpA) su 40 uova per gruppo sperimentale (Figura 5.6). Il test di penetrazione è stato effettuato su 60 uova (30 uova per gruppo sperimentale) utilizzando un analizzatore di texture (TA.XTplusC, Stable Micro System Ltd., Godalming, UK), dotato di una sonda cilindrica di 10 mm di diametro alla velocità costante della testa trasversale di 1 mm/sec con una cella di carico da 25 kg in modalità di compressione. Ogni uovo è stato posizionato sulla piattaforma e il guscio è stato perforato in corrispondenza della parte superiore (estremità piccola) e inferiore (estremità grande). La forza applicata necessaria per perforare il guscio è stata registrata ed espressa come resistenza del guscio d'uovo.

5.4. Analisi chimiche

Dalle uova raccolte, dopo pesata, apertura e suddivisione, sono stati costituiti 30 pool di tuorlo e di albume (ogni campione era costituito da 2 tuorli o 2 albumi entro gruppo sperimentale) per ciascun gruppo sperimentale e successivamente liofilizzati per essere destinati alle analisi chimiche di seguito descritte.

Composizione chimica tipo

Un'aliquota di tuorlo ed albume liofilizzati è stata utilizzata per determinare il contenuto di sostanza secca, ceneri e proteine grezze con metodiche AOAC (1884) e la frazione lipidica tramite estrazione accelerata con solvente (ASE) con cloroformio : metanolo (2:1) (solo nel tuorlo) (Folch et al., 1957). L'albume è stato analizzato per il contenuto di azoto con il metodo Kjeldahl e il fattore di conversione da azoto a proteine è stato di 6,25.

Colesterolo

L'analisi del colesterolo è stata effettuata utilizzando il metodo di Fletouris et al. (1998).

Circa 0,2 g di tuorlo d'uovo liofilizzato sono stati pesati in una provetta pirex centrifugabile da 10 mL con tappo a tenuta in teflon, i campioni sono stati saponificati con 4 mL di una soluzione di KOH (0.5M in etanolo) a 80°C in agitazione continua per 30 minuti. Nelle provette dopo esser state fatte raffreddare a temperatura ambiente, la frazione non saponificabile è stata estratta con 3,5 mL di esano, disciolta in 2 mL di acqua per cromatografia, posta in agitazione satellitare per 5 minuti e centrifugata a 3.000 giri per 10 minuti. Circa 1,5 mL del surnatante sono stati prelevati per il dosaggio del colesterolo, utilizzando un sistema gascromatografico (GC-15A; Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). È stata utilizzata una colonna capillare (HP-5ms cod. 19091S-431, Agilent J&W, Santa Clara, United States) e idrogeno come fase mobile a una velocità di flusso di 1,2 mL/min. I picchi sono stati rilevati con un detector a ionizzazione di fiamma FID con fiamma a flusso di idrogeno 75 kPa, flusso aria 110 kPa, flusso make up 100 kPa (FID model AOC-17, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). Il contenuto di colesterolo è stato quantificato utilizzando standard interni. Per integrare le aree dei picchi è stato utilizzato un sistema di dati cromatografici Shimadzu Class-VP™.

Profilo degli acidi grassi

Per la determinazione del profilo degli acidi grassi, il grasso è stato estratto dai tuorli liofilizzati mediante estrazione accelerata con solvente (ASE, Dionex, Sunnyvale, CA, USA, Application Note 334) utilizzando tre cicli di estrazione con cloroformio:metanolo (in rapporto volumetrico 2:1) come solvente a 80°C, una fase di riscaldamento di 1 minuto e una fase di estrazione di 40 secondi. Il solvente è stato poi evaporato sotto una corrente di N₂ (Genevac EZ-2, SP Industries, Warminster, PA, USA) a 60°C, i campioni residui sono stati pesati prima di aggiungere 4 mL di H₂SO₄ all'1% in metanolo (Christie, 1989) e tenuti a 50°C per una notte. Quindi sono stati aggiunti esano (1 mL di esano per 20 mg di grasso estratto) e 4 mL di Na₂SO₄ (0,47% in H₂O) e agitati vigorosamente per trasferire gli acidi grassi metilati nella fase organica. La fase organica è stata raccolta dopo centrifugazione e analizzata mediante GC-FID con un gascromatografo Agilent 7820A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Per ogni campione, 1 µL è stato iniettato con un rapporto di splittaggio di 65:1 utilizzando il gas cromatografo Supelco OMEGAWAX-TM 250 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (30 m × 0,25 mm di

diametro interno, 0,25 µm di spessore del film) con idrogeno come vettore a 1,4 mL/min. La temperatura del forno è stata impostata a 50°C, mantenuta per 2 minuti, portata a 220°C alla velocità di 4°C/min e quindi mantenuta per 23 minuti. Sia la temperatura dell'iniettore che quella del rivelatore sono state impostate a 250°C. I singoli acidi grassi sono stati identificati confrontando il tempo di ritenzione della miscela standard di esteri metilici di acidi grassi (Supelco 37-component FAME Mix, 47.885-U). I singoli esteri metilici di acidi grassi sono stati espressi come percentuale dell'area totale degli esteri metilici di acidi grassi eluiti.

Minerali

Il contenuto dei minerali è stato determinato su tuorlo e albume liofilizzati. In breve, per ogni campione, 0,30-0,35 g di campione liofilizzato sono stati pesati e posti in un recipiente TFM con 2 mL di perossido di idrogeno al 30% e 7 mL di acido nitrico concentrato (65%), qualità Suprapur (Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Germania). I campioni così preparati sono stati sottoposti a digestione a microonde (Ethos 1600 Milestone S.r.l. Sorisole, BG, Italia) come segue: Fase 1, 25-200 °C in 15 minuti a 1200 W con P max 100 bar; Fase 2, 200 °C per 18 minuti a 1200 W con P max 100 bar; e Fase 3, 200-35 °C in 15 minuti. Dopo il raffreddamento a temperatura ambiente, il campione disciolto è stato diluito con acqua ultrapura (resistività 18,2 M Ω cm a 25 °C) fino a un volume finale di 25 mL. I minerali sono stati determinati con spettrometria di emissione ottica a plasma accoppiato induttivamente (ICP-OES) Spectro Arcos EOP (Spectro Analytical Instruments GmbH, Kleve, Germania).

Gli standard di calibrazione sono stati preparati utilizzando soluzioni standard multi- e monoelemento (Inorganic Ventures Inc. Christiansburg, VA, USA) in acido nitrico Suprapur al 30% (Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Germania).

5.5. Analisi sensoriale

È stato effettuato un test triangolare per 'differenza' con 50 panelisti su diverse triplete di campioni (due uova di controllo e un uovo di galline ovaiole alimentate con semi di canapa; un uovo di controllo e due uova di galline ovaiole alimentate con semi di canapa). I panelisti sono stati reclutati tra volontari, studenti e membri dello staff del Dipartimento

di Agronomia, Alimentazione, Risorse Naturali, Animali e Ambiente. Ciascuno ha consumato tre uova codificate con numeri casuali a tre cifre.

Per la valutazione sensoriale le uova sono state preparate mettendole in acqua a temperatura ambiente, l'acqua è stata poi portata al punto di ebollizione e le uova sono state tenute in acqua bollente per 8 minuti. Le uova sono state raffreddate a temperatura ambiente, sgusciate e tagliate in quarti (nel senso della lunghezza).

I campioni sono stati serviti su un piatto di carta bianca di 15 cm, identificato con un codice cieco a 3 cifre (Figura 5.7).

Ai partecipanti è stato chiesto di riconoscere i diversi campioni di uova. Per pulire il palato tra un campione e l'altro sono stati forniti acqua minerale e cracker non salati.

Di seguito è stato richiesto ai panelisti di classificare i campioni di uova tramite un 'test di preferenza per ordinamento (ISO 8587, 2001)' in base all'accettabilità complessiva, attribuendo in ordine il valore 1 al campione considerato più accettabile, il 2 al secondo e il 3 all'ultimo campione ritenuto il meno preferito.



Figura 5.7. Test triangolare effettuato nella sala di analisi sensoriale attrezzata del DAFNAE

5.6. Analisi statistica

I dati relativi ai caratteri qualitativi fisici delle uova sono stati sottoposti ad analisi della varianza tramite ANOVA con la dieta, il tempo di campionamento e la loro interazione come fattori principali di variabilità e il recinto come effetto casuale, utilizzando la procedura PROC MIXED di SAS (SAS Institute Citation 2013). I dati relativi alla

composizione chimica tipo, al contenuto di minerali nel tuorlo e nell'albume e al profilo degli acidi grassi dei lipidi del tuorlo sono stati sottoposti ad ANOVA utilizzando la procedura PROC GLM (SAS Institute Citation 2013) con la dieta, il tempo di campionamento e le loro interazioni come effetti principali. Le differenze tra le medie con $P \leq 0,05$ sono state considerate statisticamente significative.

L'effetto degli stessi fattori sperimentali di cui sopra sulla frequenza di rottura del guscio, macchie di sangue e macchie di carne è stato valutato utilizzando il test del chi-quadrato (χ^2) (SAS Institute Inc., 2013).

Per il 'test triangolare' è stata calcolata la probabilità di commettere un errore di tipo I (rischio α), con significatività limite pari a $P \leq 0,05$, analizzando i risultati ottenuti mediante l'utilizzo di pacchetti software. I risultati del 'test di preferenza per ordinamento' sono stati confrontati e valutati utilizzando il test del chi-quadrato (χ^2) (SAS Institute Inc., 2013).

6. Risultati

La dieta (a base di mais e farina di soia) somministrata giornalmente agli animali, e i semi di canapa (miscela delle due cultivar Futura 75 e Felina 32) utilizzati per l'integrazione alimentare durante la sperimentazione, sono state analizzate preliminarmente presso il Laboratorio Chimico La.Chi. Del Dipartimento di Agronomia, Alimentazione, Risorse Naturali, Animali e Ambiente (DAFNAE).

La dieta aveva un contenuto di proteina grezza pari al 17,94%, mentre i semi di canapa presentavano un contenuto di proteina grezza, estratto etereo e fibra grezza, rispettivamente pari al 23,82%, 27,49% e 25,05%.

La Tabella 6.2 riporta il profilo degli acidi grassi sia per la dieta che per i semi di canapa. La percentuale di ALA (C18:3 n-3) è risultata maggiore nei semi di canapa rispetto alla dieta, 12,72% rispetto al 4,16%.

Tabella 6.1. Composizione chimica (%) e minerale (mg/kg) della dieta somministrata agli animali e dei semi di canapa usati nell'integrazione alimentare

Composizione chimica (%)	Dieta	Semi di canapa
Sostanza secca	90,25	93,09
Ceneri	12,02	5,41
Proteina grezza	17,94	23,82
Estratto etereo	3,98	27,49
Fibra grezza	2,90	25,05
Composizione minerale (mg/kg)		
Ca	37539	3078
Cr	3,71	1,52
Cu	9,47	18,8
Fe	227	159
K	8394	8586
Mg	1755	4211
Mn	101	61,8
Mo	1,29	
Na	1320	149
P	5803	8896
S	2137	2497
Se	<0,8	<0,8
Zn	73,23	71,85

La percentuale in LA (C18:2 n-6) è risultata pari a circa la metà sul totale degli acidi grassi (50,70% per la dieta e 54,86% per i semi di canapa).

La percentuale di acidi grassi saturi (SFA) e monoinsaturi (MUFA) è risultata maggiore nella dieta rispetto ai semi, mentre risultato opposto è stato osservato per la percentuale di acidi grassi polinsaturi (PUFA). Infine, il rapporto n6/n3 è risultato pari a 12,39 per la dieta e 4,27 per i semi.

Tabella 6.2. Profilo degli acidi grassi (% sul totale) della dieta somministrata agli animali e dei semi di canapa usati nell'integrazione alimentare

Acidi grassi	Dieta	Semi di canapa
C14:0	0,24	0,09
C16:0	13,24	8,23
C18:0	3,38	2,86
C20:0	0,43	0,86
Altri SFA	0,93	0,80
C16:1n9	0,06	0,03
C16:1n7	0,15	0,19
C18:1n9	25,03	14,70
C18:1n7	1,06	1,02
Altri MUFA	0,39	0,57
C18:3n3	4,16	12,72
C18:4n3	0,00	0,50
C22:6n3	0,02	0,03
Altri PUFA n3	0,04	0,20
C18:2n6	50,70	54,86
C18:3n6	0,03	2,02
Altri PUFA n6	0,15	0,33
SFA – Saturated Fatty Acids	18,22	12,84
MUFA – Mono-Unsaturated Fatty Acids	26,68	16,50
PUFA – Poly-Unsaturated Fatty Acids	55,10	70,66
PUFA n3	4,22	13,45
PUFA n6	50,88	57,21
n6/n3	12,39	4,27

Qualità fisiche e reologiche delle uova

Rispetto al controllo, l'integrazione alimentare con semi di canapa non ha influenzato la percentuale di ovodeposizione delle galline (94,84% vs. 96,19%; $P = 0,279$) (dato non riportato in tabella).

Le caratteristiche qualitative fisiche e reologiche - peso delle uova intere, ripartizione tra tuorlo, albume e guscio, shape-index, spessore, colore e resistenza del guscio - non sono state influenzate dall'arricchimento della dieta con semi di canapa ($P > 0,05$) come mostrato dai risultati in Tabella 6.3.

Tabella 6.3. Caratteristiche qualitative fisiche e reologiche, chimiche e pH delle uova

	Dieta (D)		Tempo (T)		P value			RMSE
	C	SC	14d	28d	D	T	DxT	
n	240	240	240	240				
Uovo intero (g)	64,41	64,57	63,97	65,01	0,699	0,017	0,891	4,695
Pre-rotture (%)	1,25	0,83	1,88	0,21	0,523	0,011	-	-
Macchie di sangue (%)	11,67	10,42	8,33	13,75	0,641	0,043	-	-
Macchie di carne (%)	1,67	2,08	1,25	2,50	0,734	0,308	-	-
n	120	120	120	120				
Tuorlo (%)	25,18	25,33	25,32	25,19	0,658	0,685	0,739	1,844
Albume (%)	64,64	64,27	64,31	64,61	0,132	0,225	0,584	1,907
Guscio (%)	10,25	10,11	10,20	10,16	0,270	0,594	0,554	0,633
Spessore del guscio (mm)	0,38	0,37	0,38	0,37	0,254	<0,001	0,084	0,013
Shape index (%)	78,61	78,64	78,64	77,69	0,943	<0,001	0,376	3,150
Resistenza (N)	51,60	53,15	53,23	51,52	0,353	0,306	0,224	8,817
Albume pH	8,70	8,80	8,79	8,72	0,028	<0,001	0,556	0,141
Tuorlo pH	6,44	6,24	6,37	6,32	0,0008	0,026	0,895	0,175
Guscio L*	58,47	58,17	58,76	57,89	0,472	0,036	0,306	3,205
Guscio a*	18,00	18,23	18,20	18,03	0,258	0,406	0,405	1,555
Guscio b*	28,63	28,56	28,54	28,64	0,764	0,651	0,453	1,678
Tuorlo L*	55,48	54,79	55,39	54,88	0,017	0,076	0,121	2,233
Tuorlo a*	9,79	10,09	9,77	10,10	0,340	0,160	0,064	1,823
Tuorlo b*	50,94	51,58	51,67	50,86	0,473	0,359	0,964	6,885

RSME, errore quadratico medio. C: Dieta di controllo. SC: Dieta di controllo con integrazione di semi di canapa.

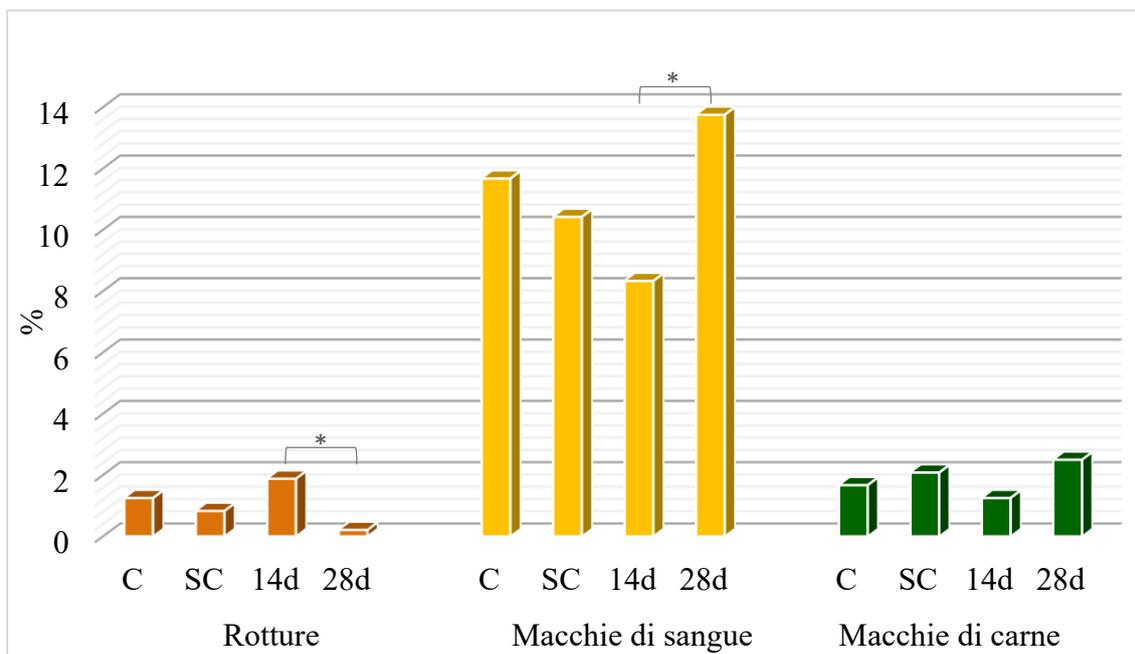


Figura 6.1. Percentuale di rotture del guscio ($n=480$), macchie di carne e macchie di sangue delle uova ($n=240$); $*(P < 0,05)$ (Tabella 6.3)

D'altra parte, si è riscontrata una riduzione del pH dell'albume ($P < 0,05$), del pH del tuorlo ($P < 0,001$) e una variazione dell'indice L^* per la colorazione del tuorlo ($P < 0,05$) come conseguenza dell'integrazione alimentare con semi di canapa.

Le caratteristiche qualitative sono cambiate con il tempo di campionamento: il peso delle uova raccolte è aumentato da 14 a 28 giorni di integrazione alimentare ($P < 0,05$), mentre sono diminuiti i valori di spessore del guscio ($P < 0,001$), indice di forma ($P < 0,001$) e L^* del guscio ($P < 0,05$). Inoltre, il pH di tuorlo ed albume sono diminuiti ($P < 0,001$ per albume; $P < 0,05$ per tuorlo).

La presenza di rotture del guscio è diminuita da 1,88% al 14° giorno a 0,21% al 28° giorno ($P < 0,05$); la presenza di macchie di sangue, invece, è aumentata da 8,33% al 13,75% ($P < 0,05$) (Figura 6.1).

Composizione chimica

La composizione chimica tipo e quella minerale di tuorlo ed albume (Tabella 6.4, Tabella 6.5), non sono cambiate in funzione dell'arricchimento con semi di canapa o dal tempo di campionamento ($P < 0,05$).

D'altra parte, sia per tuorlo che albume, è stata riscontrata una diminuzione del contenuto di sodio ($P < 0,05$), magnesio ($P < 0,01$), fosforo ($P < 0,05$) e zolfo ($P < 0,05$) all'aumentare del tempo di campionamento da 14 a 28 giorni ma senza interazioni significative fra tempo e integrazione alimentare.

La percentuale di acidi grassi saturi totali (SFA) e quella di acidi grassi monoinsaturi (MUFA) sono risultate inferiori nei tuorli di uova da galline arricchite con semi di canapa rispetto alle galline del gruppo controllo senza integrazione ($P < 0,01$). La percentuale di acidi grassi polinsaturi (PUFA) è aumentata, sia per quelli della serie n-3 ($P < 0,001$) che per quelli della serie n-6 ($P < 0,01$), nel tuorlo delle uova delle galline che hanno ricevuto l'integrazione alimentare, come conseguenza dell'aumento della percentuale di acido α -linoleico (ALA; $P < 0,001$), acido docosaesaenoico (DHA; $P < 0,001$), acido linoleico (LA; $P < 0,05$) a fronte di una riduzione della percentuale di acido docosapentaenoico (DPA; $P < 0,01$).

Tabella 6.4. Composizione chimica tipo di tuorlo e albume

	Dieta (D)		Tempo (T)		P value			RMSE
	C	SC	14d	28d	D	T	DxT	
n	40	40	40	40				
Tuorlo (%)								
Umidità	48,4	48,4	48,5	48,2	0,860	0,312	0,401	1,00
Proteine	16,7	16,8	16,8	16,7	0,503	0,197	0,146	0,416
Lipidi	31,1	31,0	30,9	31,2	0,794	0,338	0,905	1,13
Ceneri	1,69	1,70	1,68	1,71	0,957	0,230	0,111	0,094
Colesterolo (mg/100g)	1079	1067	1066	1080	0,628	0,604	0,049	78,7
Albume (%)								
Umidità	87,5	87,3	87,3	87,5	0,349	0,249	0,418	0,655
Proteine	10,8	11,0	11,0	10,8	0,263	0,277	0,438	0,584
Ceneri	0,745	0,779	0,750	0,774	0,095	0,214	0,691	0,061

RSME, errore quadratico medio. C: Dieta di controllo. SC: Dieta di controllo con integrazione di semi di canapa.

Rispetto al tempo di campionamento, da 14 a 28 giorni sono aumentate le percentuali di acido arachidico (C20:0; $P < 0,001$) e stearidonico (SDA; $P < 0,05$), mentre sono diminuite quelle di acido arachidonico (AA; $P = 0,05$) e DHA ($P < 0,05$) sono diminuiti. D'altra parte, non sono state osservate interazioni significative fra tempo di campionamento e integrazione alimentare.

Tabella 6.5. Composizione minerale di tuorlo ed albume delle uova (mg/kg)

	Dieta (D)		Tempo (T)		P value			RMSE
	C	SC	14d	28d	D	T	DxT	
n	40	40	40	40				
Tuorlo								
Na	462	450	476,5	435,3	0,305	0,001	0,232	35,4
K	1137	1140	1141,4	1135,3	0,878	0,715	0,612	52,1
Ca	1582	1587	1582,5	1586,6	0,857	0,884	0,924	86,8
Mg	123	123	126,7	119,4	0,751	0,003	0,560	7,16
P	5659	5707	5633,3	5733,0	0,379	0,069	0,336	168,2
Fe	64,3	67,3	66,1	65,5	0,081	0,691	0,234	5,33
Cu	1,81	1,77	1,81	1,76	0,347	0,264	0,487	0,131
Zn	37,9	37,7	38,0	37,6	0,794	0,485	0,490	1,93
Mn	1,12	1,16	1,24	1,04	0,428	<0,001	0,201	0,150
S	1796	1779	1812	1763	0,401	0,024	0,958	65,2
Se	0,875	0,831	0,847	0,860	0,488	0,841	0,562	0,178
Cr	0,112	0,112	0,112	0,112	0,939	0,858	0,419	0,013
Albume								
Na	1737	1765	1784	1718	0,379	0,046	0,313	99,8
K	1394	1429	1404	1419	0,209	0,595	0,610	87,2
Ca	134	126	122	138	0,362	0,087	0,361	28,9
Mg	127	126	131	123	0,247	0,005	0,876	8,24
P	179	178	186,4	171	0,864	0,037	0,508	21,7
Fe	0,160	0,225	0,256	0,129	0,355	0,075	0,466	0,221
Cu	0,176	0,175	0,182	0,170	0,929	0,182	0,816	0,027
Zn	0,029	0,031	0,031	0,028	0,539	0,307	0,473	0,011
S	1865	1901	1908	1859	0,230	0,103	0,273	92,6
Se	0,168	0,183	0,179	0,172	0,255	0,567	0,348	0,038

RSME, errore quadratico medio. C: Dieta di controllo. SC: Dieta di controllo con integrazione di semi di canapa.

Tabella 6.6. Composizione acidi grassi del tuorlo (% del totale di acidi grassi) delle uova

	Dieta (D)		Tempo (T)		P value			RMSE
	C	SC	14d	28d	D	T	DxT	
n	40	40	40	40				
C14:0	0,365	0,334	0,342	0,357	0,011	0,204	0,296	0,037
C16:0	24,3	23,3	23,8	23,8	0,001	0,931	0,723	0,869
C18:0	8,55	8,79	8,71	8,63	0,094	0,547	0,622	0,428
C20:0	0,011	0,014	0,022	0,003	0,457	<0,001	0,048	0,015
Altri SFA	0,328	0,343	0,310	0,361	0,180	<0,001	0,600	0,035
C16:1n9	0,635	0,676	0,658	0,654	0,029	0,823	0,641	0,058
C16:1n7	2,96	2,37	2,68	2,65	<0,001	0,819	0,477	0,439
C18:1n9	35,4	33,1	34,7	33,7	0,005	0,206	0,609	2,44
C18:1n7	1,95	1,71	1,80	1,87	0,002	0,333	0,428	0,227
Altri MUFA	0,458	0,421	0,434	0,444	0,026	0,522	0,715	0,050
C18:3n3	0,976	1,68	1,28	1,37	<0,001	0,552	0,874	0,482
C18:4n3	0,027	0,025	0,035	0,016	0,860	0,038	0,730	0,029
C22:6n3	1,26	1,54	1,33	1,47	<0,001	0,034	0,908	0,190
Altri n3 PUFA	0,187	0,261	0,214	0,235	<0,001	0,223	0,570	0,052
C18:2n6	19,1	22,2	20,4	20,9	0,002	0,558	0,897	2,92
C18:3n6	0,137	0,153	0,137	0,154	0,063	0,051	0,691	0,027
C20:4n6	2,35	2,33	2,27	2,41	0,747	0,049	0,616	0,215
C22:5n6	0,453	0,296	0,356	0,394	<0,001	0,319	0,499	0,119
Altri n6 PUFA	0,577	0,603	0,568	0,611	0,253	0,063	0,933	0,072
SFA	33,5	32,7	33,2	33,1	0,006	0,834	0,868	0,886
MUFA	41,4	38,2	40,3	39,3	0,002	0,316	0,785	2,95
PUFA	25,1	29,1	26,6	27,6	<0,001	0,368	0,851	3,50
PUFA n3	2,45	3,50	2,86	3,09	<0,001	0,252	0,904	0,611
PUFA n6	22,6	25,5	23,7	24,5	0,003	0,404	0,843	2,93
n6: n3	9,32	7,44	8,49	8,27	<0,001	0,388	0,504	0,785

RSME, errore quadratico medio. C: Dieta di controllo. SC: Dieta di controllo con integrazione di semi di canapa.

Analisi sensoriale

Nel corso dell'analisi sensoriale il 46% dei giudici è stato in grado di discriminare le uova delle galline che avevano ricevuto integrazione di semi di canapa nell'alimentazione da quelle provenienti dalle galline di controllo (Figura 6.2), mentre il 54% non ha riscontrato alcuna differenza ($P= 0,042$). Alla valutazione del test di classificazione non è stata riscontrata alcuna preferenza da parte dei panelisti tra le due tipologie di uova, ottenute

da galline con o senza arricchimento ($P > 0,05$).

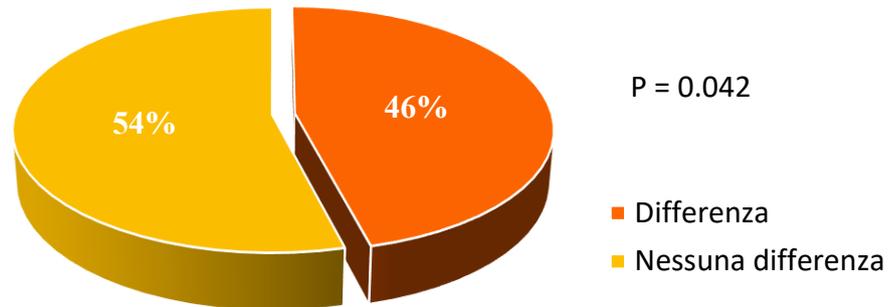


Figura 6.2. Risultati del test triangolare per 'differenza' (n= 50) effettuato nella sala di analisi sensoriale del DAFNAE

7. Discussione

Con il Regolamento (UE) n. 1393/2022 dell'11 agosto 2022 l'Unione Europea (UE) ha autorizzato la produzione di varietà di semi di canapa (*Cannabis sativa L.*) per uso alimentare e dei prodotti derivati, con un contenuto di Δ^9 -THC (principale composto psicoattivo) che presenta limiti legali massimi dello 0,03% (in sostanza secca) (Št'astník et al., 2022).

I semi di canapa interi sono considerati come un'ottima fonte proteica adatta alla mangimistica animale (Št'astník et al., 2022; Xu et al., 2021; Zhao et al., 2022) in virtù delle loro caratteristiche nutrizionali.

La composizione chimica dei semi di canapa utilizzati nella presente sperimentazione è risultata coerente con i dati disponibili in letteratura (Gakhar et al., 2012), laddove variazioni anche ampie sono da attribuirsi a diversi fattori ambientali, pratiche agronomiche utilizzate per la produzione dei semi, oltre che la variabilità genetica delle cultivar utilizzate (Bailoni et al., 2021; Zhao et al., 2022).

In maniera simile, anche l'effetto dell'integrazione alimentare con semi di canapa sulla qualità delle uova può essere diverso in funzione del prodotto utilizzato e del livello di inclusione dei semi nella dieta (Št'astník et al., 2022). Secondo EFSA (2011), il livello massimo di inclusione dei semi di canapa nella dieta delle galline ovaiole dovrebbe essere compreso tra il 5 e il 7%. D'altra parte, Fabro et al. (2021), in una metanalisi dei risultati di 14 studi con differenti livelli di inclusione rispetto all'uso di semi di canapa interi o pannelli di canapa, ha dimostrato come i livelli proposti dall'EFSA fossero troppo bassi per ottenere modifiche del profilo acidico delle uova, laddove gli studi disponibili spaziano dal da un minimo del 3% di inclusione (Skřivan et al., 2019) fino ad un livello massimo del 30% (Neijat et al., 2014; Neijat et al., 2016).

Sulla base della letteratura disponibile, l'inclusione dei semi nella dieta (10%) non porta modifiche significative sulla qualità fisica e reologica delle uova (Fabro et al., 2021), come evidenziato dai risultati dell'arricchimento rispetto alla dieta distribuita ad libitum del seguente elaborato, senza effetti sulle prestazioni produttive degli animali, ma con l'arricchimento del contenuto lipidico del tuorlo in PUFA (Taaifi et al., 2023). Risultati simili sono stati osservati anche con integrazioni al 15% (Konca et al., 2018) e al 20% (Gakhar et al., 2012). Sempre Gakhar et al. (2012) nel loro studio hanno evidenziato come

l'inclusione del 10% di semi di canapa (in sostituzione di soia e frumento della dieta piuttosto che come integrazione alimentare) non abbia modificato il peso delle uova, diversamente da quanto accaduto con un livello di inclusione del 20% (+ 4 g), dimostrando come il maggiore livello di inclusione possa avere un effetto dose-dipendente.

Le variazioni osservate nel nostro studio in funzione del tempo di campionamento (i.e. un aumento del peso delle uova, una riduzione dello spessore del guscio ed una variazione della forma verso il rotondo piuttosto che l'ovoidale) sono potenzialmente attribuibili all'aumento dell'età della gallina ovaia (Sokołowicz et al., 2018; Van Den Brand et al., 2004). In maniera simile, l'aumento dell'età delle galline ovaiole è stato associato all'aumento dell'incidenza di macchie di sangue nelle uova (Sokołowicz et al., 2018).

Per quanto riguarda il colore del tuorlo, carattere importante per la preferenza del consumatore, questo può essere modificato con la formulazione della dieta (Kanbur et al., 2023) in funzione dei pigmenti presenti negli alimenti utilizzati e/o degli additivi eventualmente integrati nella dieta. . In effetti, nei semi di canapa interi si trovano clorofille e carotenoidi, in particolare xantofille, soprattutto luteina, che l'animale veicolando con i lipidi trasferisce nel tuorlo dell'uovo (Cert et al., 2000; Bryden et al., 2021) in maniera più efficiente rispetto ad altre materie prime quali frumento (Grulichova et al., 2017) e soia (Bulda et al., 2008) che non contengono questi pigmenti.

Studi precedenti hanno valutato come la riduzione del contenuto di olio della dieta delle ovaiole (soia, girasole e mais) a vantaggio dell'inclusione di semi di canapa interi abbia comportato una riduzione dei valori di L^* e a^* nel tuorlo e, quindi, una colorazione più chiara. Goldberg et al. (2012) hanno riportato come la sostituzione della farina di soia e frumento con semi di canapa (10-20%) abbia diminuito il valore dell'indice L^* e aumentato i valori di a^* e b^* , con un aumento dell'intensità della colorazione del tuorlo per il maggior contenuto di carotenoidi nei semi.

Nella prova presente, al termine del secondo periodo di campionamento, non è stata riscontrata nessuna variazione significativa degli indici del colore in funzione dell'integrazione con semi di canapa. , laddove il livello di integrazione (10%) e/o il livello di xantofille nei semi di canapa utilizzati (contenuto non misurato) potrebbero non essere stati sufficienti a modificare il contenuto di xantofille delle uova rispetto alla colorazione già assicurata dalla dieta somministrata formulata per una colorazione base e

poca intensa delle uova stesse.

In quanto all'età, è stata rilevata una minima ma significativa differenza nel valore L* del guscio d'uovo (corrispondente ad una maggiore luminosità) all'aumentare dell'età degli animali che in letteratura è stato attribuito ad un aumento delle dimensioni delle uova e ad una dispersione dei pigmenti su una superficie più ampia (Odabaşı et al., 2007; Samiullah et al., 2016).

Come precedentemente riportato da Mierliță (2019), anche nella presente prova l'integrazione con i semi di canapa non ha modificato le caratteristiche nutrizionali di albume e/o tuorlo, fatta eccezione per il profilo degli acidi grassi di questo ultimo.

Anche il contenuto di colesterolo, in passato associato ad un maggior rischio di malattie cardiovascolari rispetto al consumo delle uova (Sirri e Meluzzi, 2011), non è variato con l'integrazione dei semi di canapa, così come osservato da Mierliță (2019) con lo stesso livello di integrazione (10%).

Infine, considerando la varietà di minerali contenuta all'interno dei semi di canapa, tra cui fosforo, potassio, magnesio, calcio, sodio e ferro (Callaway, 2004), esistono pochi studi sulle relazioni fra alimentazione delle galline ovaiole e contenuto minerale delle uova, che nel nostro studio non hanno evidenziato differenze in funzione dell'integrazione alimentare con semi di canapa.

L'olio dei semi di canapa è ricco di acidi grassi insaturi, in particolare ALA e di GLA, acido grasso della serie n-6 peculiare del profilo acidico dei semi di canapa (Rabrenović e Vujasinović, 2022), la cui percentuale è aumentata in tutti gli studi che hanno previsto l'integrazione di semi di canapa nell'alimentazione delle galline ovaiole (Fabro et al., 2021). Nel nostro caso, le percentuali di ALA e GLA nei semi utilizzati erano pari rispettivamente al 12,72% e 2,02%. Callaway (2004) ha riportato che l'olio di semi di canapa contiene mediamente tra il 17-19% di ALA e fino al 4% di GLA. Goldberg et al. (2012) hanno osservato un aumento di ALA, DHA e n-3 PUFA totali nel tuorlo l'uovo con livelli di inclusione del 10-20% di semi di canapa, oltre che un aumento di EPA (non osservato in questo studio). Tale aumento può essere attribuito alla capacità di conversione delle galline ovaiole di ALA in EPA e DHA, sintesi per cui l'uomo ha limiti superiori rispetto alle galline ovaiole (Fabro et al., 2021).

D'altra parte, anche la percentuale di n-6 PUFA è aumentata in virtù del contenuto maggiore di LA, aumento validato dai risultati ottenuti in differenti studi (Neijat et al.,

2016; Mierliță, 2019; Skřivan et al., 2019).

L'arricchimento con semi di canapa ha quindi modificato il rapporto n-6/n-3 a 7,4, valore vicino a quelli indicati più favorevoli per l'uomo (Callaway, 2004; Galasso et al., 2016). Come riportato anche da Shahid et al. (2015), l'arricchimento di PUFA è stato accompagnato da una diminuzione di SFA e MUFA a seguito dell'arricchimento con semi di canapa.

D'altra parte, la variazione del profilo acido del prodotto finale può modificare le caratteristiche sensoriali del prodotto e la preferenza dei consumatori per un prodotto (Caston et al., 1994). In bibliografia risulta che l'integrazione con semi di lino (Jiang et al., 1992, Caston et al., 1994) ha ridotto l'accettabilità delle uova, soprattutto a livelli di inclusione del 20%; simili risultati sono stati ottenuti quando l'alimentazione delle galline ha visto l'integrazione con olio di pesce (Van Elswyk et al., 1992) anche solo al 3% e con le uova presentate come strapazzate piuttosto che come uova sode. In effetti, la temperatura di servizio del prodotto può modificare la volatilità dei composti aromatici per l'esposizione al calore e quindi la valutazione sensoriale del prodotto.

Con una integrazione di semi di canapa fino al 20%, Goldberg et al. (2012) non hanno osservato differenziazioni di carattere sensoriale nelle uova, mentre nel nostro studio anche solo con il 10% di semi di canapa quasi la metà dei panelisti (non addestrati) ha differenziato le uova sode delle galline alimentate con semi di canapa da quelle che non avevano ricevuto integrazione pur senza essere in grado di esprimere una preferenza per una tipologia piuttosto che per un'altra.

8. Conclusioni

La canapa industriale ad uso alimentare è considerata di fatto una fonte proteica potenzialmente utilizzabile in sostituzione delle fonti tradizionali, ma rappresenta anche un'integrazione di grasso con uno specifico profilo acido. Nell'alimentazione delle galline ovaiole, quando somministrata sotto forma di seme e come integrazione alimentare può rappresentare anche un arricchimento in grado di aumentare e diversificare il repertorio comportamentale degli animali con effetti positivi sul benessere animale.

Nella presente sperimentazione, l'integrazione con il 10% di semi di canapa nell'alimentazione delle galline ovaiole non ha modificato la qualità delle uova e/o la loro composizione chimica. D'altra parte, è aumentata la percentuale di acidi grassi polinsaturi della serie n-3 PUFA (in particolare ALA e DHA) e n-6 (soprattutto LA) nel tuorlo, a vantaggio di un rapporto tra acidi grassi n-6 ed n-3 più favorevole dal punto di vista dell'alimentazione umana.

La valutazione sensoriale ha confermato come l'inclusione di semi di canapa nella dieta delle galline ovaiole non comporti effetti negativi sulle caratteristiche sensoriali delle uova, aprendo la possibilità di incremento di nuovi segmenti nel mercato per questo prodotto.

9. Bibliografia

Adeoye, A. A., Oyeleye, O. O., Olorunsola, R. A., Udoh, J. E., and Oladepo, A. D. 2023. Table egg quality and nutritional composition assessment of different breeds and ages of laying hens. *Slovak Journal of Animal Science*, 56(01), 38-45. <https://doi.org/10.36547/sjas.792>

Alqazzaz, M. 2023. Fatty acid profile and cholesterol contents in egg yolk of hens fed variable energy to protein ratio diet using *Hermetia Illucens* Meal. Proc. 3rd International Congress of the Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, Malatya, Türkiye, 26–31.

Bailoni, L., Bacchin, E., Trocino, A., and Arango, S. 2021. Hemp (*Cannabis sativa* L.) seed and co-products inclusion in diets for dairy ruminants: A review. *Animals*, 11(3), 856. <https://doi.org/10.3390/ani11030856>

Baucells, M. D., Crespo, N., Barroeta, A. C., Lopez-Ferrer, S., and Grashorn, A. M. 2000. Incorporation of different polyunsaturated fatty acids into eggs. *Poultry Science*, 79(1), 51-59. <https://doi.org/10.1093/ps/79.1.51>

Belitz, H. D., Grosch, W., and Schieberle, P. 2009. Eggs. In: Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. *Food chemistry*. Springer. pp. 546-562. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7_12

Bryden, W. L., Li, X., Ruhnke, I., Zhang, D., and Shini, S. 2021. Nutrition, feeding and laying hen welfare. *Animal Production Science*, 61(10), 893–914. <https://doi.org/10.1071/AN20396>

Bulda, O. V., Rassadina, V. V., Alekseichuk, H. N., and Laman, N. A. 2008. Spectrophotometric measurement of carotenes, xanthophylls, and chlorophylls in extracts from plant seeds. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55, 544-551. <https://doi.org/10.1134/S1021443708040171>

Callaway, J. C. 2004. Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica*, 140, 65–72. <https://doi.org/10.1007/s10681-004-4811-6>

Caston, L. J., Squires, E. J., and Leeson, S. 1994. Hen performance, egg quality, and the sensory evaluation of eggs from SCWL hens fed dietary flax. *Canadian Journal of Animal Science*, 74(2), 347–353. <https://doi.org/10.4141/cjas94-047>

Cert, A., Moreda, W. and Pérez-Camino, M. C. 2000. Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils. *Journal of Chromatography A*. 881(1-2), 131-148. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00389-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00389-7)

Chung, T. 2023. Effect of dietary *Ptecticus tenebrifer* powder on the fatty acid profile of egg yolk in laying hens. *Entomological Research*, 53(12), 1-6. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12687>

Coit, M. 2022. Legal and regulatory oversight of hemp cultivation and hemp foods. In: Pojić M. and Tiwari B. K. *Industrial Hemp, Food and Nutraceutical Applications*. Elsevier. pp. 59–72. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90910-5.00005-1>

Corrales-Retana, L., Ciucci, F., Conte, G., Casarosa, L., Mele, M., and Serra, A. 2021. Profile of fatty acid lipid fractions of omega-3 fatty acid-enriched table eggs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 105, 326–335. <https://doi.org/10.1111/jpn.13462>

EFSA, Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). 2011. Scientific opinion on the safety of hemp (*Cannabis* genus) for use as animal feed. *EFSA Journal*, 9(3), 1–41. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2011>

European Commission. 2023. EU Market Situation for Eggs. Available at: https://agriculture.ec.europa.eu/farming/animal-products/eggs_it Accessed: 21/11/2023

Fabro, C., A. Romanzin, and M. Spanghero. 2021. Fatty acid profile of table eggs from laying hens fed hempseed products: A meta-analysis. *Livestock Science*, 254, 104-748. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104748>

FAO. 2018. Building climate resilience for food security and nutrition. Available at: <https://www.fao.org/3/I9553EN/i9553en.pdf> Accessed: 09/12//2023

FAO. 2023. Contribution of terrestrial animal source food to healthy diets for improved

nutrition and health outcomes. Available at:
<https://www.fao.org/3/cc3912en/cc3912en.pdf> Accessed: 16/11/2023

Flajšman, M., and Ačko, D. K. 2022. Industrial hemp breeding and genetics. In: Pojić M. and Tiwari B. K. *Industrial Hemp, Food and Nutraceutical Applications*. Elsevier, pp. 37–57. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90910-5.00009-9>

Fletouris, D. J., Botsoglou, N. A., Psomas, I. E., and Mantis, A. I. 1998. Rapid determination of cholesterol in milk and milk products by direct saponification and capillary gas chromatography. *Journal of Dairy Science*, 81(11), 2833-2840. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75842-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75842-4)

Folch, J., Lees, M., and Sloane-Stanley G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biology Chemistry*. 226, 497–507.

Gakhar, N., Goldberg, E., Jing, M., Gibson, R., and House, J. D. 2012. Effect of feeding hemp seed and hemp seed oil on laying hen performance and egg yolk fatty acid content: Evidence of their safety and efficacy for laying hen diets. *Poultry Science*, 91(3), 701-711. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01825>

Galasso, I., Russo, R., Mapelli, S., Ponzoni, E., Brambilla, I. M., Battelli, G., and Reggiani, R. 2016. Variability in seed traits in a collection of *Cannabis sativa* L. genotypes. *Frontiers in Plant Science*, 7, 688. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00688>

Galea, F. 2011. The effect of laying hen nutrition on egg quality. *International Poultry Production*, 19, 27–29.

Gautron, J., Dombre, C., Nau, F., Cyril, F., and Guillier, L. 2021. Review: Production factors affecting the quality of chicken table eggs and egg products in Europe. *Animal*, 16, 100425. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100425>

Gerber, N. 2006. Factors affecting egg quality in the commercial laying hen: A review. *Egg Producers Federation of New Zealand (Inc)*, pp: 1-28.

Goldberg, E. M., Gakhar, N., Ryland, D., Aliani, M., Gibson, R. A., and House J. D.

2012. Fatty acid profile and sensory characteristics of table eggs from laying hens fed hempseed and hempseed oil. *Journal of Food Science*, 77(4), 153-160. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02626.x>

Grulichova, M., Mendel, P., Trojan, V., and Vyhnanek, T. 2017. Determination of the content of pigments in seeds. In *Proceedings of 24th international Phd students conference (Mendelnet 2017)*. Mendel University in Brno, pp. 624–629.

ISMEA. 2022. Avicoli e uova. Available at: <https://www.ismeamercati.it/carni/avicoli-uova> Accessed: 21/11/2023

Jia, W., Slominski, B. A., Guenter, W., Humphreys, A., and Jones, O. 2008. The effect of enzyme supplementation on egg production parameters and omega-3 fatty acid deposition in laying hens fed flaxseed and canola seed. *Poultry science*, 87(10), 2005-2014. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00474>

Jiang, Z., Ahn, D. U., Ladner, L., and Sim, J. S. 1992. Influence of feeding full-fat flax and sunflower seeds on internal and sensory qualities of eggs. *Poultry Science*, 71(2), 378-382. <https://doi.org/10.3382/ps.0710378>

Kanbur, G., Göçmen, R. and Cufadar, Y. 2023. A comparative study on the effects of hemp seed oil versus four different UFA-rich seed oils' dietary supplementation on egg production performance, egg quality, and yolk fatty acids in laying hens. *Tropical Animal Health and Production*, 55(1), 6. <https://doi.org/10.1007/s11250-022-03421-2>

Khalafalla, M. K., and Bessei, W. 1995. Reliability of quasi-static compression as an indicator of eggshell quality. In *Proceedings of the 6th European Symposium on the Quality of Egg and Egg Products*, pp. 67-75.

Konca, Y., Cimen, B., Yalcin, H., Kaliber, M., and Beyzi, S. B. 2014. Effect of hempseed (*Cannabis sativa* sp.) inclusion to the diet on performance, carcass and antioxidative activity in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Korean Journal of Food Science of Animal Resource*, 34(2), 141-150. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2014.34.2.141>

Leeson, S., and Summers, J. D. 2012. *Commercial Poultry Nutrition Third Edition* (3^a Ed.). Nottingham University Press.

- Li-Chan, E. C. Y., and Kim, H. 2008. Structure and Chemical Compositions of Eggs. In: Mine, Y., Egg Bioscience and Biotechnology 1^a Ed. Wiley. pp. 1-95. <https://doi.org/10.1002/9780470181249.ch1>
- Lordelo, M., Fernandes, E., Bessa, R. J. B., and Alves, S. P. 2017. Quality of eggs from different laying hen production systems, from indigenous breeds and specialty eggs. Poultry Science, 96(5), 1485-1491. <https://doi.org/10.3382/ps/pew409>
- McNamara, D. J. 2013. Eggs. In: Caballero, B., Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition). Elsevier. pp. 132-138. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00086-6>
- Meluzzi, A., Sirri, F., Manfreda, G., Tallarico, N., and Franchini, A. 2000. Effects of dietary vitamin E on the quality of table eggs enriched with n-3 long-chain fatty acids. Poultry science, 79(4), 539-545. <https://doi.org/10.1093/ps/79.4.539>
- Meluzzi, A., Sirri, F., Tallarico, N., and Franchini, A. 2001. Replacing fish oil with marine algae to enrich chicken eggs with n-3 PUFA. Effects on quality traits [PolyUnsaturated Fatty Acids]. In Proceedings of the ASPA Congress-Recent Progress in Animal Production Science (Italy) (Vol. 2), pp: 433-435.
- Mierliță, D. 2019. Fatty acids profile and oxidative stability of eggs from laying hens fed diets containing hemp seed or hempseed cake. South African Journal of Animal Science, 49(2), 310-321. <https://doi.org/10.4314/sajas.v49i2.11>
- Neijat, M., Gakhar, N., Neufeld, J., and House J. D. 2014. Performance, egg quality, and blood plasma chemistry of laying hens fed hempseed and hempseed oil. Poultry Science, 93(11), 2827-2840. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-03936>
- Neijat, M., Suh, M., Neufeld, J., and House, J. D. 2016. Hempseed products fed to hens effectively increased n-3 polyunsaturated fatty acids in total lipids, triacylglycerol and phospholipid of egg yolk. Lipids, 51(5), 601-614. <https://doi.org/10.1007/s11745-015-4088-7>
- Odabaşı, A. Z., Miles, R. D., Balaban, M. O., and Portier, K. M. 2007. Changes in brown eggshell color as the hen ages. Poultry science, 86(2), 356-363. <https://doi.org/10.1093/ps/86.2.356>

Phipps, B., and Schluttenhofer, C. 2022. Perspectives of industrial hemp cultivation. . In: Pojić M. and Tiwari B. K. Industrial Hemp, Food and Nutraceutical Applications. Elsevier. pp. 1–36. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90910-5.00002-6>

Pihlanto, A., Nurmi, M., and Mäkinen, S. 2022. Industrial hemp proteins: Processing and properties. In: Pojić M. and Tiwari B. K. Industrial Hemp, Food and Nutraceutical Applications. Elsevier. pp. 125–146. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90910-5.00014-2>

Rabrenović, B. B., and Vujasinović, V. B. 2022. Industrial hempseed oil and lipids: Processing and properties. In: Pojić M. and Tiwari B. K. Industrial Hemp, Food and Nutraceutical Applications. Elsevier. pp. 95–124. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90910-5.00003-8>

Regolamento (CE) N. 1234/2007. 22 ottobre 2007. Riguardante l'organizzazione comune dei mercati agricoli e disposizioni specifiche per taluni prodotti agricoli. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:02007R1234-20110101&from=ET> Accessed: 23/10/2023

Regolamento (CE) N. 589/2008. 23 giugno 2008. Riguardante le norme di commercializzazione applicabili alle uova. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R0589> Accessed: 23/10/2023

Regolamento (UE) N. 1308/2013. 17 dicembre 2013. Riguardante l'organizzazione comune dei mercati dei prodotti agricoli. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013R1308> Accessed: 23/10/2023

Regolamento (UE) N. 1393/2022. 11 agosto 2022. Riguardante i tenori massimi di delta-9-tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC) nei semi di canapa e nei prodotti derivati. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32022R1393> Accessed: 01/02/2024

Roberts, J. R. 2004. Factors affecting egg internal quality and eggshell quality in laying hens. The Journal of Poultry Science, 41(3), 161-177. <https://doi.org/10.2141/jpsa.41.161>

Samiullah, S., Roberts, J., and Chousalkar, K. 2016. Oviposition time, flock age, and egg

position in clutch in relation to brown eggshell color in laying hens. *Poultry Science*, 95(9), 2052-2057. <https://doi.org/10.3382/ps/pew197>

Shahid, S., Chand, N., Khan, R. U., Suhail, S. M., and Khan, N. A. 2015. Alternations in cholesterol and fatty acids composition in egg yolk of Rhode Island Red x Fyoumi Hens fed with hemp seeds (*Cannabis sativa* L.). *Journal of Chemistry*, 2015, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2015/362936>

Sirri, F., and Meluzzi, A. 2011. Modifying egg lipids for human health. In: Immerseel, F. V., Nys, Y., Bain, M., Improving the safety and quality of eggs and egg products. Egg safety and nutritional quality. Woodhead Publishing. pp. 272–288. <https://doi.org/10.1533/9780857093929.3.272>

Sirri, F., Meluzzi, A., Tallarico, N., Franchini, A. and Iaffaldano, N. 2001. Flaxseed and marine algae as substitutes of fish oil in fortifying chicken eggs with n-3 PUFA. Proceedings IX European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products, Kusadasi, Turkey, pp. 217–222.

Skřivan, M., Englmaierova, M., Vít, T., and Skřivanova, E. 2019. Hempseed increases gamma-tocopherol in egg yolks and the breaking strength of tibias in laying hens. *Plos one*, 14(5), e0217509. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217509>

Sokołowicz, Z., Krawczyk, J., and Dykiel, M. 2018. The effect of the type of alternative housing system, genotype and age of laying hens on egg quality. *Annals of Animal Science*, 18(2), 541-556. <https://doi.org/10.2478/aoas-2018-0004>

Šťastník, O., Mrkvicová, E., and Pavlata, L. 2022. Industrial hemp in animal feed applications. In: Pojić M. and Tiwari B. K. *Industrial Hemp, Food and Nutraceutical Applications*. Elsevier. pp. 341–365. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90910-5.00012-9>

Taaifi, Y., K. Belhaj, F. Mansouri, Y. Rbah, N. Elbouanani, R. Melhaoui, A. Ben Moumen, E. Azeroual, H. Serghini-Caid, and A. Elamrani. 2023. Impact of Cannabis seed incorporation in layer diet on productive performance and egg quality traits. *Scientifica* (2023), 1-13. <https://doi.org/10.1155/2023/5565825>

Unaitalia. 2023. Relazione annuale 2023. Available at: <https://www.unaitalia.com/assemblea-nazionale-unaitalia-carni-bianche-restano-le-preferite-dagli-italiani-fatturato-a-74-mld-scendono-produzione-consumi-pro-capite-e-autosufficienza/> Accessed: 21/11/2023

Van Den Brand, H., Parmentier, H. K., and Kemp, A. B. 2004. Effects of housing system (outdoor vs cages) and age of laying hens on egg characteristics. *British Poultry Science* 45(6), 745-752. <https://doi.org/10.1080/00071660400014283>

Van Elswyk, M. E., Sams, A. R., and Hargis, P. S. 1992. Composition, functionality, and sensory evaluation of eggs from hens fed dietary menhaden oil. *Journal of Food Science*, 57(2), 342-344. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb05490.x>

Wu, J. 2014. Eggs and egg products processing. In: Clark, S., Jung, S., and Lamsal, B., *Food Processing, Principles and Applications* 1^a Ed. Wiley. pp. 437-455. <https://doi.org/10.1002/9781118846315.ch19>

Xu, Y., Li, J., Zhao, J., Wang, W., Griffin, J., Li, Y., Bean, S., Tilley, M., and Wang D. 2021. Hempseed as a nutritious and healthy human food or animal feed source: a review. *International Journal of Food Science*, 56(2), 530-543. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14755>

Xu, Y., Zhao, J., Hu, R., Wang, W., Griffin, J., Li, Y., Sun, X. S., and Wang, D. 2021. Effect of genotype on the physicochemical, nutritional, and antioxidant properties of hempseed. *Journal of Agriculture and Food Research*, 3, 100119. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100119>

Zhao, J., Wang, W., Li, Y., Sun, X., and Wang, D. 2022. Nutritional and chemical composition of industrial hemp seeds. In: Pojić M. and Tiwari B. K. *Industrial Hemp, Food and Nutraceutical Applications*. Elsevier. pp. 73–9. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90910-5.00013-0>