



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**FACOLTÀ DI AGRARIA**

**CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN SCIENZE  
E TECNOLOGIE ALIMENTARI**

**DIPARTIMENTO DI BIOTECNOLOGIE AGRARIE**

**TESI DI LAUREA**

**BETA GLUCANI E ARABINOXILANI DELL'ORZO:  
CARATTERISTICHE  
FUNZIONALI E TECNOLOGICHE**

Relatore:

Ch.mo Prof. GABRIELLA PASINI

Correlatore:

Dott. ELISA SELVATICO

Laureanda:

MIRKA SCHIAVON

ANNO ACCADEMICO 2010 – 2011



## INDICE

<b>Introduzione.....</b>	<b>5</b>
<b>Capitolo 1 - Struttura generale e biosintesi dei <math>\beta</math>-glucani e arabinosilani.....</b>	<b>13</b>
1.1 Struttura molecolare dei $\beta$ -glucani.....	13
1.2 Struttura molecolare degli arabinosilani.....	15
1.3 Eterogeneità strutturale dei $\beta$ -glucani dell'orzo.....	20
1.4 Eterogeneità strutturale degli arabinosilani (AX) dell'orzo.....	22
<b>Capitolo 2 - Contenuto di <math>\beta</math>-glucani e arabinosilani nella cariosside dell'orzo e nei vari tessuti.....</b>	<b>25</b>
<b>Capitolo 3 - Proprietà chimico-fisiche dei <math>\beta</math>-glucani e arabinosilani.....</b>	<b>31</b>
3.1 Solubilità in acqua ed estrazione dalle pareti cellulari.....	31
3.2 Proprietà dei $\beta$ -glucani in soluzione.....	32
3.3 Proprietà degli AX in soluzione.....	35
<b>Capitolo 4 - Processi chimico-fisici per la produzione di fibre isolate e frazioni di orzo....</b>	<b>39</b>
4.1 Estrazione in soluzione acquosa.....	39
4.2 Frazionamento a secco del chicco.....	44
<b>Capitolo 5: Proprietà funzionali dei <math>\beta</math>-glucani e degli arabinosilani.....</b>	<b>49</b>
5.1 Proprietà funzionali dei $\beta$ -glucani.....	49
5.1.1 Riduzione del colesterolo.....	50
5.1.2 Abbassamento della glicemia.....	51
5.1.3 Effetto sul senso di sazietà.....	52
5.1.4 Effetti prebiotici ed immunostimolanti.....	52
5.2 Proprietà funzionali degli arabinosilani.....	54
5.2.1 Funzione prebiotica.....	54
5.2.2 Funzione ipoglicemizzante.....	55
5.2.3 Altre proprietà funzionali.....	55
<b>Capitolo 6 - Utilizzo di fibra d'orzo e/o frazioni isolate nei prodotti alimentari.....</b>	<b>57</b>
6.1 La fibra d'orzo in pane e in pasta.....	57

<i>6.2 Uso potenziale dei <math>\beta</math>-glucani nei prodotti dell'industria lattiero-casearia.....</i>	<i>65</i>
<i>Capitolo 7 - Effetto dei trattamenti tecnologici sulle proprietà funzionali dei <math>\beta</math>-glucani....</i>	<i>67</i>
<i>Capitolo 8: Quadro normativo europeo sugli alimenti funzionali.....</i>	<i>69</i>
<i>Conclusioni.....</i>	<i>71</i>
<i>Lista delle abbreviazioni.....</i>	<i>73</i>
<i>Bibliografia.....</i>	<i>75</i>
<i>Sitografia.....</i>	<i>80</i>

## INTRODUZIONE

Gli “alimenti funzionali” sono prodotti alimentari che, oltre a soddisfare le normali aspettative organolettiche e nutrizionali, apportano benefici alla salute umana, grazie a particolari ingredienti presenti e/o aggiunti.

Il termine “funzionale” fu usato per la prima volta in Giappone quando, a metà anni '80, il Ministro della Sanità stabilì di creare la categoria dei cibi con potenzialità curative nel tentativo di frenare il vertiginoso aumento della spesa sanitaria e farmacologica.

Sinonimo di “alimento funzionale” (detto anche *healthy food*) è nutraceutico (da *nutraceutical*, termine sorto in America dalla fusione di *nutrition* e *pharmaceutical*) atto ad evidenziare classi di prodotti aventi specifiche proprietà terapeutiche oltre che nutrizionali.

Negli Stati Uniti sono così nati gli *Health Claims* che, utilizzando simboli e spiegazioni in etichetta, avvisano il consumatore che quel dato alimento, come parte di una dieta controllata, può essere salutare.

In Italia, così come in Europa, non sono ammesse indicazioni di questo tipo ed attualmente nessun alimento può vantare una funzione preventiva e/o curativa.

I prodotti funzionali leader presenti ora sul mercato sono soprattutto quelli fortificati con fibre (in particolare cereali) e antiossidanti (sottoforma di integratori).

In questi ultimi venti anni si è assistito ad una evoluzione del concetto di alimentazione che, da un sistema atto esclusivamente a fornire all'organismo nutrienti ed energia, ha acquisito l'ulteriore funzione di assicurare benessere e salute, riducendo il rischio di insorgenza di alcune malattie. Per questi motivi sono stati concepiti e si stanno sempre più affermando gli “alimenti funzionali”, caratterizzati da proprietà nutrizionali-salutistiche per la presenza di componenti che interagiscono più o meno selettivamente con una o più funzioni fisiologiche dell'organismo (biomodulazione).

I cereali, quali frumento ed orzo, si prestano perfettamente ad essere lavorati sia per ottenere ingredienti ricchi in composti bioattivi che per lo sviluppo di alimenti funzionali. Infatti, da una parte contengono numerosi composti bioattivi (beta-glucani, tocotrienoli, folati, fruttani, fitosteroli, composti fenolici, fitati), dall'altra sono alimenti che entrano ampiamente e frequentemente nella nostra dieta e che incontrano il favore del consumatore per facilità e semplicità d'uso.

La progettazione e lo sviluppo di alimenti funzionali, nonché l'incorporazione di ingredienti non convenzionali arricchiti in composti bioattivi, richiedono lo studio di bilanciate formulazioni e l'utilizzo di appropriate tecnologie di trasformazione, per correggere lo scadimento tecnologico che talvolta viene conferito dall'aggiunta di tali ingredienti. L'alimento funzionale, infatti, per essere apprezzato dal consumatore deve avere eccellenti caratteristiche sensoriali (consistenza, flavour, friabilità, qualità di cottura o qualità di imbibizione) e facilità d'uso (praticità) paragonabili a quelle del prodotto non funzionalizzato.

L'elevata qualità sensoriale dei prodotti finiti è un requisito indispensabile per l'affermazione sul mercato di tale tipologia di prodotto, dal momento che il consumatore non è disposto a pagare di più un alimento con valore aggiunto allorquando lo stesso risulti scadente dal punto di vista edonistico.

Attraverso le recenti pubblicità, focalizzate sulla crescente incidenza di diverse malattie croniche e dell'obesità, e che dimostrano il nesso tra l'assunzione di fibre alimentari e i benefici sulla salute, i consumatori hanno accresciuto la consapevolezza di una buona alimentazione e aumentato l'interesse negli alimenti e negli ingredienti alimentari ricchi in fibre.

L'orzo ha accompagnato tutta la storia dell'uomo dalla nascita dell'agricoltura, coltivato per lo più a fornire i prodotti di base per l'alimentazione; in epoca moderna è ampiamente sfruttato nella mangimistica e per la produzione di bevande alcoliche, soprattutto birra.

In Occidente l'orzo destinato all'alimentazione umana viene perlato (la cariosside d'orzo viene privata degli strati più esterni con un sistema a rulli abrasivi) e utilizzato sottoforma di minestre, creme o fiocchi, adatti soprattutto a

bambini ed anziani; non solo, in Italia una piccola parte di orzo viene impiegata come surrogato del caffè (Foto 1).



*Foto 1 - Spiga di orzo*

Di recente l'orzo, oltre a questi impieghi, ha trovato nuove applicazioni in campo dietetico. Negli ultimi dieci anni sono state coltivate numerose varietà di orzo canadese, tra cui genotipi della subspecie cerosa quali Alamo, Fibar e Rattan, ad elevato contenuto in amilosio, destinate ad uso alimentare e non per la produzione di malto per birrificazione. L'orzo, infatti, è un cereale ricco di fibra alimentare soprattutto di beta-glucani che, insieme ad altre molecole come gli arabinoxilani, costituiscono la SDF (Soluble Dietary Fibre) o frazione solubile della fibra.

La cariosside dell'orzo è ricca di sostanze antiossidanti e ipocolesterolemizzanti che le attribuiscono funzioni preventive verso forme patologiche quali l'aterosclerosi e i tumori. Essa risulta essere anche un'ottima fonte di fibre

solubili ed insolubili e di componenti bioattivi, come vitamina E (compresi i tocotrienoli) , vitamine del complesso B, sali minerali e composti fenolici.

Poiché in numerosi studi clinici, approvati dalla FDA, (Food and Drug Administration), è stata verificata una correlazione positiva tra contenuto negli alimenti di fibra solubile e riduzione della colesterolemia e glicemia nell'uomo, l'orzo viene considerato un integratore importante nella dieta.

Gli obiettivi di questo manoscritto sono volti, quindi, a rivedere le nostre attuali conoscenze sui principali costituenti delle fibre alimentari dell'orzo, sui processi per la produzione di orzo arricchito in fibre (isolate e frazionate) e le loro applicazioni nei prodotti alimentari.



## INTRODUCTION

Functional foods are products that not only meet the sensorial and nutritional expectations, they also give beneficial to the human health, thanks to special ingredients which are added or naturally present in foods.

The term “functional” was used for the first time in Japan when, in the mid ‘80s, the Minister of Health agreed to create the category of foods with curative potential in attempt to curb the soaring cost of health care and medication.

Synonym for “functional food” (also known as healthy food) is nutraceutical (american term, created by merging the terms “nutrition” and “pharmaceutical”) term which highlights classes of products with therapeutic properties as well as the nutritional ones.

Health claims born in the United States were the use of symbols and explanations on the product label informs the consumer that such food, as a part of a controlled diet, can be healthy.

In Italy, as well as in Europe, such claims are not allowed , actually foods cannot boast a preventive and/or a curative effect.

Functional products which are leaders on the market are those fortified with fibre (especially grains) and antioxidants (in the form of supplements).

In these last twenty years it had seen an evolution of the concept of nutrition. In fact food intake aimed exclusively to supply the nutrients and energy for the human body, but nowadays it has acquired the additional function of ensuring well-being and health, reducing the risk of some disease. For these reasons functional foods were developed and they are becoming very interesting and used by consumers, since these foods are characterized by healthy properties due to the presence of components which interact more or less selectively with one or more physiological functions (biomodulation).

Cereals, such as wheat and barley, are perfectly suitable to be processed and to form to ingredients rich in bioactive compounds useful for development of functional foods. In fact, cereals contain several bioactive compounds such as

beta-glucans, tocotrienols, folate, fructans, phytosterols, phenolic compounds, phytates, moreover they are mainly present in our diet thanks to their practical use for consumers. The design and development of functional foods, as well as the incorporation of no-conventional ingredients enriched in bioactive compounds, require the study of balanced formulations and the use of appropriate processing technologies, to correct the deterioration that is sometimes bestowed by technology of these ingredients. The functional food, in fact, to be appreciated by the consumer, it must have excellent sensory characteristics such as texture, flavour, crispness, baking quality or quality of absorption, easy to use and the convenience, comparable to the conventional products.

The high sensory quality of the foodstuffs is a prerequisite for their success in the market, because consumers are not willing to pay more for a food with added value when the same results poor in terms of hedonistic.

Through recent claims, focusing on the increasing incidence of various chronic diseases and obesity which demonstrate the link between the dietary fibre intake and health benefits, consumers increased the interest in foods and food ingredients rich in fibre.

Barley has been part of the human history from the birth of agriculture, which has grown mainly to provide the basis products for nutrition; in modern times it is widely used in animal feed and for the production of alcoholic beverages, especially beer.

In the West countries, barley is pearled for human consumption (the outer layers of the kernel of barley are removed with an abrasive roller system) and used in the form of soups, creams and bows, especially suitable for children and for elderly people; furthermore, in Italy a small amount of barley is used as a coffee substitute.

Recently, barley, in addition to these uses, has found new applications in the diet. In the last ten years many barley varieties (from Canada) have been cultivated, including waxy genotypes of subspecies as Alamo, Fibar and Rattan,

having high amylose content specifically addressed for food production and not for brewing. Barley, in fact, is a cereal rich in dietary fibre, particularly beta-glucans, which, together with other molecules such as arabinoxylans, form the soluble fraction of the fibre.

Barley kernel is rich in antioxidants and cholesterol-lowering components thus acting as preventive agents towards pathologies such as atherosclerosis and cancer. Moreover the kernel of barley is an excellent source of soluble and insoluble fibres and bioactive components, such as vitamin E (including tocotrienols), complex B vitamins, minerals and phenolic compounds.

Since in many clinical studies, approved by FDA, it has been showed a positive correlation between the content of soluble fibre in food and the reducing cholesterol and glycaemia in man, barley has become an important supplement in the diet.

This manuscript aims to review our current knowledge of the major constituents of the dietary fibre in barley. Moreover, technologies for the production of enriched barley fibre (isolated and fractionated) and their applications in food products have been explored.



CAPITOLO 1  
STRUTTURA GENERALE E BIOSINTESI DEI  $\beta$ -GLUCANI E  
ARABINOXILANI

### 1.1 Struttura molecolare dei $\beta$ -glucani

I  $\beta$ -glucani sono biopolimeri ampiamente diffusi in natura, dato che si trovano nelle strutture parietali di molti batteri, lieviti, funghi, alghe e piante superiori (avena, orzo, segale). Dal punto di vista molecolare i  $\beta$ -glucani sono omopolimeri lineari costituiti da molecole a collegamento misto di D-glucopiranosio (glucosio), legate due o tre volte consecutive attraverso il legame  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) e separate da un singolo legame  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), costituendo in tal modo dei frammenti definiti DP3 e DP4 (Degree Polymerization) a seconda del grado di polimerizzazione. Meno frequenti invece sono i segmenti piú lunghi DP  $\geq$  5 aventi grado di polimerizzazione 5 – 28 (Fig. 1).

Dai polimeri lineari possono inoltre dipartirsi ramificazioni costituite da catene di D-glucosio, connesse con legami  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) o  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2).

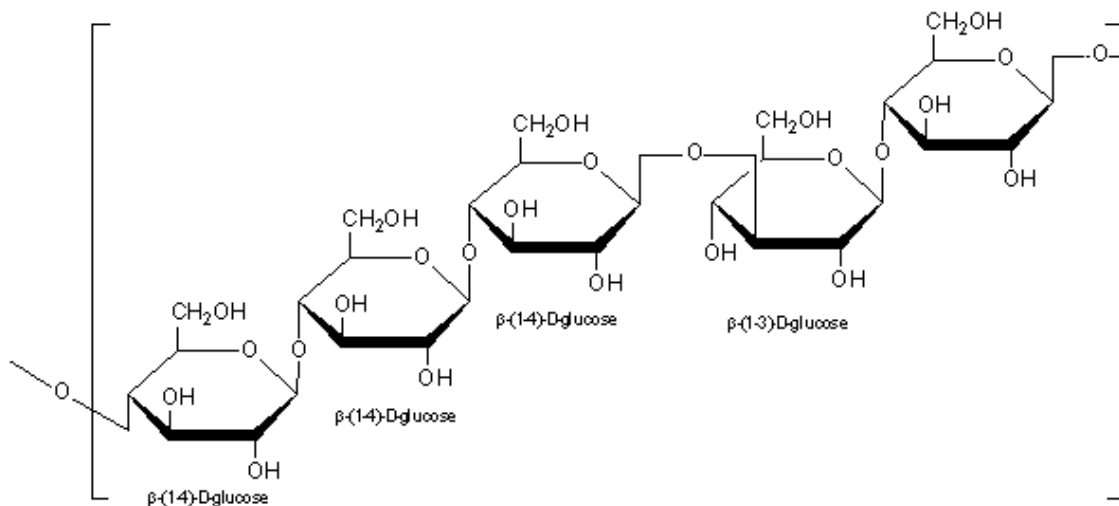


Fig. 1 – Glucani: legami  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)

Le caratteristiche molecolari dei  $\beta$ -glucani sono state interpretate attraverso le analisi degli oligomeri ottenuti tramite digestione dei polimeri per mezzo di una idrolasi specifica (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucano, che rilascia per l'appunto unità trisaccaridi DP3 (3-O-  $\beta$ -D-cellobiosio-D-glucosio) e unità tetrasaccaridi DP4 (3-O-  $\beta$ -D-cellotriosio-D-glucosio), i quali rappresentano il 90-95% del totale degli oligosaccaridi, nonché frammenti a catena più lunga (DP  $\geq$  5) che corrispondono ad un 5-10% (Fig. 2).

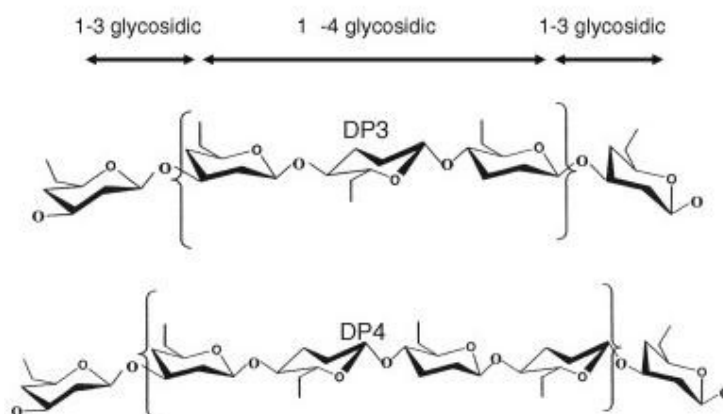


Fig. 2 – Struttura dei  $\beta$ -glucani: frammenti definiti DP3 e DP4 ottenuti dopo l'azione della lichenasi

Nonostante l'arrangiamento non-casuale dei singoli (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 4)  $\beta$ -collegamenti, le molecole di cellotriosio, cellotetraosio e quelle più lunghe di cello-oligomeri si trovano disposte in modo indipendente e casuale nelle catene dei  $\beta$ -glucani.

$\beta$ -glucani di specie diverse di cereali condividono la stessa struttura molecolare generale, nella quale però le differenze si manifestano nel rapporto tra i  $\beta$ -legami (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 4), nella presenza e quantità di frammenti lungo-simili di cellulosa, nel rapporto tra le unità DP3 e DP4, e nelle dimensioni molecolari.

Il meccanismo di biosintesi dei  $\beta$ -glucani spiega in parte la frequenza e la distribuzione delle unità lungo-simili di cellulosa nelle catene polimeriche; il

complesso enzimatico coinvolto nella biosintesi dei  $\beta$ -glucani è costituito da un enzima cellulosa-sintasi, che porta alla formazione di unità pari di cellodestrina e cellobiosio, e da un enzima glicosil-transferasi, che aggiunge un altro residuo glicosidico per formare rispettivamente unità dispari di cellotriosio e di catene superiori.

## **1.2 Struttura molecolare degli arabinoxilani**

Gli xilani sono dei polisaccaridi appartenenti alla categoria delle emicellulose, caratterizzati dalla presenza di xilosio quale unità monomerica di base. Sono da ritenersi fra i composti più diffusi in natura in quanto entrano a far parte della parete cellulare vegetale e pertanto rientrano nella composizione di materiali legnosi, gusci, paglie ecc.

La catena principale degli xilani è costituita da  $\beta$ -D-xilopiranosio le cui unità sono legate fra loro con legame (1 $\rightarrow$ 4); irregolarmente e con frequenza variabile a seconda della specie vegetale e/o della parte della pianta interessata, su questa catena possono innestarsi ramificazioni, costituite ancora da xilosio, oppure da arabinosio in forma L-arabinofuranosica, acido 4-O-metil-glucuronico, mannosio, galattosio, ramnosio. L'abbondanza delle ramificazioni costituite da arabinosio determina una sottoclasse di emicellulose anch'essa molto frequente in natura, ossia gli arabinoxilani.

Gli arabinoxilani sono presenti nei tessuti come frazioni estraibili e non estraibili in acqua (WE-AX e WU-AX); sono costituiti da strutture lineari formate da molecole di  $\beta$ -D-xilo-piranosio, unite attraverso legami (1 $\rightarrow$ 4) glucosidici, nelle quali sono presenti residui di  $\alpha$ -L-arabino-furanoside legati in posizione O-2, O-3 e/o entrambi (Fig. 3).

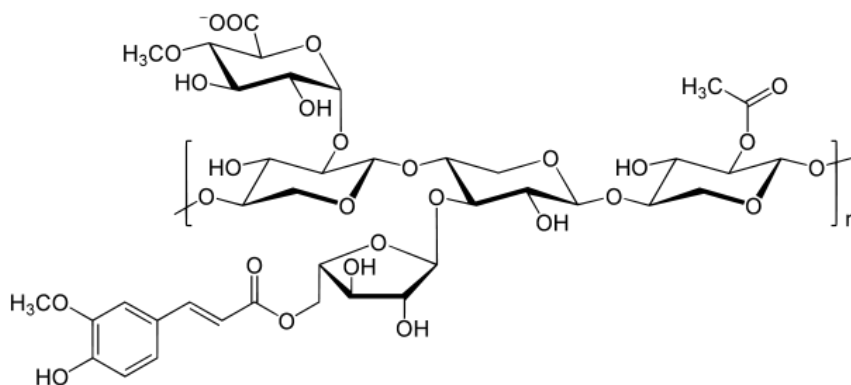


Fig. 3 – Arabinoxilani: struttura dello xilano con arabinosio in posizione O-3

I residui di  $\alpha$ -L-arabinosio risultano essere gli elementi principali nella struttura molecolare degli arabinoxilani, dove si possono osservare delle regioni:

1. non-sostituite
2. mono-sostituite in posizione O-2
3. mono-sostituite in posizione O-3
4. di-sostituite in posizione O-2,3

Talvolta il rapporto tra arabinosio e xilosio (A/X) viene utilizzato per caratterizzare la struttura degli AX, tuttavia tale caratterizzazione è approssimativa e spesso la struttura viene meglio descritta dal modello di sostituzione con residui di arabinosio (Fig. 4).

La distribuzione di arabinosio lungo la catena dello xilano non è casuale; i modelli strutturali sperimentali suggeriscono ci siano molte regioni ad elevata densità con di-sostituzioni, separate dalle regioni meno densamente mono-sostituite attraverso le sequenze prive di sostituzioni (Fig. 4).



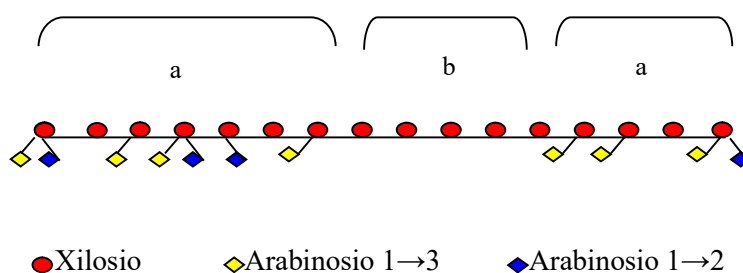


Fig. 4 – Modello degli AX con regioni densamente sostituite (a) e non-sostituite (b)

Mentre le caratteristiche strutturali degli WE-AX sono ben documentate, meno disponibili sono invece le informazioni relative agli WU-AX pur essi rappresentando la maggior parte degli AX presenti nelle pareti delle cellule della mandorla farinosa della cariosside.

Gli arabinoxilani (AX) presenti nella crusca di riso, sorgo, mais e miglio sono più complessi di quelli dell'orzo dal momento che le catene laterali contengono, oltre ai residui di arabinosio, piccole quantità di xilosio, galattosio, acido  $\alpha$ -D-glucuronico.

Le caratteristiche strutturali eterogenee degli AX, che possono variare a seconda della loro origine genotipica o cellulare, includono:

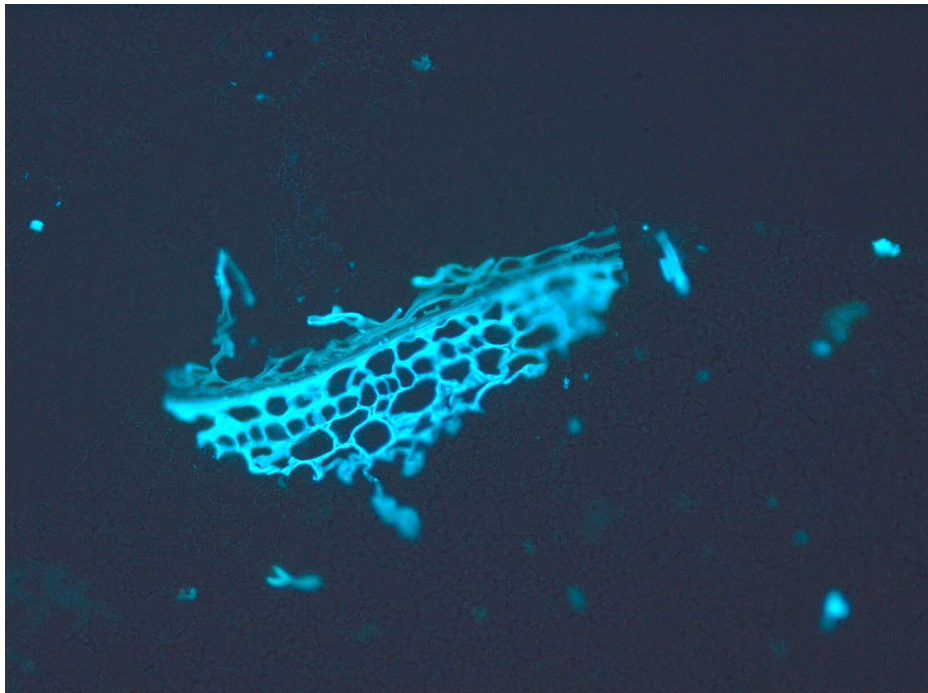
- il rapporto tra i residui di arabinosio e di xilosio
- la quantità relativa delle mono-, di-, e non-sostituzioni dello xilopentosio
- la presenza di altri sostituenti quali l'acido ferulico, para-cumarico, acetico e idrossicinnamico

Come già osservato, il rapporto tra i residui di arabinosio/xilosio indica un grado di ramificazione della catena polimerica, ma è solamente un indicatore approssimativo della struttura molecolare che meglio si presta a descrivere il modello di sostituzioni nella struttura lineare dello xilano.

Caratteristica unica degli AX è la presenza di acido idrossicinnamico, acido ferulico e acido paracumarico, esterificati con l'arabinosio in posizione O-5 e

legati ai residui di xilosio in posizione O-3 (l'esterificazione è intraprotoplasmatica e si svolge nel complesso del Golgi con meccanismo non ancora chiarito).

Gli acidi ferulici (DDFA o dehydrodiferulic acids) fungono da agenti di collegamento trasversale tra i polisaccaridi, contribuiscono all'assemblaggio della parete, promuovono la coesione dei tessuti, contengono l'espansione delle cellule e controllano le proprietà meccaniche dei tessuti (gli acidi ferulici degli AX appaiono fluorescenti quando visualizzati al microscopio con lente UV. Foto 2 ).



*Foto 2 -Microscopia ottica con lente UV: pareti cellulari di pasta di farro, e dimostrata fluorescenza degli acidi ferulici.  
(E. Selvatico, tesi di dottorato, dati in pubblicazione)*

L'enzima ferulico-esterasi, infatti, attraverso la dimerizzazione di radicali fenolici in esteri idrossiferulici, permette la formazione di legami covalenti tra gli AX e gli altri componenti della parete cellulare ( proteine, lignina ).

Gli acidi idrossicinnamici sono noti per essere direttamente esterificati o eterificati alla superficie della lignina, ed è probabile che tutto l'acido ferulico eterificato alla lignina sia nel contempo esterificato agli AX. Sono stati proposti anche vari legami esteri diretti tra acido uronico con glucuronoxilani e gruppi ossidrilici superficiali della lignina, legami etere tra AX e lignina che coinvolgerebbero, per esempio, il gruppo ossidrile primario dell'arabinosio sito ai lati della catena (tutt'oggi però tali collegamenti non sono stati dimostrati).

I geni responsabili della biosintesi degli AX non sono ancora stati identificati, ma si presume essi codifichino degli enzimi appartenenti alla famiglia delle cellulosa-sintasi, come la GT2 glicosil-transferasi.

La sintesi della catena lineare di  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-xilano è catalizzata dalla  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-xiliosio-transferasi, che utilizza UDP-D-xilosio quale substrato donatore; l'enzima è stato recentemente osservato e isolato dalle membrane microsomiali dell'endosperma di orzo in via di sviluppo. L'aggiunta di arabinofuranoside allo xilano, invece, sembra sia dovuta ad enzimi esogeni che includono l'arabinosio-transferasi.

Da studi *in vivo* su xiloglucani e glucuroxilani è stato osservato che la polimerizzazione della catena di xilano e l'inserimento delle ramificazioni di arabinofuranoside si verificano contemporaneamente in sincronia.

L'arabino-transferasi favorisce le di-sostituzioni contigue e le non-sostituzioni dello xilosio con arabinofuranoside; il rapporto delle non-sostituzioni dei residui di xilosio è di 4:1 nei tessuti giovani dell'orzo, mentre scende a 1:1 nei cotiledoni maturi.

Sembra che la mancata sostituzione sia mediata dall'azione di un altro enzima, l'arabinofurano-idrolasi, in risposta a sollecitazioni esterne che si verificano durante lo sviluppo della pianta, come le variazioni di temperatura, la disponibilità dei metaboliti o la presenza di agenti patogeni.

Recentemente è stato dimostrato come avviene la sequenza di deposizione dei singoli polisaccaridi nella parete cellulare e nell'endosperma dell'orzo in via di sviluppo, osservando tale attività attraverso microscopi elettronici mediante

anticorpi monoclonali specifici. E' stato visto che la cellulosa viene depositata per prima nella parete cellulare in via di sviluppo (tra il 3° e il 4° giorno dopo l'impollinazione), seguita dai  $\beta$ -glucani (5 giorni dopo),  $\beta$ -(1→4)-mannani (6 giorni dopo), arabinogalattani (7 giorni dopo) e arabinosilani (8 giorni dopo). Tuttavia la struttura della parete cellulare e le sue proprietà vengono ulteriormente modificate nelle fasi post-sintesi e post-deposizione, in risposta a cambiamenti ambientali e sollecitazioni da agenti patogeni. Talvolta, per esempio, diminuisce la solubilità degli AX, oppure aumenta la loro propensione nell'associarsi alla cellulosa, con conseguente maggiore rigidità della parete stessa. Anche i legami covalenti dei polimeri e le esterificazioni obbligate portano a cambiamenti nelle proprietà chimico-fisiche, strutturali e meccaniche della parete.

Composizione, struttura e proprietà della parete cellulare sono fondamentali per la scelta della destinazione d'uso dell'orzo, in particolare per gli effetti che hanno sull'alimentazione umana ed animale.

### **1.3 Eterogeneità strutturale dei $\beta$ -glucani dell'orzo**

Sebbene tutti i  $\beta$ -glucani presenti nei cereali condividono la stessa struttura molecolare generale, i  $\beta$ -glucani dell'orzo si distinguono nettamente da quelli di avena e frumento.

Nell'orzo la quantità di unità di cellotriosio, espressa in percentuale in peso di tutti gli oligomeri rilasciati dall'idrolisi, può variare da 52% a 69%, mentre la quantità di unità di cellotetraosio può variare da 25% a 33%. Il rapporto molare delle unità DP3/DP4 ottenute è caratteristico dei  $\beta$ -glucani a seconda della loro fonte; nei  $\beta$ -glucani dell'orzo il rapporto molare tra DP3/DP4 può variare da 2,3-3,4 ed è superiore a quello dell'avena (1,5-2,3) ma inferiore a quello del frumento (3-4,5). Le differenze nel rapporto tra DP3/DP4, osservate nei  $\beta$ -glucani isolati da campioni di orzo di specie diverse, possono essere attribuite a fattori genotipici ed ambientali (anche se non sono stati stabiliti rapporti specifici

tra l'ambiente e le caratteristiche strutturali dei  $\beta$ -glucani, sembra che temperatura relativamente alta ed abbondanti precipitazioni favoriscano un minor rapporto tra DP3/DP4).

La struttura molecolare dei  $\beta$ -glucani, provenienti da specie d'orzo canadesi differenti nella composizione dell'amido, ed estraibili in acqua a 45°C e a 95°C, è stata esaminata in dettaglio; si è pertanto constatato che i  $\beta$ -glucani, appartenenti a genotipi con caratteristiche di amido ceroso, mostrano una proporzione molare più elevata in DP3/DP4 (3,1-3,2) rispetto a genotipi ad alto tenore in amilosio (2,8-3,1) o con amido normale (2,5-2,9).

Questa analisi dei  $\beta$ -glucani estratti dai chicchi d'orzo conferisce una struttura media molecolare di tali polimeri, ma in realtà maschera l'eterogeneità strutturale dei  $\beta$ -glucani, legata alla loro localizzazione differenziata nei vari tessuti del seme.

Recenti risultati, non pubblicati, hanno infatti determinato la struttura molecolare dei  $\beta$ -glucani isolati nel pericarpo, nello strato aleuronico e nell'endosperma, facendo osservare grandi differenze nel rapporto molare di unità DP3/DP4 a seconda del tessuto. In generale, i  $\beta$ -glucani presenti nello strato aleuronico e nei tessuti del pericarpo hanno un rapporto DP3/DP4 molto più elevato rispetto ai loro omologhi nell'endosperma.

Inoltre, sembra che la localizzazione specifica dei  $\beta$ -glucani nel seme influisca sulla struttura molecolare di questi polimeri; pertanto le caratteristiche strutturali distintive dei  $\beta$ -glucani possono essere parzialmente conservate nelle frazioni del cereale ottenute con processi fisici di frazionamento della granella. I  $\beta$ -glucani presenti nei sottoprodotti della perlatura, ottenuti tramite strofinamento abrasivo degli strati esterni della cariosside dell'orzo privata di glume, infatti, hanno mostrato una proporzione molare maggiore in DP3/DP4 (3,3-3,6) rispetto a quelli presenti nelle farine o nelle frazioni ricche in fibra (2,8-3), ottenute successivamente dalla macinazione con rullo del seme perlato.

Per tal motivo, si rende necessario un perfezionamento del processo di frazionamento fisico del seme per poter generare frazioni contenenti i tessuti desiderati e i polisaccaridi con caratteristiche molecolari distinte.

Infine l'estrazione, in acqua o mediante solventi alcalini, dei  $\beta$ -glucani dalla parete cellulare dell'endosperma o dal chicco d'orzo intero, ha indicato variazioni strutturali legate alla loro diversa solubilità e proprietà di estrazione; l'estrazione con solventi alcalini, infatti, richiede una maggior temperatura nonché un rapporto DP3/DP4 leggermente più elevato rispetto all'estrazione in acqua.

#### **1.4 Eterogeneità strutturale degli arabinoxilani (AX) dell'orzo**

Gli AX presentano differenti caratteristiche chimico-fisiche di solubilità, viscosità, gelificazione ed idratazione, che sono alla base delle loro proprietà funzionali nei diversi processi del sistema alimentare. In generale, le proprietà chimico-fisiche delle macromolecole dipendono sostanzialmente dalla conformazione delle stesse, nonché dalle interazioni tra catena-catena e tra le catene dei polimeri con il solvente di estrazione.

Secondo alcuni studi di diffrazione a raggi X della fibra, gli xilani vengono descritti come estese catene che assomigliano a fili di nastro arrotolato, per tre volte simmetrici. Questa conformazione estesa è spesso confrontata con quella dei polisaccaridi aventi legami  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) come la cellulosa e le catene dei mannani, ma in realtà la tripla simmetria degli xilani differisce notevolmente dalla conformazione a piega a doppia simmetria tipica della cellulosa (fattore tra l'altro non favorevole per la sua associazione alle catene degli xilani). Inoltre, la catena con legami  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) dello xilano è più flessibile rispetto a quella limitata della cellulosa e dei mannani.

Nonostante la flessibilità intrinseca delle catene di xilani, gli AX sono generalmente indicati come molecole rigide, data la conformazione estesa

osservata allo stato cristallino ed erroneamente attribuita alla rigidità della catena polimerica.

In realtà, la rigidità della catena polimerica viene misurata direttamente mediante la lunghezza di persistenza ( $L_p$ ), che rappresenta una stima della lunghezza attraverso la quale la propagazione della catena in una data direzione viene conservata. Valori di  $L_p$  di circa 3-5 nm, corrispondenti a 6-10 residui di xilosio, sono previsti per il modello molecolare dello xilano.  $L_p$  è stata anche determinata per gli AX in soluzione; a seconda del metodo utilizzato per il calcolo, sono stati ottenuti diversi valori assoluti:  $L_p$   $7.8 \pm 1.4$  nm o  $3.1 \pm 0.6$  nm. Questi dati, se confrontati con quelli di polimeri con legami molto flessibili o molto rigidi, sono tipici di polisaccaridi semi-flessibili quali i galattomannani che si comportano come spire casuali.

Il comportamento della spiralizzazione casuale degli AX è ulteriormente confermato dal parametro idrodinamico  $\nu$  calcolato dal raggio di rotazione in relazione al peso molecolare ( $R_g \approx M^{0.5}$ ). Tale parametro dipende dalla flessibilità della catena e per gli WE-AX è stato riscontrato un valore di 0.47, il quale indica un comportamento di spirali casuali in contrasto, quindi, con il carattere di rigidità solitamente attribuito agli AX ( $\nu = 1$  per una catena estesa completamente rigida,  $1/3$  per una sfera compatta e 0.5 per le catene gaussiane).

E' stato inoltre evidenziato che la presenza di arabinosio ai lati della catena non ha alcun effetto significativo sulla conformazione rigida dello xilano, e nemmeno la  $L_p$  è influenzata dal rapporto tra arabinosio/xilosio, potendo quindi concludere che le sostituzioni di arabinosio non hanno alcuna influenza reale sul comportamento conformazionale degli AX in soluzione.

Nel settore dei cereali, il rapporto arabinosio/xilosio è variabile in funzione alle cultivar; nel frumento, ad esempio, il grado di ramificazione dipende dal tipo di parete cellulare: gli AX del pericarpo, dello scutello e dell'embrione sono relativamente molto sostituiti con arabinosio (arabinosio/xilosio  $>1$ ), mentre quelli dello strato aleuronico e dello strato ialino sono scarsamente sostituiti (arabinosio/xilosio  $<3$ ).

Grandi differenze nel grado di sostituzione degli AX sono state dimostrate nell'orzo, a causa della loro origine istologica; nell'orzo il rapporto tra arabinosio/xilosio degli AX presenti nei tessuti del pericarpo (1,15) è doppio rispetto a quello degli AX dello strato aleuronico (0,66), mentre risulta avere valori intermedi nell'endosperma (0,92). Normalmente i tessuti dell'endosperma si ritrovano essenzialmente nelle farine, mentre le parti esterne del seme sono sempre associate alle frazioni di crusca.

In generale, però, i contenuti dei residui di xilopentosio non-sostituiti (47%-65%), mono-sostituiti (20%-25%) e di-sostituiti (19%-26%) sono simili a quelli riscontrati nel frumento. Tuttavia, mentre in quest'ultimo le unità di xilopentosio O-2 mono-sostituite sono rare, nell'orzo sono presenti in notevole quantità. Gli AX estraibili in acqua presentano molte regioni densamente sostituite, contengono una quantità inferiore di xilopentosio non-sostituito e maggiori quantità di xilopentosio mono-sostituito in posizione O-2.

Lo stesso contenuto di xilopentosio O-2 monosostituito varia tra gli AX estraibili in acqua (6%-16%) e quelli estraibili in solvente alcalino come l'idrossido di bario ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ).

Inoltre, attraverso lo studio degli AX dell'orzo estraibili in solvente alcalino, sono state osservate anche alcune differenze genotipiche nei modelli di sostituzione; è stato visto, per esempio, che la quantità di xilopentosio non-sostituito è maggiore nei genotipi amido-ceroso e amido-amilosico.

Infine, anche l'entità della frazione ferulica presente negli AX dell'orzo è variabile, in quanto dipende dai tessuti: gli AX presenti nella parete delle cellule dell'endosperma sono normalmente leggermente esterificati con l'acido ferulico, mentre gli AX presenti nella parete delle cellule dello strato aleuronico e del pericarpo sono sempre altamente esterificati.



## CAPITOLO 2

### CONTENUTO DI $\beta$ -GLUCANI E ARABINOXILANI NELLA CARIOSSIDE DELL'ORZO E NEI VARI TESSUTI

Il chicco d'orzo si distingue per l'elevato contenuto di  $\beta$ -glucani che può variare dal 2,5% al 11,3%, percentuale nettamente superiore a quella normalmente riscontrata nell'avena (2,2-7,8%), segale (1,2-2%) e frumento (0,4-1,4%). La loro presenza è associata a diversi fattori e alle interazioni tra gli stessi, ossia:

- ✓ fattori genetici: l'influenza maggiore sul contenuto di  $\beta$ -glucani è determinata da un locus sul cromosoma 2(2H), in particolare nei genotipi di orzo a composizione anomala dell'amido (ceroso o ad alto tenore di amiloso); le caratteristiche ceroso dell'amido e gli elevati livelli di  $\beta$ -glucani vengono ereditate contemporaneamente. Inoltre, differenze significative si possono osservare tra specie d'orzo a cariosside nuda e a cariosside vestita (Tabella 1)
- ✓ fattori ambientali: il contenuto di  $\beta$ -glucani generalmente aumenta quando l'orzo viene coltivato in condizioni di caldo – secco; ne risente invece negativamente quando i periodi di calore o di stress idrico sono troppo prolungati, specie se si verificano nella fase di maturazione in cui avviene l'accumulo delle sostanze nutritive

I fattori genetici e ambientali influenzano anche la biosintesi degli arabinosilani, per i quali la presenza del gene amido-ceroso nell'orzo non è determinante per il loro contenuto quanto il tipo di cultivar; infatti, cultivar con amido normale a sei file contengono livelli leggermente più alti di arabinosilani rispetto alle cultivar a due file (Tabella 1).

A confronto con altri cereali, la quantità di arabinosilani nell'orzo è simile a quella del frumento (5,8%), inferiore a quella della segale (7,6-12%) e superiore a quella dell'avena (2,7-3,5 %).

<b>GENOTIPO DI ORZO</b>	<b>B-GLUCANI TOTALI (%)</b>	<b>ARABINOXILANI TOTALI (%)</b>
<i><b>Cariosside vestita amido normale</b></i>		
AC Metcalfe (2 file)	4.5	4.4
Legaci (6 file)	5.1	5.4
<i><b>Cariosside nuda amido normale</b></i>		
CDC Dawn (2 file)	3.9	3.9
AC Bacon (6 file)	4.0	4.2
<i><b>Cariosside nuda amido ceroso</b></i>		
CDC Alamo (2 file)	7.5	3.9
CDC Rattan (2 file)	7.5	5.1
CDC Fibar (2 file)	9.7	4.1
<i><b>Cariosside nuda amido amilosico</b></i>		
SH99250 (2 file)	8.9	6.05
SB94893 (6 file)	8.9	4.96

Tabella 1 – Contenuto di  $\beta$ -glucani e arabinosilani in vari genotipi d'orzo

La localizzazione dei  $\beta$ -glucani e arabinosilani nel chicco d'orzo, e la loro interazione con gli altri componenti, influenzano non solo alcuni importanti aspetti tecnologici quali l'isolamento e la purificazione, procedure attuate allo scopo di ottenere frazioni arricchite in questi polisaccaridi, ma anche il loro utilizzo nei processi agro-industriali e per l'alimentazione umana ed animale.

$\beta$ -glucani e arabinosilani sono i costituenti strutturali della parete cellulare dei diversi tessuti interni che compongono il chicco d'orzo (Fig. 5); il rivestimento dell'endosperma è costituito soprattutto da  $\beta$ -glucani, mentre lo strato aleuronico è composto principalmente da arabinosilani (assieme rappresentano l'85% del totale dei polisaccaridi presenti).

Le fibre cellulosiche costituiscono solo una piccola porzione della parete cellulare non lignificata (Foto 3).

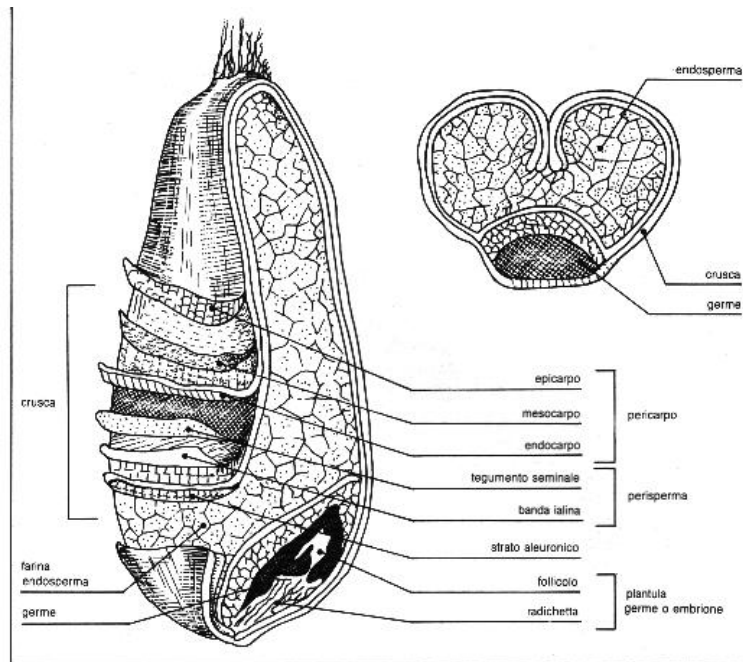


Fig. 5 – Tessuti interni ed esterni della cariosside

Al contrario, gli strati esterni del chicco d’orzo, il rivestimento multistrato (pericarpo), la testa del seme e la buccia o guscio (che si perdono con la trebbiatura), sono costituiti da cellule in cui cellulosa, silice e lignine sono ben concentrate; arabinosilani e glucurono-arabinosilani possono essere anche presenti in varie percentuali, ma i livelli di  $\beta$ -glucani sono molto bassi.

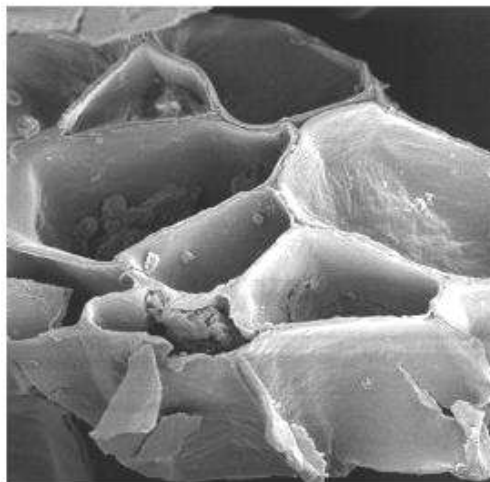


Foto 3 - SEM: relazione tra spessore della parete cellulare e contenuto in  $\beta$ -glucani

Sono state osservate, infatti, alcune differenze sulla quantità relativa di arabinoxilani e  $\beta$ -glucani nei vari tessuti dei diversi genotipi d'orzo; ad esempio, CDC Fibar è un genotipo amido-ceroso a cariosside nuda noto per il suo elevato contenuto in  $\beta$ -glucani nelle pareti delle cellule dell'endosperma, quantità che risulta essere maggiore rispetto a quella del genotipo AC Metcalfe con cariosside vestita, utilizzato principalmente per le malterie (Tabella 2).

TESSUTI	B-GLUCANI TOTALI (%)	AX TOTALI (%)	CELLULOSA (%)
<b><i>Pericarpo</i></b>			
AC Metcalfe	4	63.8	25.8
CDC Fibar	5.8	59.6	28
<b><i>Strato aleuronico</i></b>			
AC Metcalfe	28.8	68	2
CDC Fibar	25.5	70.9	2
<b><i>Endosperma</i></b>			
AC Metcalfe	62.1	11.8	2
CDC Fibar	72.2	8.8	2

Tabella 2 – Maggiori componenti polisaccaridi nei vari tessuti

Studi recenti su genotipi d'orzo cresciuti in Canada hanno presentato prove sulla distribuzione eterogenea dei  $\beta$ -glucani nei vari tessuti, nonché differenze nei modelli di distribuzione tra le varietà di orzo, fortemente dipendenti dalla concentrazione di  $\beta$ -glucani nel cereale. Nei genotipi a basso contenuto di  $\beta$ -glucani, i livelli degli stessi sono risultati essere più elevati nella regione sub-aleuronica rispetto all'endosperma, mentre nei genotipi a medio contenuto i  $\beta$ -glucani sono presenti maggiormente nell'endosperma anziché nello strato sub-aleuronico.

Queste osservazioni hanno supportato altre precedenti conclusioni ottenute attraverso la colorazione con calcofluor, che ha dimostrato come i genotipi ad

elevati livelli di  $\beta$ -glucani nell'endosperma siano più frequenti rispetto ai genotipi con bassi livelli.



## CAPITOLO 3

### PROPRIETA' CHIMICO-FISICHE DEI $\beta$ -GLUCANI E ARABINOXILANI

#### **3.1 Solubilità in acqua ed estrazione dalle pareti cellulari**

La solubilità in acqua dei costituenti della fibra alimentare dell'orzo (DF o dietary fibre ) sembra essere uno dei fattori determinanti della loro funzionalità tecnologica e dell'efficacia fisiologica. La solubilità/estraibilità in acqua (in funzione a tempo, temperatura, pH) dei  $\beta$ -glucani presenti nell'avena è generalmente superiore a quella dell'orzo che, a sua volta, è maggiore a quella del grano.

Essa, inoltre, diminuisce con l'aumento del rapporto molare dei DP3/DP4, che per i  $\beta$ -glucani estratti in acqua è leggermente inferiore rispetto al rapporto molare riscontrato nei  $\beta$ -glucani estratti con alcali.

Tra i genotipi d'orzo a cariosside nuda e con contenuto di amido modificato, i  $\beta$ -glucani dei genotipi amido-ceroso mostrano una solubilità più elevata rispetto a quelli contenuti nei tipi ad alto tenore in amiloso; tuttavia, le differenze di solubilità dei  $\beta$ -glucani non possono essere attribuite unicamente alle loro caratteristiche molecolari. La loro solubilità/estraibilità iniziale in acqua, infatti, è anche legata alla composizione globale e alla "architettura" delle varie parti tra loro assemblate per costituire la parete cellulare.

La coesistenza di diversi biopolimeri nelle parete cellulare, la loro organizzazione spaziale e la natura delle interazioni, contribuiscono alla resistenza meccanica, alla permeabilità, e quindi alla solubilità, dei componenti stessi della parete.

Rispetto ai  $\beta$ -glucani, la solubilità/estraibilità in acqua degli AX dell'orzo è relativamente bassa.

Molteplici sono i fattori che contribuiscono ad una maggiore solubilità dei  $\beta$ -glucani e degli AX, tra i quali:

- struttura molecolare dei polisaccaridi

- composizione e proprietà della parete
- alta concentrazione dei  $\beta$ -glucani
- basso rapporto DP3/DP4 nei  $\beta$ -glucani
- basso peso molecolare dei componenti polimerici
- grado e schema di ramificazione degli AX (frazioni meno solubili evidenziano minor presenza di doppie sostituzioni, ma più alta quantità di xilosio non-sostituito)
- presenza di legami non-covalenti tra le catene dei polimeri (i legami covalenti tra le catene degli AX e le esterificazioni con l'acido idrossicinnamico contribuiscono alla loro insolubilità. La presenza di legami covalenti nei  $\beta$ -glucani e negli AX ha importanti implicazioni sulla rigidità, porosità, solubilità e digeribilità della parete)
- entità delle interazioni molecolari tra polimeri (i legami idrogeno contribuiscono alle proprietà meccaniche della parete)

Per aumentare la solubilità iniziale dei  $\beta$ -glucani e degli AX sono davvero utili alcuni accorgimenti quali:

- ✓ uso di catalizzatori chimici
- ✓ applicazione di trattamenti enzimatici con proteasi ed esterasi
- ✓ utilizzo di trattamenti fisici ed idrotermici in autoclave
- ✓ modulazione dei parametri secondo temperature elevate, tempi prolungati, aumento della forza ionica e pH dei solventi

### 3.2 Proprietà dei $\beta$ -glucani in soluzione

I  $\beta$ -glucani dei cereali sono solubili in acqua a causa della loro estesa ma flessibile conformazione. La presenza di legami (1 $\rightarrow$ 3) glucosidici, da una parte, interrompe la sequenza del (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucano, dall'altra interferisce con la



formazione di numerosi legami idrogeno intermolecolari causando lo sviluppo di aggregati insolubili, come nel caso della cellulosa.

La conformazione della catena dei  $\beta$ -glucani è attribuita alla loro capacità di occupare grandi volumi idrodinamici e di formare soluzioni ad alta viscosità intrinseca. I valori della viscosità intrinseca, indicata con  $\eta$ , possono oscillare tra 0,3 e 9,6 dl/g in funzione al peso molecolare ( $M_w$  o molecular weight) del polisaccaride. In generale, i  $\beta$ -glucani dei cereali sono polimeri ad alto peso molecolare; tuttavia, i valori riportati di  $M_w$  sono variabili in quanto influenzati da:

- metodi e solventi utilizzati per la loro estrazione
- inattivazione degli enzimi idrolitici associati al seme prima dell'estrazione
- tecniche utilizzate per la determinazione del peso molecolare
- pratiche utilizzate per la solubilizzazione dei  $\beta$ -glucani (temperatura, tipo di solvente)

Sono state effettuate, infatti, una serie di estrazioni di  $\beta$ -glucani provenienti da diverse cultivar d'orzo canadese a cariosside nuda, utilizzando in sequenza acqua a 45°C e poi a 95°C, e dimostrando quindi una variazione del peso medio molecolare. Le eluizioni delle soluzioni di  $\beta$ -glucani, osservate nelle colonne cromatografiche, hanno evidenziato un'ampia distribuzione del peso molecolare e confermato la loro natura intrinseca poli-dispersiva.

A concentrazioni superiori alla concentrazione critica del polimero, in cui le catene polimeriche singolarmente iniziano ad intrappolarsi ed a sovrapporsi, i  $\beta$ -glucani formano soluzioni ad alta viscosità apparente, che aumenta quasi fino alla quarta potenza di  $c[\eta]$  dove "c" è la concentrazione del polimero e  $[\eta]$  la viscosità intrinseca. La viscosità apparente delle soluzioni di  $\beta$ -glucani è quindi in funzione a:

- ✓ concentrazione del polimero

- ✓ peso molecolare
- ✓ conformazione della catena
- ✓ interazioni intermolecolari

La capacità dei  $\beta$ -glucani di formare soluzioni viscosi è una proprietà chimico-fisica fondamentale, in quanto determinante per le funzioni fisiologiche della fibra. La quantità ingerita di  $\beta$ -glucani, infatti, ha ruolo parziale su quelli che sono gli effetti ipocolesterolemizzanti degli stessi; i veri “fattori critici” a livello del tratto intestinale sono il peso molecolare e la viscosità dei  $\beta$ -glucani.

A concentrazioni relativamente alte, 4%-10%, le soluzioni di  $\beta$ -glucani sono in grado di formare delle reti di gel termo-reversibile; osservando alcuni cereali (avena, orzo e frumento) si è visto che il tempo di gelificazione è variabile:

- aumenta in funzione al rapporto sempre più molare di DP3/DP4
- aumenta al diminuire del peso molecolare a causa della maggiore mobilità delle catene più corte, che di conseguenza aumenta la diffusione e le associazioni intermolecolari
- diminuisce all'aumentare del peso molecolare, fattore però che porta alla formazione di reti di gel più forti in quanto costituite da microaggregati aventi una migliore organizzazione rispetto alle controparti a basso peso molecolare

Nella letteratura sono stati proposti due possibili meccanismi per le associazioni intermolecolari tra le catene dei  $\beta$ -glucani: uno riguarda le associazioni laterali che avvengono tra i segmenti con più di tre unità contigue di legami  $\beta$ -(1→4) glucosidici, che portano alla formazione di aggregati solubili o insolubili a seconda della loro abbondanza; l'altro si riferisce alle interazioni tra segmenti della catena con unità consecutive di cellotriosio collegate da legami  $\beta$ -(1→3) glucosidici, che sono responsabili della formazione di zone di giunzione e quindi della gelificazione dei  $\beta$ -glucani. Quest'ultimo modello è stato sostenuto da

diversi risultati, i quali hanno evidenziato che l'elica composta da almeno tre residui consecutivi di cellobiosio determina una stabilità nelle catene dei  $\beta$ -glucani (confermata da analisi a raggi X), e che i collegamenti  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) sono direttamente coinvolti nella conformazione ordinata dei  $\beta$ -glucani dell'orzo (dimostrato dalla spettroscopia).

### **3.3 Proprietà degli AX in soluzione**

La solubilità in acqua degli AX dipende dal delicato equilibrio tra catena – catena e dalle interazioni tra catene e solvente. I fattori strutturali quali lunghezza della catena, presenza di gruppi laterali nella catena e la loro distribuzione, può modificare questo equilibrio e il comportamento di solubilità dei polimeri. In generale, la presenza di catene laterali, che normalmente impediscono le interazioni tra catena-catena, favoriscono invece la solubilità dei polimeri in acqua.

Nel caso degli AX, la loro solubilità in acqua non è solo correlata alle caratteristiche strutturali della catena polimerica ma anche ai legami covalenti di altri polimeri presenti nella parete cellulare. Per esempio, nell'endosperma gli WU-AX hanno un più alto rapporto di A/X rispetto agli WE-AX che dovrebbe portare ad una maggiore solubilità in acqua, ma la presenza di un'elevata percentuale di interazioni tra catene dovute ai legami covalenti determinati dai ponti diiferulici rende gli WE-AX WU-AX. Analoghe conclusioni sono applicabili alle elevate ramificazioni degli AX presenti nei tessuti del pericarpo.

Tuttavia, le catene laterali di arabinosio possono influenzare la solubilità degli AX; diversi studi hanno infatti dimostrato che, la rimozione dei residui di arabinosio attraverso idrolisi acida controllata o per attività enzimatica dell'arabinofuranosidasi, può dar luogo ad aggregazione e precipitazione del polimero. Il meccanismo di aggregazione non è chiaro, viene infatti generalmente descritto come interazione tra regioni “non-sostituite” della catena polimerica.

Come i  $\beta$ -glucani, anche gli AX posseggono proprietà di viscosità, a causa del loro elevato peso molecolare e della conformazione semirigida arrotolata della struttura. In generale, la viscosità di un polimero in soluzione è direttamente collegata alle proprietà molecolari fondamentali (conformazione, peso molecolare e distribuzione del peso molecolare) e alla concentrazione del polimero stesso. In soluzioni concentrate, semi-concentrate e totalmente diluite tutti i polisaccaridi presentano lo stesso comportamento che dipende dalla riduzione della concentrazione  $c[\eta]$ . La viscosità intrinseca è in realtà una misura del volume idrodinamico del polimero isolato in soluzione e non deve essere confusa con la viscosità della soluzione. In soluzioni diluite, gli AX si comportano come fluidi newtoniani in cui l'aumento della viscosità è lineare al gradiente di velocità; al di sopra della concentrazione critica, gli AX invece si comportano da pseudoplastici, ossia diminuiscono la loro viscosità al crescere del gradiente, come la maggior parte delle sostanze alimentari. Il comportamento degli AX non è stato studiato in egual misura di quello dei  $\beta$ -glucani, a causa della loro iniziale natura insolubile in acqua; tuttavia, una volta estratti dall'orzo con idrossido di bario saturo, gli AX diventano solubili in acqua e dimostrano proprietà di viscosità simile a quella dei  $\beta$ -glucani.

Gli AX dei cereali sono noti per formare dei gel stabili attraverso reazioni di accoppiamento ossidativo grazie alla presenza di legami covalenti incrociati tra le unità feruliche delle catene adiacenti. In una soluzione di AX, infatti, l'aggiunta di un agente chimico od enzimatico in grado di generare radicali liberi, di solito, provoca un rapido aumento del modulo elastico ( $G'$ ), dovuto alla formazione iniziale di legami covalenti tra i residui di acido ferulico. La gelificazione deriva principalmente dalla formazione di reti tridimensionali di catene di AX, ancorate ai residui deidrodimeri degli acidi ferulici. Durante il processo di gelificazione, infatti, i monomeri esteri dell'acido ferulico scompaiono dato che essi vengono convertiti in dimeri od oligomeri superiori.

La capacità e la forza del gel in effetti dipendono dalla concentrazione degli AX, dal loro  $M_w$  e dal contenuto in acido ferulico. Gli AX estratti dall'orzo con

sostanze alcaline normalmente contengono quantità molto piccole di residui ferulici, in quanto persi durante l'estrazione, e conservano solo la capacità di formare gel elastici in presenza di perossidasi (Grafico 1).

Le frazioni estratte in acqua mostrano scarsa capacità di gelificazione dovuta per lo più al contenuto molto basso di AX (circa il 12% in WE45 ossia estrazione in acqua a 45°C, e il 5% circa in WE95), mentre le frazioni estratte con alcali, in particolare Ba(OH)<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (idrossido di bario diluito) mostrano valori di elasticità (G') più elevati.

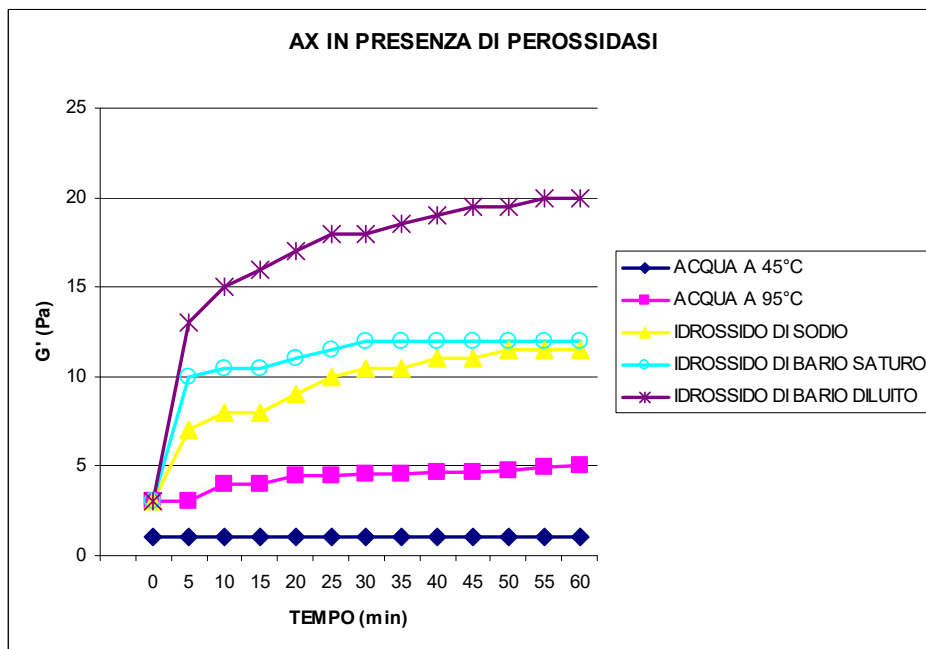


Grafico 1 – Andamento del modulo elastico degli AX



## CAPITOLO 4

### PROCESSI CHIMICO – FISICI PER LA PRODUZIONE DI FIBRE ISOLATE E FRAZIONI DI ORZO

#### 4.1 Estrazione in soluzione acquosa

I rivestimenti dello strato aleuronico e dell'endosperma della cariosside d'orzo sono fonti particolarmente ricche in  $\beta$ -glucani, per tal motivo diversi autori hanno condotto esperimenti per estrarre queste fibre con solventi in soluzioni acquose. I metodi di estrazione tradizionali prevedono diversi passaggi:

1. inattivazione degli enzimi endogeni
2. estrazione in acqua o soluzioni alcaline
3. rimozione dell'amido e delle proteine contaminati, utilizzando enzimi idrolitici e/o l'adsorbimento selettivo
4. precipitazione dei  $\beta$ -glucani in soluzione con alcool purificato
5. liofilizzazione o, in alternativa, essiccazione a spruzzo

La preparazione che si ottiene può contenere tra il 33% e l'87% di  $\beta$ -glucani che, per i complessi processi di estrazione, risultano essere molto costosi e quindi utilizzabili solo in pochi prodotti alimentari (Fig. 6).

Per tal motivo, recentemente, sono stati introdotti sistemi di estrazione più semplificati e potenzialmente meno costosi; tra i prodotti commerciali di nuova generazione Glucagel™ è stato ottenuto dall'orzo australiano per estrazione con acqua calda, favorendo la precipitazione dei  $\beta$ -glucani attraverso cicli ripetuti e alternati di congelamento e scongelamento. Questo metodo non prevede le inattivazioni enzimatiche, in realtà il processo si avvale degli enzimi, di origine endogena o fungina, naturalmente presenti e associati al cereale, che permettono di ottenere una idrolisi parziale dei  $\beta$ -glucani (Fig. 7). Come risultato, il prodotto ottenuto ha un peso molecolare medio tra 50,000-150,000 dalton e proprietà termo-gelificanti reversibili.

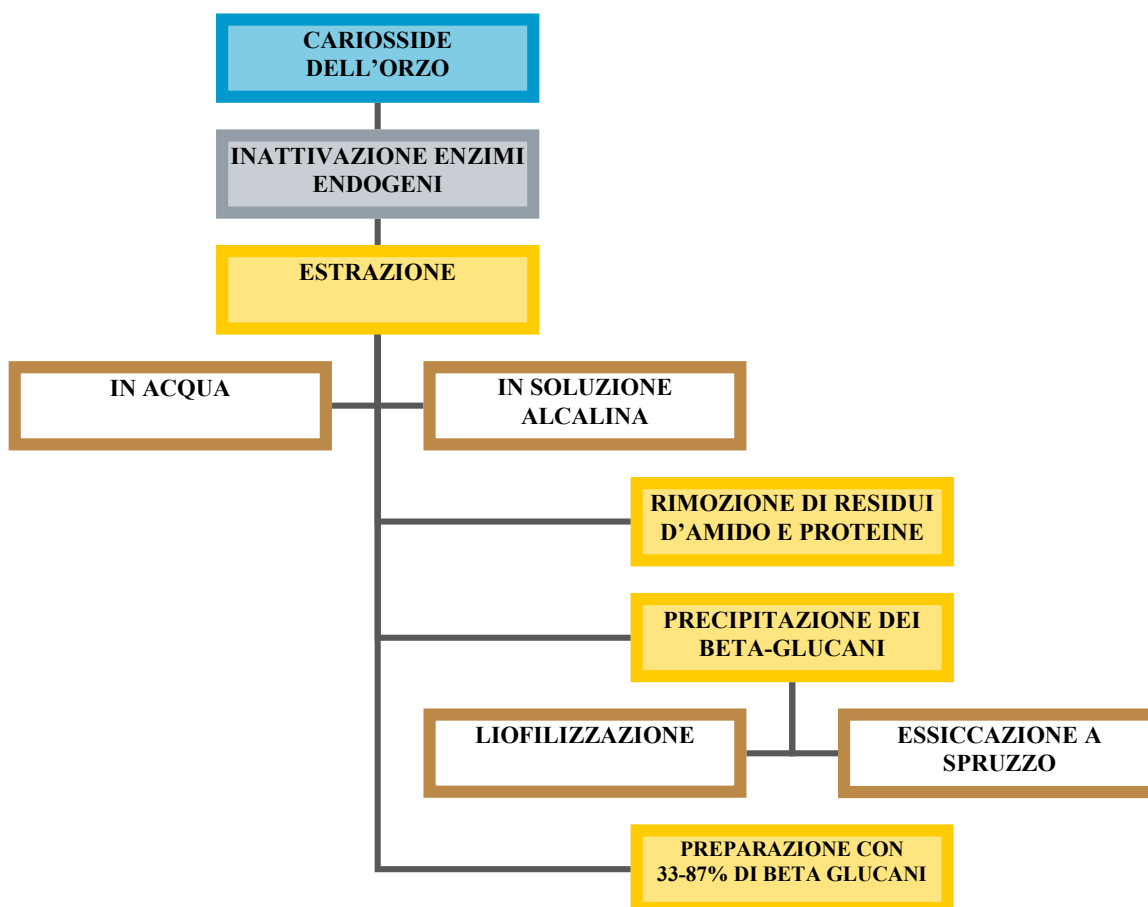


Fig. 6 – Esempio di diagramma di flusso per una preparazione generica contenente  $\beta$ -glucani

L'uso di Glucagel™ è previsto sia come fonte di fibra alimentare nei cibi, che come sostituto lipidico o componente nei film commestibili. Tuttavia, mentre i  $\beta$ -glucani estratti con tecniche tradizionali, o presenti in frazioni di orzo ottenute attraverso frazionamenti fisici del cereale, hanno dimostrato di ridurre il colesterolo nel sangue e il glucosio post-prandiale in soggetti umani, Glucagel™ non ha dimostrato alcun effetto sui livelli di colesterolo o sulla concentrazione ematica di glucosio. E' stato ipotizzato che uno dei motivi, per cui Glucagel™ non ha tali effetti funzionali, sia dovuto alla idrolisi parziale dei  $\beta$ -glucani che si verifica durante la preparazione del prodotto.



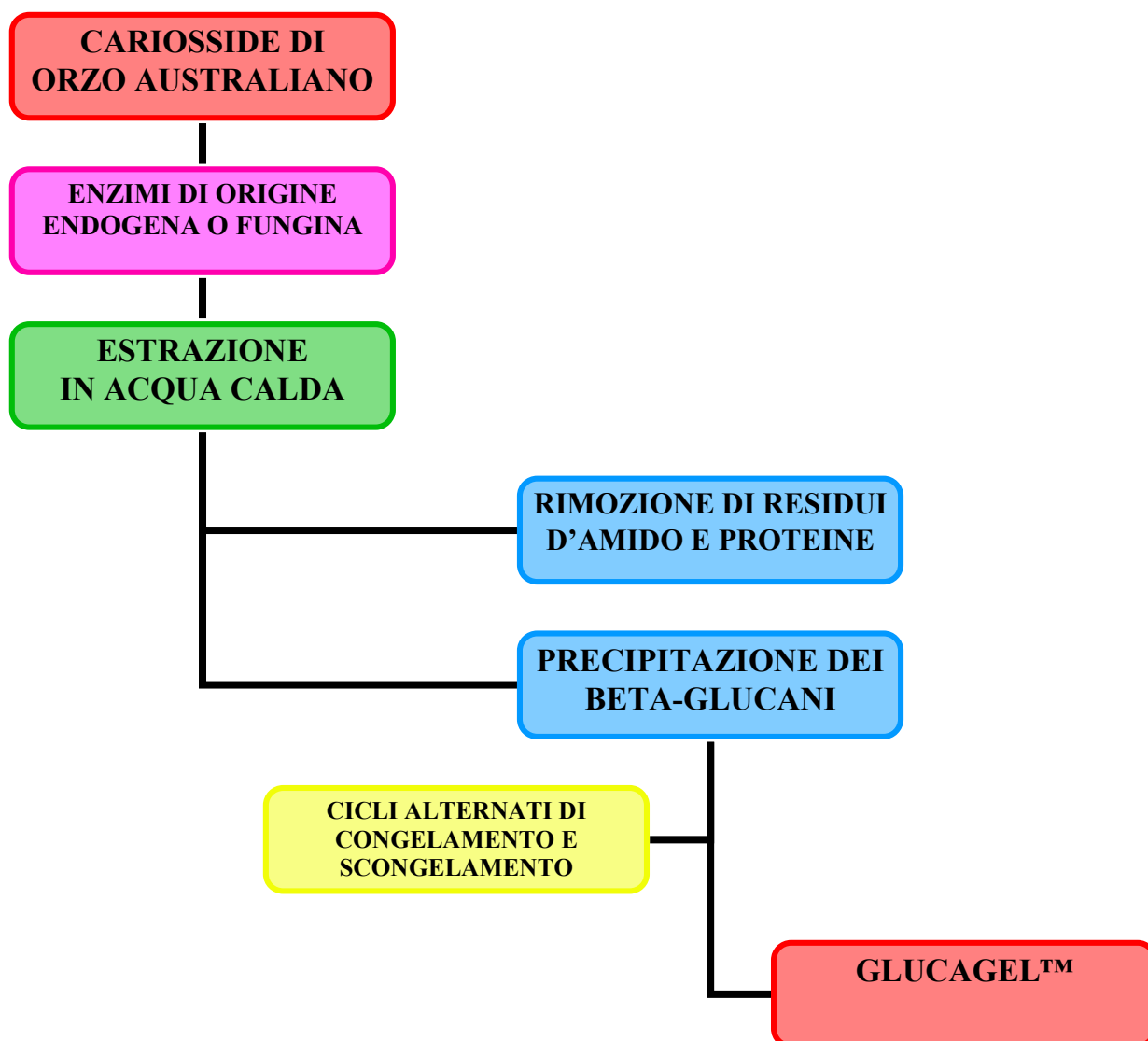


Fig. 7 – Esempio di diagramma di flusso per la preparazione di Glucagel™

Nel 1990 negli Stati Uniti è stata sviluppata una serie di prodotti che portano il suffisso “*trim*” (acronimo utilizzato per indicare la ricerca tecnica che influenza il metabolismo); tra questi il prodotto Nutrim™ è stato realizzato sottoponendo una sospensione acquosa di farina d’orzo, ad elevata temperatura, a tranciatura meccanica in presenza di  $\alpha$ -amilasi termostabili, seguita da centrifugazione ed essiccazione del surnatante. Oltre ai  $\beta$ -glucani (5-15% a seconda del loro

contenuto nell'orzo utilizzato per l'estrazione), una preparazione Nutrim™ contiene anche amido, amilo-destrine e proteine. Nutrim™ è stato utilizzato per produrre formaggio Cheddar a basso contenuto in grassi, per il quale sono state testate le risposte fisiologiche nell'abbassamento dei trigliceridi e conseguentemente della colesterolemia, dovute agli estratti d'orzo contenuti nel formaggio.

Il processo di preparazione di Nutrim™ prevede la sospensione di farina d'orzo perlato in alcool (50%) e diversi passaggi di setacciatura in acqua per separare i granuli di amido dai componenti della parete cellulare (Fig. 8). Inoltre, viene utilizzata una combinazione di proteasi e  $\alpha$ -amilasi termostabili quale trattamento per purificare il residuo di fibra. La frammentazione dei  $\beta$ -glucani è controllata mediante l'applicazione di questi trattamenti, ottimizzati in tempo e potenza, e con il giusto rapporto di acqua e alcool. Dopo il lavaggio in alcool, la fibra viene recuperata e asciugata; il residuo delle fibre secche (concentrato di  $\beta$ -glucani) può contenere tra il 40 e il 70% di  $\beta$ -glucani a seconda del contenuto degli stessi nell'orzo, del grado di perlatura e della portata delle varie fasi di depurazione. Il residuo, pertanto, può essere utilizzato per la preparazione di soluzioni acquose di  $\beta$ -glucani aventi funzione di integratori alimentari, o nelle applicazioni tecnologiche per la produzione di vari alimenti.

Rispetto ai  $\beta$ -glucani, gli arabinoxilani dell'orzo sono scarsamente solubili in acqua e necessitano di solventi alcalini per essere estratti. Vengono infatti utilizzate soluzioni sature di idrossido di bario ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ) per estrarre selettivamente gli arabinoxilani dalle pareti cellulari di molti cereali; mentre gli ioni ossidrilici interagiscono con l'idrogeno attraverso legami covalenti, provocando l'allentamento del "muro" della matrice cellulare e il rilascio di vari polisaccaridi della parete stessa, gli ioni  $\text{Ba}^{2+}$  reagiscono specificamente con lo zucchero pentoso degli arabinoxilani, favorendo in tal modo la loro estrazione.

Arabinoxilani e  $\beta$ -glucani possono anche essere estratti contemporaneamente mediante l'uso di soluzioni di idrossido di sodio ( $\text{NaOH}$ ); successivamente, i

due polimeri vengono separati attraverso loro precipitazione con solfato d'ammonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ).

I recenti progressi nello studio delle attività prebiotiche attribuite agli arabinosilo-oligosaccaridi e le crescenti pressioni esercitate per garantire l'utilizzo totale di sottoprodotti agro-industriali, hanno suscitato grande interesse per i residui dei chicchi d'orzo utilizzati nella produzione di birra, quali possibile fonte di fito-nutrienti. Il residuo che rimane dopo il processo di filtrazione dell'orzo, infatti, può contenere fino al 40% di arabinosilani che, attraverso l'azione di esterasi e di idrolasi ferulil-glicosidiche, possono essere convertiti in vari arabinosilo-oligosaccaridi, oligosaccaridi ferulici nonché acido ferulico.

Inoltre, la presenza di frazioni fenoliche in arabinosilani e arabinosilo-oligosaccaridi contribuiscono nel conferire proprietà antimicrobiche e antiossidanti a questi estratti.

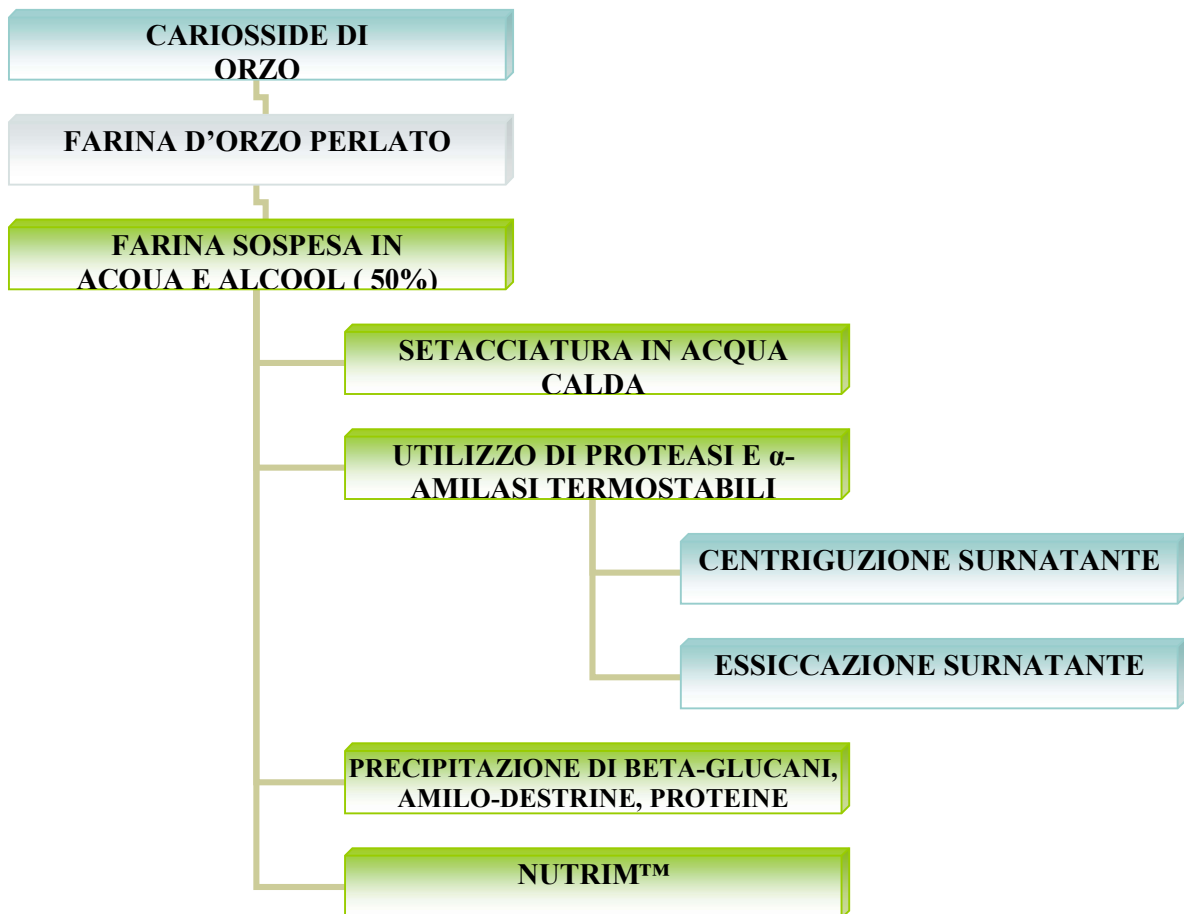


Fig. 8 – Esempio di diagramma di flusso per la preparazione di Nutrim™

## 4.2 Frazionamento a secco del chicco

La distribuzione non uniforme dei componenti all'interno del chicco d'orzo consente il loro frazionamento con mezzi fisici per l'ottenimento di  $\beta$ -glucani e arabinoxilani. Tali prodotti usati come ingredienti alimentari possono essere ottenuti con processi naturali, il che è più desiderabile per i consumatori attenti alla salute rispetto ai prodotti ottenuti attraverso processi chimici.

La perlatura è il metodo più tradizionale di trasformazione fisica dell'orzo, e prevede l'eliminazione in sequenza di buccia, pericarpo, rivestimento del seme, strati aleuronici e sub-aleuronici ed embrione. A seconda del grado di perlatura, ossia di quantità di materiale rimosso attraverso azioni abrasive, il processo può produrre orzo decorticato, per rimozione del pericarpo, o perlato, per ulteriore rimozione degli strati aleuronici e sub-aleuronici.

Come si è già potuto osservare, i genotipi d'orzo ad elevato contenuto di  $\beta$ -glucani presentano una loro maggior localizzazione a livello dell'endosperma, aspetto determinante per l'orzo perlato, ottenibile dal trattamento di decorticazione e che contiene più  $\beta$ -glucani (su base percentuale) rispetto all'orzo non lavorato.

In effetti, attraverso la raccolta di sottoprodotti di orzo privo di buccia al 10%, ossia con rimozione di pericarpo, testa e un singolo strato aleuronico, è stato dimostrato che i genotipi a basso contenuto di  $\beta$ -glucani presentano una loro più elevata concentrazione nello strato sub-aleuronico; al contrario, i genotipi con elevati livelli di  $\beta$ -glucani mostrano gli stessi uniformemente distribuiti in tutta la mandorla farinosa.

Inoltre, questi sottoprodotti risultano essere altamente arricchiti in arabinoxilani; se però la perlatura progredisce nell'endosperma, il contenuto di  $\beta$ -glucani e arabinoxilani diminuisce in modo evidente (Grafici 2 e 3).

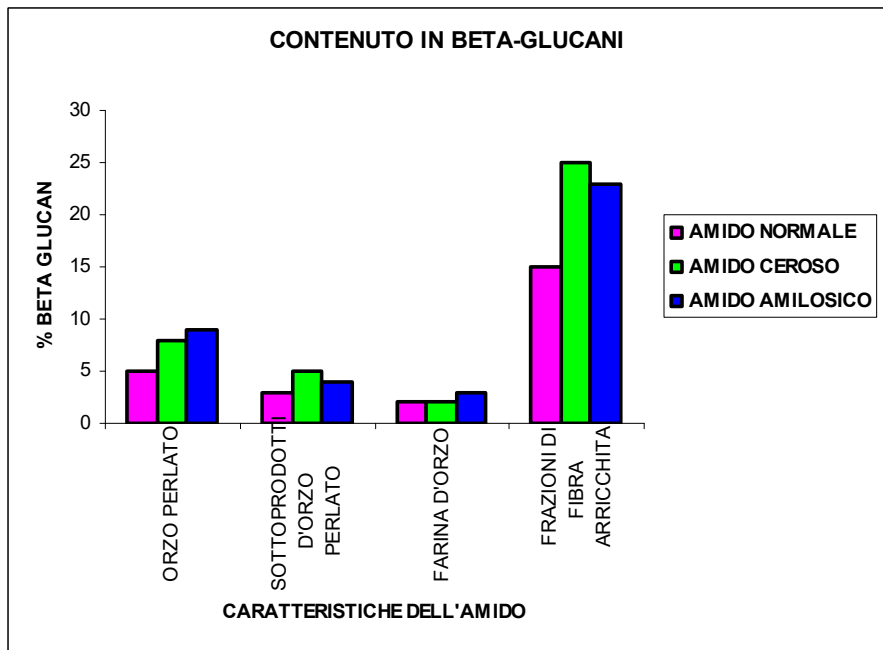


Grafico 2 – Contenuto di  $\beta$ -glucani nei derivati dell'orzo

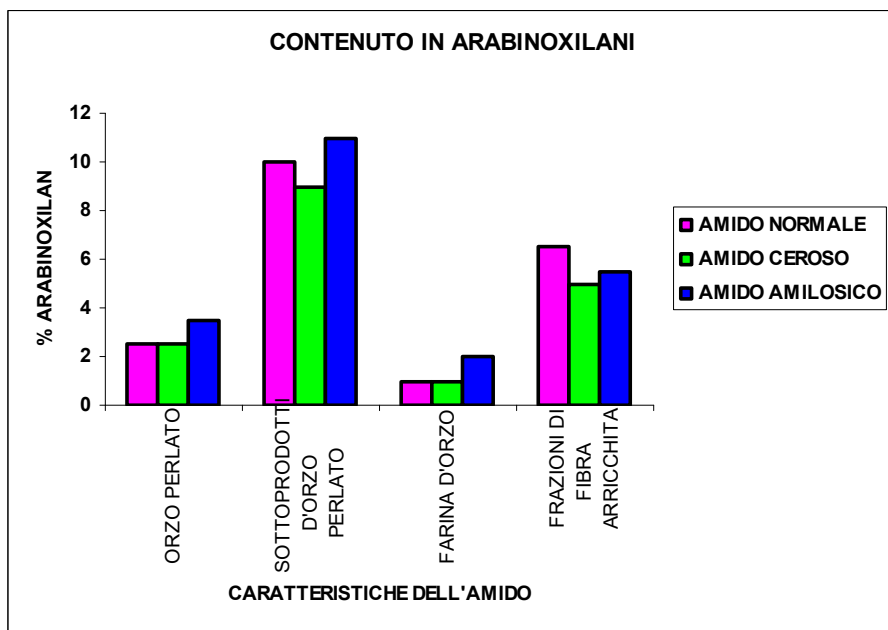


Grafico 3- Contenuto di AX nei derivati dell'orzo

Le frazioni arricchite in  $\beta$ -glucani si possono produrre attraverso un semplice processo di macinazione a secco e di setacciamento, utilizzando sistemi abrasivi di fresatura con rullo (preferita per il rendimento maggiore in  $\beta$ -glucani) o fresatura con martello; il processo è molto impegnativo, richiede una prolungata vagliatura che potrebbe determinare una bassa resa di prodotto arricchito in  $\beta$ -glucani (meno del 5%). Ciò è dovuto al fatto che la crusca dell'orzo è maggiormente fusa con l'endosperma rispetto alla crusca di altri cereali, e quindi più fragile e soggetta a possibilità di rottura durante la molitura, con conseguente rilascio di frammenti di crusca nella farina. La contaminazione della farina, però, può essere ridotta se prima della fresatura a rullo si prevede la rimozione del pericarpo.

Il rendimento di farina d'orzo, ottenuta con fresatura a rullo, è molto variabile (30-75%); tra i fattori che influenzano la resa si osservano:

- il genotipo d'orzo: quelli ad elevato contenuto in  $\beta$ -glucani resistono maggiormente alla riduzione delle dimensioni delle particelle, ma la conseguenza è una minor resa di farina
- lo spessore delle pareti delle cellule dell'endosperma: genotipi ad elevati livelli di  $\beta$ -glucani presentano spesse pareti, molto elastiche e resistenti alla rottura durante la molitura, il che rende difficile ottenere la separazione dei granuli di amido incontaminati
- l'impatto materiale della terra durante le operazioni unitarie di pulizia: nei genotipi ad elevato contenuto in  $\beta$ -glucani, l'impatto facilita l'uscita della farina durante i vari passaggi
- la potenza, la velocità e l'orientamento dei rulli: la raffinatezza della farina, in termini di luminosità, è influenzata negativamente da eccessivo rollio ed elevata velocità

Gli studi riportati sulle performance della fresatura dell'orzo sono stati eseguiti utilizzando i rulli di macinazione del frumento, in cui si osserva una particolare

resa. Tuttavia la farina d'orzo ottenuta risulta ricca di amido e con relativo basso contenuto di  $\beta$ -glucani; questi ultimi si concentrano infatti nella cosiddetta frazione degli "shorts" o "corti".

Nel frumento i "corti" sono prevalentemente frammenti di cruschetto, mentre nell'orzo gli "shorts" sono frammenti di parete delle cellule dell'endosperma e risultano essere arricchiti in modo esponenziale di  $\beta$ -glucani e arabinosilani, i quali conferiscono alla farina d'orzo maggior valore nutrizionale quali ingredienti alimentari.





## CAPITOLO 5

### PROPRIETA' FUNZIONALI DEI $\beta$ -GLUCANI E DEGLI ARABINOXILANI

#### 5.1 Proprietà funzionali dei $\beta$ -glucani

L'orzo, come gran parte dei cereali, è molto ricco in fibra alimentare distinta in frazione solubile ed insolubile in base ai suoi componenti. La frazione dietetica insolubile è rappresentata da amido resistente, lignina, polisaccaridi non amidacei tra i quali la cellulosa; la frazione solubile, invece, è costituita da polisaccaridi non amidacei, di tipo non cellulosico, tra i quali compaiono  $\beta$ -glucani, pectine, emicellulose e mucillagini.

Dal punto di vista biodinamico le fibre solubili, a differenza delle insolubili, formano soluzioni altamente viscosi nel tratto gastro-intestinale, importanti a livello del metabolismo dei carboidrati e dei lipidi.

Nell'orzo i  $\beta$ -glucani sono i maggiori costituenti della fibra solubile, presenti in quantità poco significative negli strati esterni del seme, più rilevanti invece negli strati interni quali componenti principali della parete cellulare dell'endosperma amilaceo. Ad essi sono state attribuite diverse proprietà funzionali, quali:

- ✓ riduzione del colesterolo plasmatico attraverso la regolazione della biosintesi di quello endogeno
- ✓ abbassamento della glicemia post prandiale
- ✓ rallentamento dello svuotamento gastrico grazie alla loro viscosità, con effetti positivi sul senso di sazietà
- ✓ selezione della flora intestinale grazie all'azione prebiotica (la fibra non può essere digerita dagli enzimi umani, ma viene fermentata nell'intestino crasso dai batteri presenti)
- ✓ effetto immunostimolante

### 5.1.1 Riduzione del colesterolo

Diversi studi, effettuati con modelli animali o *in vitro*, hanno dimostrato l'effetto dei  $\beta$ -glucani sulla riduzione del colesterolo. I meccanismi biochimici implicati non sono stati completamente chiariti ma diverse ipotesi sono state sostenute dagli autori di tali ricerche. Per esempio, studi condotti in pane e biscotti arricchiti in  $\beta$ -glucani non hanno dimostrato un particolare effetto positivo sulla riduzione del colesterolo LDL, al contrario di quanto osservato grazie al consumo di succo d'arancia arricchito in  $\beta$ -glucani. Questo risultato rivela quindi che i processi tecnologici di impastamento e fermentazione contribuiscono ad attenuare l'efficacia funzionale dei  $\beta$ -glucani.

Alla base dell'effetto ipocolesterolemizzante dei  $\beta$ -glucani, sembra ci sia l'aumento della viscosità, a livello intestinale, dei cibi digeriti che determina la riduzione del colesterolo assorbito attraverso l'utilizzo di colesterolo endogeno per la neosintesi dei sali biliari. Questa alterazione della viscosità gastrointestinale è dovuta all'abilità dei  $\beta$ -glucani nel formare reticoli gelatinosi (Reimer et al., 2000).

Il primo studio di nutri-genomica in merito ha evidenziato sia una riduzione nell'espressione dei geni coinvolti nel trasporto intestinale di acidi grassi e colesterolo che una *down regulation* nell'espressione dei geni utili alla sintesi di acidi grassi e di colesterolo a livello epatico. Inoltre ulteriori studi dimostrano che l'effetto ipocolesterolemizzante dei  $\beta$ -glucani è associato alla *up regulation* dell'enzima colesterolo-7- $\alpha$ -idrolasi (CYP7AI) implicato nella via metabolica ove il colesterolo viene convertito in sali biliari.

La maggior parte degli studi condotti indica pertanto che i  $\beta$ -glucani contribuiscono a ridurre il colesterolo totale abbassando la concentrazione delle lipoproteine LDL; in alcuni test sono stati osservati anche una riduzione dei trigliceridi ed un incremento di concentrazione delle HDL.

L'efficacia ipocolesterolemizzante dei  $\beta$ -glucani, però, non dipende dall'origine botanica; in effetti tra orzo e avena non sono state rivelate differenze significative (Delaney et al., 2003).

Nel 2006 la Food and Drug Administration (FDA) ha approvato l'utilizzo per l'industria alimentare di *claims* salutistici che evidenziano i benefici dei  $\beta$ -glucani da orzo e avena sulla salute del cuore, specificando che essi devono far parte di una dieta a basso contenuto di grassi saturi e colesterolo. Anche l'European Food Safety Agency (EFSA) ha dato il suo consenso per queste caratteristiche scientifiche, stabilendo che un consumo minimo quotidiano di  $\beta$ -glucani pari a 3 g/die ha un beneficio evidente nell'abbassamento del colesterolo.

### **5.1.2 Abbassamento della glicemia**

I  $\beta$ -glucani, se introdotti nell'alimentazione quotidiana, hanno anche un effetto positivo sulla glicemia post-prandiale e sulla risposta insulemica, determinando un abbassamento del picco glicemico e la conseguente riduzione della risposta insulinica (entrambi dimostrati e osservati attraverso diversi studi scientifici).

Questa proprietà funzionale è stata la più studiata e documentata da numerosi autori e sembra sia principalmente collegata alle caratteristiche reologiche dei  $\beta$ -glucani. Le risposte fisiologiche, in seguito all'ingestione di bevande con differente contenuto in glucani, sono influenzate dalla concentrazione delle fibre aggiunte e dal loro peso molecolare. Wood et al. (1994b) ha stabilito che esiste un effetto inversamente proporzionale tra la risposta glicemica e la viscosità degli alimenti arricchiti in fibra. Inoltre, anche la struttura della matrice alimentare, contenente  $\beta$ -glucani, può influenzare la risposta glicemica; in effetti, alimenti ricchi di amidi contenenti  $\beta$ -glucani sono meno suscettibili all'attacco enzimatico, e quindi difficilmente idrolizzabili, grazie alla "barriera" creata dalla fibra. La degradazione dell'amido e la conseguente risposta glicemica risulterebbero quindi più attenuate.

Studi *in vitro*, effettuati attraverso l'aggiunta di differenti concentrazioni di  $\beta$ -glucani in pane, riportano che l'effetto ipoglicemizzante può dipendere dal modo in cui le fibre vengono aggiunte alla matrice amidacea, che conseguentemente impedisce la gelatinizzazione dell'amido e riduce la suscettibilità enzimatica.

L'origine botanica dei  $\beta$ -glucani non influenza la risposta glicemica e insulemica *in vivo*.

Il controllo della glicemia attraverso un'alimentazione fortificata con  $\beta$ -glucani è di beneficio nella prevenzione dell'obesità, del diabete, e patologie correlate, che generalmente insorgono in persone adulte ed anziane.

### **5.1.3 Effetto sul senso di sazietà**

Gli effetti positivi dei  $\beta$ -glucani legati al consumo di alimenti che li contengono riguardano anche la capacità di indurre un elevato senso di sazietà. Tale effetto è dovuto a vari motivi quali:

- ✚ la capacità di trattenere acqua porta ad una distensione gastrica, che determina uno spiccato senso di sazietà
- ✚ il miglioramento della risposta glicemica favorisce l'abbassamento del picco glicemico, che a sua volta determina il prolungamento del senso di sazietà
- ✚ la viscosità della fibra aumenta il tempo di contatto tra i nutrienti e l'intestino, di conseguenza avviene un rallentamento dello svuotamento gastrico e aumento del senso di sazietà

### **5.1.4 Effetti prebiotici ed immunostimolanti**

Diversi studi clinici hanno evidenziato anche l'attività prebiotica dei  $\beta$ -glucani, in quanto favoriscono la selezione e la crescita nell'intestino di microrganismi appartenenti ai generi *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (bifidobatteri, batteri lattici), che fermentando la frazione fibrosa contenente  $\beta$ -glucani producono acidi grassi a corta catena (SCFA o short chain fatty acids). È stato scientificamente documentato che l'effetto prebiotico dei  $\beta$ -glucani determina a sua volta un effetto preventivo nei confronti del cancro al colon. Infatti, la presenza dei  $\beta$ -

glucani causa l'aumento dell'amido resistente alla digestione, l'incremento della massa fecale e conseguentemente del volume di materiale fermentabile dai microbioti intestinali. La fermentazione della copiosa massa fecale comporta la forte produzione di SCFA (Dongowski et al., 2002); tra gli acidi grassi a corta catena si citano ad esempio l'acido butirrico, per la prevenzione del cancro al colon, e il propionico, per la riduzione del colesterolo ematico.

I  $\beta$ -glucani sono inoltre citati per le proprietà immunomodulatorie o immunostimolanti. Diversi studi *in vitro* ed *in vivo* hanno evidenziato che tale attività dipende dalla struttura, dal peso molecolare e dal livello di ramificazione dei  $\beta$ -glucani. L'effetto di immunostimolazione è deputato all'attività positiva di queste fibre contro batteri, virus, funghi e parassiti. Il meccanismo di immunomodulazione è associato all'attivazione di macrofagi e T-cellule e alla differenziazione e attivazione dei linfociti T.

La scoperta di tale proprietà si è consolidata con le conoscenze relative al recettore Dectin<sub>1</sub>, ritenuto il recettore specifico dei  $\beta$ -glucani presente nei leucociti, in particolare nei macrofagi, i quali sono fondamentali nelle reazioni immunitarie. I macrofagi riconoscono, inglobano e distruggono i corpi estranei presenti nell'organismo (es. batteri, virus, funghi, cellule morte, mutate o cancerogene) rafforzando l'intero sistema immunitario.

Alcuni studi hanno dimostrato che i  $\beta$ -glucani dell'avena hanno effetti antimicrobici contro *E. coli* e *B. subtilis*; i  $\beta$ -glucani dei lieviti (da *S. cerevisiae*) hanno invece effetto antimicrobico contro *S. aureus*. Sembra quindi che l'effetto immunostimolante dei  $\beta$ -glucani dipenda dalla fonte (da cereali, da lievito, da funghi o batteri) e, nel caso dei cereali, dall'origine botanica.

Altre proprietà dei  $\beta$ -glucani studiate negli ultimi tempi riguardano:

- la proprietà anticoagulante (Mantovani et al., 2008)
- la proprietà antimutagenica: alcuni studi (Tohami et al., 2003) dimostrano l'efficacia dei  $\beta$ -glucani nel ridurre il danno causato da agenti mutageni

Sono stati studiati i  $\beta$ -glucani da *S. cerevisiae* ove è comprovato l'effetto protettivo anti-genotossico e anti-citotossico; il meccanismo è attribuibile all'abilità dei  $\beta$ -glucani nell'intrappolare i radicali liberi.

## **5.2 Proprietà funzionali degli arabinosilani**

Gli arabinosilani (AX) sono i principali polisaccaridi non-amidacei presenti nelle pareti cellulari dei cereali; le caratteristiche molecolari degli arabinosilani determinano le loro proprietà fisiche quali la solubilità in acqua, la viscosità e le proprietà di gelificazione, ma anche le funzioni nel tratto gastro-intestinale.

Dal punto di vista alimentare gli arabinosilani sono classificati come fibra, non essendo di per sé idrolizzabili dal corredo enzimatico umano, ossia non essendo digeribili; uno studio condotto da Zang et al., (2003) dimostra che l'acidità gastrica causa anche modificazioni nella struttura degli AX. Gli arabinosilani offrono pertanto benefici nutrizionali tipici delle fibre solubili.

### **5.2.1 Funzione prebiotica**

Nell'intestino crasso, gli AX possono essere idrolizzati ed utilizzati come fonte energetica da parte della microflora batterica, in particolare da quella cosiddetta "utile" (bifidobatteri) con conseguente produzione di acidi grassi a corta catena. Infatti, per idrolizzare le catene degli AX sono necessari specifici enzimi, quali le arabinofuranoidrolasi, xilanasi, acetilsterasi, acido-ferulico esterasi, secreti dai microbioti.

Recenti ricerche (Williams et al., 2010) riportano che la funzione prebiotica fra AX e  $\beta$ -glucani è lievemente differente, in termini di cinetica di fermentazione e prodotti ottenuti (tipo di acidi grassi). Ciò dimostra che la differenza in viscosità e peso molecolare non influenza la fermentabilità delle due diverse fibre. Altri autori (Hughes et al., 2008) confermano che non vi sono differenze in termini di produzione di SCFA. Tuttavia, comparando le fermentazioni di AX e  $\beta$ -glucani,

effettuate utilizzando diversi inoculi batterici, risultano quantitativamente differenti le produzioni di acido butirrico negli AX, concludendo perciò che il tipo di batteri fermentanti può influenzare la proprietà antitumorale degli AX.

Studi condotti sulle popolazioni microbiche hanno rivelato, inoltre, che durante la fermentazione intestinale degli AX vi è la formazione di succinato e secondariamente di butirrato; per tali motivi le specie batteriche coinvolte maggiormente nella degradazione degli AX sembrano essere i *Bacteroides*.

### **5.2.2. Funzione ipoglicemizzante**

La proprietà di viscosità degli AX è stata considerata responsabile nel rallentare la velocità di svuotamento gastrico e nel ridurre la motilità dell'intestino, influenzando quindi sull'abbassamento del glucosio post prandiale e sulla relativa risposta insulemica nell'uomo.

Alcuni autori riportano che gli AX, durante il passaggio nel tratto gastrico ove l'acidità può variare attorno a valori di  $1 < \text{pH} < 3$ , possono essere lievemente idrolizzati a causa della disgregazione di unità di L-arabinosio (Zang, 2003).

L-arabinosio è un saccaride difficilmente assorbibile nell'intestino umano e può provocare l'abbassamento della concentrazione di insulina e di triacilgliceroli. Questo meccanismo è implicato nella prevenzione del diabete e quindi nelle proprietà funzionali degli AX.

### **5.2.3 Altre proprietà funzionali**

Agli AX sono state attribuite ulteriori proprietà funzionali, quali:

- ✓ funzione antiossidante, dovuta alla presenza di frazioni fenoliche nelle strutture molecolari degli AX;
- ✓ riduzione dell'ipercolesterolemia
- ✓ miglior assorbimento del calcio e del magnesio

Le proprietà funzionali degli arabinossilani non sono state studiate nella stessa misura di quelle dei  $\beta$ -glucani; di certo questi componenti hanno effetti sia sulle proprietà tecnologiche dei cereali (fresatura, macinazione, panificazione, cottura) a causa della loro viscosità in soluzione acquosa e alle loro proprietà di idratazione, come pure sulla qualità nutrizionale degli alimenti che li contengono.



## CAPITOLO 6

### UTILIZZO DI FIBRA D'ORZO E/O FRAZIONI ISOLATE NEI PRODOTTI ALIMENTARI

#### **6.1 La fibra d'orzo in pane e in pasta**

L'orzo è stata una delle fonti di cibo più importanti nel mondo antico, soprattutto come cereale alternativo al frumento. Oggi l'aggiunta di orzo, o di suoi costituenti, agli alimenti è solitamente volta ad aumentare il contenuto di fibre totali e solubili presenti negli stessi, potenziando la loro efficacia fisiologica allo scopo di fornire benefici alla salute.

Miglioramenti evidenti nel contenuto di fibre, infatti, sono stati ottenuti attraverso l'aggiunta di 12-25% di frazioni di fibre d'orzo nei prodotti a base di farina di grano quali pane e pasta, che generalmente non sono considerati una buona fonte di fibra alimentare.

La sostituzione della farina di frumento con il 20% di frazioni d'orzo ricche in fibre aumenta la quantità di  $\beta$ -glucani totali da 0,2 g a 3g , di  $\beta$ -glucani solubili da 0,09 g a 1,43 g e di arabinosilani da 2,4 g a 4,2 g per porzione, offrendo così un significativo contributo alla dose giornaliera raccomandata di fibra alimentare solubile ed insolubile (20-25 g al giorno per la popolazione adulta sana).

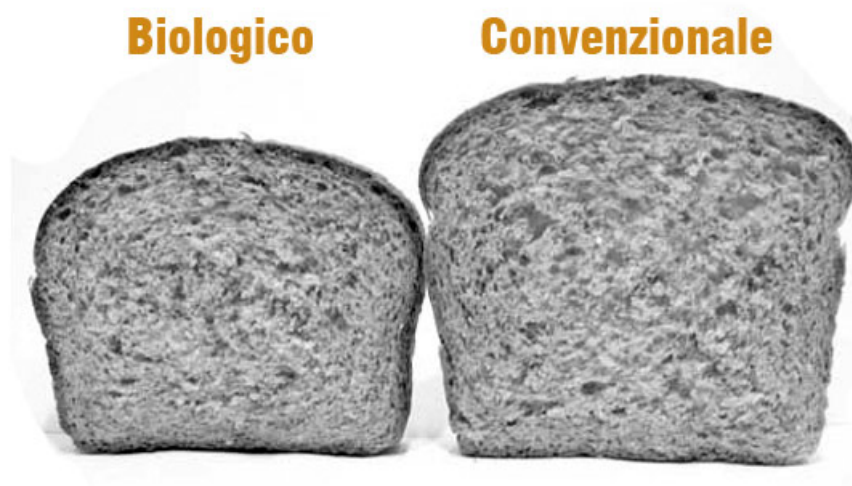
Inoltre, come già osservato, la digestione degli amidi contenuti nei cibi "fortificati" e la liberazione degli zuccheri semplici vengono ritardate grazie ai componenti delle fibre che, aderendo ai granuli di amido, aumentano in viscosità durante la fase digestiva.

Esistono, infatti, prove documentate sull'abbassamento dell'indice glicemico, sulla riduzione del colesterolo totale e delle LDL dovuti al consumo di  $\beta$ -glucani presenti in pane, pasta, fiocchi, biscotti, ed altri prodotti alimentari che rientrano quotidianamente nella dieta alimentare.

L'incorporazione negli alimenti di orzo, di frazioni isolate o di fibra d'orzo, oltre a fornire benefici fisiologici, modifica la trasformazione e la manipolazione degli alimenti durante le varie fasi di preparazione, nonché la loro consistenza, colore,

aroma e gusto. La crescente consapevolezza del valore nutrizionale dell'orzo, però, ha stimolato l'evoluzione del cereale come ingrediente alimentare per gli alimenti funzionali, permettendo di ottenere prodotti arricchiti in grado di esibire accettabili proprietà sensoriali, soprattutto se gli ingredienti sono incorporati a bassi o moderati livelli.

L'analisi sensoriale di prodotti da forno arricchiti in  $\beta$ -glucani e AX ha rivelato risultati positivi, rispetto ai prodotti ottenuti da sola farina di frumento, attestando che l'orzo può essere impiegato nella produzione di prodotti alimentari ad alto contenuto in fibra (pur dimostrando una significativa differenza legata alla diminuzione del volume, ad esempio, nel pane – Foto 4).



*Foto 4 – Volume di un pane biologico con 20% di fibre d'orzo e volume di un pane convenzionale con sola farina di frumento*

In effetti, esperimenti condotti producendo tortillas con farina di CDC Candela, un genotipo d'orzo con cariosside nuda ad elevato contenuto in  $\beta$ -glucani ma con amido a basso livello di amiloso, hanno dimostrato che le valutazioni dei consumatori non differivano in modo significativo da quelle espresse per tortillas ottenute dal grano.

Un possibile fattore di ostacolo per l'accettazione, da parte dei consumatori, dei prodotti alimentari a base di orzo è rappresentato dall'alterazione del colore (tonalità scura) degli stessi; l'imbrunimento infatti influenza le proprietà estetiche dei prodotti, fenomeno in cui l'enzima polifenolossidasi (PPO) gioca un ruolo fondamentale (tra i vari genotipi d'orzo, quelli a maggior contenuto in acidi fenolici sono più soggetti alla colorazione della pasta – Foto 5).



*Foto 5 – Colore della pasta del pane d'orzo*

Il miglioramento e/o la riduzione della colorazione si può ottenere attraverso alcuni accorgimenti:

- la perlatura dell'orzo oltre al 30%: garantisce colori brillanti e la stabilità degli stessi nei prodotti alimentari
- il trattamento termico a vapore: inibisce l'attività della PPO
- il trattamento termico ad infrarossi: riduce il tasso di oscuramento della pasta

- l'utilizzo di inibitori enzimatici
- l'esclusione dell'ossigeno

L'incorporazione di prodotti e sottoprodotti d'orzo in alimenti a base di frumento porta inevitabilmente ad alterazioni delle proprietà dei cibi, a causa degli effetti combinati e dovuti a:

- ❖ maggior diluizione del glutine con conseguenti modifiche delle proprietà visco-elastiche della pasta
- ❖ proprietà chimico-fisiche diverse dei cereali
- ❖ aumento dell'assorbimento di acqua per la presenza di elevato contenuto di fibra proveniente dall'orzo
- ❖ aumento della forza, del picco di resistenza durante la miscelazione, della stabilità e del modulo elastico della pasta, in funzione ai  $\beta$ -glucani e agli AX dell'orzo
- ❖ aumento della proprietà incollante dell'amido, abbassamento della viscosità del gel, aumento della temperatura di gelatinizzazione quali conseguenze della competizione per l'acqua disponibile da parte della fibra solubile dell'orzo, che ne limita così la disponibilità per l'amido ed impedisce in tal modo la gelatinizzazione

Nonostante questi inconvenienti, si è perseguito nel perfezionamento dell'introduzione di frazioni di fibre d'orzo in pasta, pane e prodotti secchi quali crackers e biscotti.

Le prime ricerche sono state condotte per realizzare pasta fresca e secca sottoforma di spaghetti e tagliatelle dietetici, utilizzando tipi d'orzo perlato arricchiti del 10% in  $\beta$ -glucani grazie alla scelta delle tecniche di taglio, fresatura e setacciatura. Inizialmente, le frazioni arricchite furono introdotte sostituendo il 50% della semola di grano duro, e permisero di ottenere una pasta più scura ma

con ottima qualità misurata in termini di viscosità, voluminosità, consistenza e perdita d'amido in fase di cottura.

Successivamente furono utilizzate farine di genotipi d'orzo privi di glume in sostituzione del 40% della farina di grano duro, con diversi livelli di amilasi nell'amido; la pasta ottenuta tratteneva un maggior quantitativo di acqua che, dopo il processo di estrusione, portava ad un eccessivo essiccamento e ad una tessitura meno ferma. Il colore, però, in questo esperimento risultava decisamente migliorato ed accettabile.

Tuttavia, in entrambi i casi, i risultati relativi all'aspetto e al colore sono stati considerati sufficienti dal momento che i consumatori percepiscono sempre più i cibi raffinati (e quindi "bianchi") come carenti in nutrienti.

Sia gli spaghetti che le tagliatelle, di colore giallo e bianco, freschi e secchi, sono stati ottenuti senza alcuna difficoltà attraverso le apparecchiature convenzionali, aspetto fondamentale nella valutazione dei costi di trasformazione dei processi tecnologici.

Inoltre, l'incorporazione di farina di orzo nella farina di grano permette di ottenere una pasta con aspetto tissutale "personalizzabile", con possibilità di soddisfare quindi mercati specifici, ossia:

1. la farina di orzo a cariosside nuda con amido normale o ad elevato contenuto in amilosio permette di ottenere una pasta con caratteristiche di maggior resilienza al masticamento e al morso
2. la farina di orzo a cariosside nuda con amido carente in amilosio determina maggior morbidezza e minore gommosità dell'impasto
3. le frazioni arricchite di fibre d'orzo, aggiunte nell'impasto in percentuale del 25%, determinano una pasta più scura e con presenza di "macchie", che chiaramente si originano dai frammenti delle pareti delle cellule appartenenti al pericarpo, allo strato aleuronico e alla crusca, e che si intersecano all'interno della struttura

In generale le caratteristiche sensoriali di “consistenza” di tagliatelle e spaghetti contenenti frazioni d’orzo integrate dimostrano che la natura viscosa e le proprietà di formazione di reti gelificanti da parte dei polisaccaridi non-amidacei contribuiscono positivamente sulla struttura della pasta.

Altri studi e sperimentazioni sono stati inoltre condotti per la produzione di pane integrato con orzo, mediante l’impiego di un 20% di frazioni arricchite in fibre ed incorporate nella farina integrale di grano; la pasta ottenuta possedeva una forza minore (misurata con il farinografo) ed una maggiore capacità di assorbimento dell’acqua (Fig. 6 esempio di farinogramma).

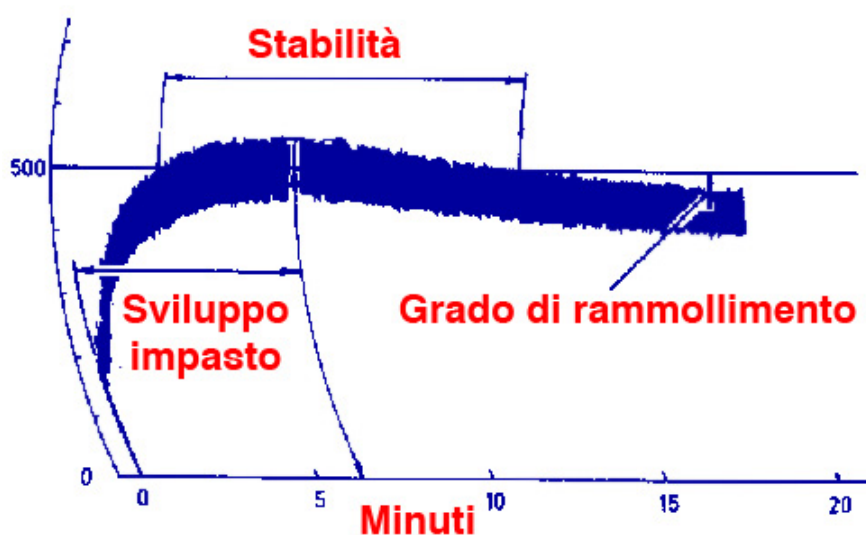


Fig. 6 – Esempio di farinogramma

Allo stesso tempo il prodotto presentava ottime caratteristiche relative all’aspetto, spezzettamento, strati di separazione nella mollica, struttura e diametro della briciola e aroma, quasi indistinguibili da quelle del pane ottenuto da farina di grano tenero (Fig. 7 esempio di alveogramma).

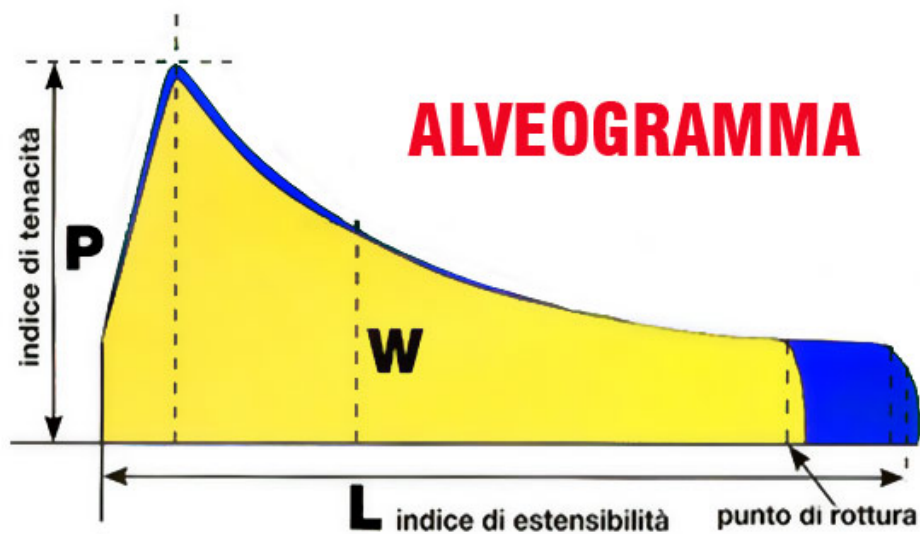


Fig. 7 – Esempio di alveogramma

La produzione di pane di tipo occidentale, di alta qualità, con farina di frumento arricchita da frazioni d'orzo, si è dimostrata però molto impegnativa; indipendentemente dal contenuto di amilosio dell'amido d'orzo, infatti, il volume del pane viene depresso a causa degli effetti combinati della diluizione del glutine e della disorganizzazione delle sue reti o maglie, fortemente legati alla presenza di elevati livelli di fibre.

Nonostante gli AX siano presenti nelle fibre d'orzo, il contributo maggiore sulle caratteristiche di minor volume della pagnotta e di struttura più solida della briciola sono da attribuire sicuramente alle proprietà dei  $\beta$ -glucani.

Si ipotizza, infatti, che i  $\beta$ -glucani favoriscano la presenza nella pasta di apprezzabili quantità di acqua strettamente legata, riducendo la disponibilità della stessa nella fase di sviluppo della rete di glutine e diminuendo in tal modo la capacità di trattenere gas. Tuttavia, l'effetto complessivo può anche dipendere dalle proprietà chimico-fisiche dei  $\beta$ -glucani, in quanto è stata osservata una riduzione del volume anche in pane di frumento ottenuto con l'aggiunta del 2% di composti a base di  $\beta$ -glucani con elevato e ridotto peso molecolare ( $M_w$  800,000 Dalton e  $M_w$  200,000 Dalton).

Altro fattore da non sottovalutare è l'ulteriore e sostanziale diminuzione del peso molecolare dei  $\beta$ -glucani, dovuta alla degradazione da parte di  $\beta$ -glucanasi endogene dell'orzo e del grano, che si verifica durante la miscelazione e la fermentazione della pasta, portando a veri e propri cambiamenti delle proprietà tecnologiche del pane.

Questa suscettibilità dei  $\beta$ -glucani all'azione delle  $\beta$ -glucanasi è un aspetto importante in quanto, come conseguenza della degradazione, viene ridotto l'effetto ipocolesterolemizzante dei  $\beta$ -glucani. E' stato osservato, inoltre, che solo i  $\beta$ -glucani ad alto peso molecolare vengono degradati dagli enzimi endogeni e quindi, durante la produzione di pane arricchito d'orzo, sarà fondamentale agire con tempi di miscelazione e di fermentazione più brevi possibili per poterli mantenere intatti.

Sono stati sperimentati tre processi di panificazione:

1. un processo di impastamento meccanico breve: ha dato risultati insoddisfacenti visto il limitato sviluppo del reticolo glutinico, con conseguente scarsa qualità della pasta, del volume ridotto del pane e caratteristiche inaccettabili delle briciole
2. un processo di fermentazione lunga e spontanea della pasta, con rimescolamento dopo i primi tre quarti d'ora di fermentazione: ha dato buoni risultati grazie alla distribuzione dell'acqua durante la fermentazione alcolica ed il successivo rimescolamento, probabilmente dovuta all'azione dei polisaccaridi non-amidacei dell'orzo
3. un processo di lievitazione della pasta con tempo di mezz'ora per l'assorbimento della  $CO_2$  prodotta dalla fermentazione: ha prodotto un pane d'orzo migliore e ricco in fibre, per effetto positivo della fermentazione sullo sviluppo ed idratazione del glutine

E' stato osservato che la pre-idratazione della frazione ricca di fibre, prima di essere aggiunta all'impasto, permette di ottenere un pane di miglior qualità,



anche se più facile alla rottura e alla briciola, rispetto al pane di farina di grano al 100%.

E' opportuno ricordare però che la qualità del pane sarà comunque fortemente influenzata dal processo finale di cottura.

## **6.2 Uso potenziale dei $\beta$ -glucani nei prodotti dell'industria lattiero-casearia**

Una recente ricerca si è concentrata sull'uso di fibra alimentare solubile, in particolare di  $\beta$ -glucani, per la produzione di yogurt, formaggi e gelati a basso apporto lipidico.

L'incorporazione di  $\beta$ -glucani, infatti, permette di ottenere latticini con ridotta percentuale di grassi, e con aspetti e caratteristiche sensoriali simili a quelli ottenibili dai prodotti ad elevato contenuto lipidico.

Nel processo produttivo dei formaggi, ad esempio, è stato osservato che la presenza dei  $\beta$ -glucani ha un'azione positiva durante la fase di gelificazione e migliora le caratteristiche reologiche dei prodotti. In effetti, l'aggiunta di soluzioni di  $\beta$ -glucani al latte determina delle modifiche sul processo di sviluppo della cagliata, riducendone i tempi di taglio e aumentandone la resa.

Queste varianti sembrano essere correlate alla capacità di gelificazione dei  $\beta$ -glucani, i quali permettono la formazione di un gel caseinico molto elastico, stabile, ben organizzato, con una matrice costituita da maglie intrecciate di glucani e caseine.

Nonostante questi miglioramenti, sono stati riscontrati degli aspetti negativi relativi all'alterazione del colore e del sapore, ma anche sulla consistenza della pasta e l'eccessiva morbidezza dei formaggi; nella produzione di formaggio Cheddar è stato osservato, infatti, che l'incorporazione di prodotti arricchiti in  $\beta$ -glucani, nella forma di Nutrim™, riduce significativamente la fermezza della pasta conferendo un aspetto colloso, fenomeno probabilmente dovuto alla maggiore sineresi che si verifica e alla proprietà di viscosità dei  $\beta$ -glucani aggiunti.

Tuttavia, avendo riscontrato che l'uso di soluzioni concentrate di  $\beta$ -glucani (22,5% di  $\beta$ -glucani nel prodotto) permette di ottenere prodotti con massimo controllo del contenuto in grasso, l'industria alimentare è volta a perseguire nuovi sistemi produttivi.

CAPITOLO 7  
EFFETTO DEI TRATTAMENTI TECNOLOGICI SULLE PROPRIETA'  
FUNZIONALI DEI  $\beta$ -GLUCANI

Le tecnologie di trasformazione dei prodotti alimentari possono influenzare le caratteristiche reologiche e funzionali dei  $\beta$ -glucani, in quanto incidono su alcuni dei loro aspetti fondamentali quali:

- la struttura molecolare
- il grado di polimerizzazione
- le interazioni molecolari
- le proprietà funzionali (viscosità, capacità di legare l'acqua, solubilità)
- i benefici fisiologici
- le caratteristiche sensoriali

Le alterazioni delle proprietà dei  $\beta$ -glucani possono essere determinate da:

- i danni da taglio durante le lavorazioni meccaniche
- l'eccessivo trattamento termico nei processi produttivi alimentari
- la purificazione commerciale, fase in cui si può verificare la depolimerizzazione della struttura lineare dei  $\beta$ -glucani, con conseguente diminuzione del peso molecolare e riduzione della viscosità
- le condizioni non appropriate di estrazione dei  $\beta$ -glucani (temperature di 50°-60°C non disattivano le  $\beta$ -glucanasi endogene, la cui presenza favorisce la depolimerizzazione)
- un aumento dei tempi di miscelazione e di fermentazione nella produzione di prodotti da forno (è stata osservata una diminuzione del peso molecolare dei  $\beta$ -glucani, cosa invece non riscontrata durante il processo di cottura)

E' evidente quindi che “la sfida” dell'industria alimentare sarà rivolta ad ampliare le conoscenze e la comprensione sull'uso dei  $\beta$ -glucani, nonché ottimizzare le procedure di estrazione e di produzione per poter meglio influire sulle caratteristiche nutrizionali degli alimenti “fortificati” e “funzionali”.

## CAPITOLO 8

### QUADRO NORMATIVO EUROPEO SUGLI ALIMENTI FUNZIONALI

A seguito del crescente interesse per il concetto di alimenti funzionali e per gli health claims, l'Unione Europea ha realizzato una Azione Concertata della Commissione Europea sulla Functional Food Science in Europe (FUFOSE). Il programma è stato coordinato dall'International Life Sciences Institute (ILSI), con l'obiettivo di stabilire e sviluppare un approccio scientificamente fondato sulle evidenze richieste a sostegno dello sviluppo di prodotti alimentari che possono avere effetti benefici su una specifica funzione biologica, migliorando lo stato di salute e il benessere di una persona e/o riducendo il rischio di malattia. Il progetto FUFOSE ha preso in esame sei aree scientifiche e salutistiche: crescita, sviluppo e differenziazione cellulare, metabolismo basale, difese dai composti ossidanti, alimenti funzionali e sistema cardiovascolare, fisiologia e funzionalità gastrointestinale ed effetti degli alimenti sul comportamento e sul profilo psicologico. Il documento finale è stato pubblicato sul British Journal of Nutrition.

Questo rapporto sottolinea come gli alimenti funzionali debbano comunque restare "alimenti", come tradizionalmente li conosciamo, e dovrebbero dimostrare la loro efficacia funzionale nelle quantità normalmente consumate nella dieta.

Funzionale può essere un alimento integrale naturale, un alimento a cui è stato aggiunto un componente, o un alimento da cui è stato eliminato un elemento con mezzi tecnologici o biotecnologici. Può anche trattarsi di un alimento in cui è stata modificata la natura di uno o più componenti, o la biodisponibilità di uno o più elementi, o una qualsiasi combinazione di queste possibilità. Può essere destinato alla popolazione in genere o a gruppi specifici di persone che possono essere definiti, per esempio, in base all'età o alla costituzione genetica.

L'Azione Concertata della UE sostiene lo sviluppo di due tipi di health claims per gli alimenti funzionali, che devono sempre essere validi nell'ambito

dell'alimentazione nella sua globalità e devono riferirsi a quantitativi di cibo normalmente consumati in una dieta.

Tali health claims sono:

- TIPO A: claims correlati al “miglioramento di una funzione biologica” in riferimento a specifiche attività fisiologiche, psicologiche e biologiche che vanno oltre il ruolo accertato nella crescita, nello sviluppo e in altre normali funzioni dell'organismo (ad esempio, come già ampiamente descritto, i  $\beta$ -glucani favoriscono la crescita di una determinata flora batterica nell'intestino)
- TIPO B: claims correlati alla “riduzione del rischio di malattia” che si riferiscono al consumo di un alimento o di un componente alimentare che potrebbe contribuire alla riduzione del rischio di una data malattia o di uno stato patologico grazie a specifici nutrienti o non nutrienti in esso contenuti (per esempio, come già osservato, gli AX migliorano l'assorbimento del calcio contribuendo in tal modo nel ridurre il rischio di osteoporosi nell'anzianità, hanno inoltre proprietà ipocolesterolemizzanti e ipoglicemizzanti)

Benché non esista una legislazione europea specifica in materia di sicurezza degli alimenti funzionali, gli aspetti di sicurezza alimentare sono già contemplati dalle attuali normative UE. Tuttavia, gli alimenti che rivendicano proprietà salutistiche devono tenere in considerazione il valore dietetico globale, compresa la quantità e la frequenza di consumo, ogni potenziale interazione con altri costituenti alimentari, qualsiasi impatto sul metabolismo e i potenziali effetti negativi, tra cui i rischi di allergie ed intolleranze.

## **Conclusioni**

Gli alimenti funzionali, consumati nell'ambito di una dieta e di uno stile di vita equilibrato, offrono grandi potenzialità nel miglioramento della salute e/o nel contribuire alla prevenzione di determinate malattie.

La questione degli *Health Claims* sta assumendo un'importanza crescente e vi è ampio consenso sulla necessità di un quadro normativo UE che tuteli i consumatori, favorisca il commercio e promuova l'innovazione del prodotto nell'industria alimentare. La ricerca in campo tecnologico richiede ulteriori sviluppi per ottimizzare i processi produttivi e di estrazione delle fibre dai diversi cereali.

Le opportunità di ricerca in campo nutrizionale in relazione agli effetti benefici di Ax e glucani e nella prevenzioni di diverse patologie, costituiscono la sfida più impegnativa per gli scienziati di oggi e di domani.

A tal proposito, dal 2005 è iniziato il progetto *HEALTHGRAIN* finanziato dalla Commissione Europea il cui obiettivo è quello di sfruttare la bioattività dei cereali a vantaggio della nutrizione e della salute, per poter migliorare il benessere dei consumatori e ridurre il rischio di malattie metaboliche in Europa, incrementando l'assunzione di composti protettivi presenti nei cereali integrali e nelle loro frazioni.





## Lista delle abbreviazioni

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Solfato d'ammonio
$[\eta]$	Viscosità intrinseca
A	Arabinosio
A/X	Arabinosio in rapporto allo xilosio
AE-AX	Alkaline-Extraction Arabinoxylans
AX	Arabino-Xylans
$\text{Ba}(\text{OH})_2$	Idrossido di bario
$c$	Concentrazione
$\text{CO}_2$	Anidride carbonica
CYP7AI	Enzima colesterolo-7-alpha-idrolasi
DDFA	Dehydro-di-ferulic-acids
DF	Dietary Fibre
DP	Degree Polymerization
EFSA	European Food Safety Agency
FDA	Food and Drug Administration
FUFOSE	Functional Food Science in Europe
$G'$	Modulo Elastico
GT2	Glycosyl-Transferases 2
HDL	High Density Lipoproteins
ILSI	International Life Sciences Institute
LDL	Low Density Lipoproteins
$L_p$	Persistence Length
$M_w$	Molecular Weight
NaOH	Idrossido di sodio
PPO	Poli-Phenol-Oxidase
$R_g$	Radius of gyration
SCFA	Short Chain Fatty Acids
SDF	Soluble Dietary Fibre

UDP	Uridine-di-posphate
UE	Unione Europea
WE-AX	Water-Extractable Arabinoxylans
WU-AX	Water-Unextractable Arabinoxylans
X	Xilosio
XE-AX	Xylanase-Extraction Arabinoxylans
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\nu$	Parametro idrodinamico

## Bibliografia

1. Ahluwalia, B., & Fry, S. C. (1986). Barley endosperm cell walls contain a feruloylated arabinoxylan and a non-feruloylated  $\beta$ -glucan. *Journal of Cereal Science*, 4, 287-295.
2. American Dietetic Association (1993). Position of American Dietetic Association: Health implications of dietary fibre. *Journal of the American Dietetic Association*, 93, 1446-1447.
3. Ames, N., Rhymer, C., Rossnagel, B., Thierrien, M., Ryland, D., Dua, S., et al. (2006). Utilization of diverse hulless barley properties to maximize food product quality. *Cereal foods World*, 51(1), 23-28.
4. Andersson, A. A., M., Andersson, R., & Aman, P. (2000). Air classification of barley flours. *Cereal Chemistry*, 77(4), 463-467.
5. Andersson, A. M., Armö, E., Grangeon, E., Fredriksson, H., Andersson, R., & Aman, P. (2004). Molecular weight and structure units of (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucans in dough and bread made from hull-less barley fractions. *Journal of Cereal Science*, 40(3), 194-204.
6. Andersson, A. A.M., Elfverson, C., Andersson, R., Regner, S., & Aman, P. (1999). Chemical and physical characteristics of different barley samples. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(7), 979-986.
7. Andersson, R., Westerlund, E., Aman, P. (1994). Natural variations in the contents of structural elements of water-extractable nonstarch polysaccharides in white flour. *Journal of Cereal Science*, 19, 77-82.
8. Andrewartha, K. A., Phillips, D. R., Stone, B. A. (1979). Solution properties of wheat flour arabinoxylans and enzymically modified arabinoxylans. *Carbohydrate Research*, 77, 191-204.
9. Antoine, C., Peyron, S., Mabilille, F., Lapierre, C., Bouchet, B., Abecassis, J., et al. (2003). Individual contribution of grain outer layers and their cell wall structure to the mechanical properties of wheat bran. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51(7), 2026-2033.

10. Bacic, A., & Stone, B. A. (1981a). Isolation and ultrastructure of aleurone cell walls from wheat and barley. *Australian Journal of Plant Physiology*, 8, 453-474.
11. Baci, A., & Stone, B. A. (1981b). Chemistry and organization of aleurone cell wall components from wheat and barley. *Australian Journal of Plant Physiology*, 8, 475-495.
12. Barron, C., Surget, A., & Rouau, X. (2007). Relative amounts of tissue in mature wheat grain and their carbohydrate and phenolic acid composition. *Journal of Cereal Science*, 45(1), 88-96.
13. Başman, A., & Köksel, H. (1999). Properties and composition of Turkish flat bread supplemented with barley flour and wheat bran. *Cereal Chemistry* 76(4), 506-511.
14. Beer, M. U., Wood, P. J., & Weisz, J. (1997). Molecular weight distribution and (1→3)(1→4)-β-D-glucan content of consecutive extracts of various oat and barley cultivars. *Cereal Chemistry*, 74(4), 476-480.
15. Behall, K. M., Scholfield, D. J., and Hallfrisch, J. (2004). Lipids significantly reduced by diets containing barley in moderately hypercholesterolemic men. *Journal of the American College of Nutrition*, 23, 55-62.
16. Behall, K. M., Scholfield, D. J., and Hallfrisch, J. (2005). Comparison of hormone and glucose response of overweight women to barley and oats. *Journal of the American College of Nutrition*, 24, 182-188.
17. Behall, K. M., Scholfield, D. J., and Hallfrisch, J. (2006). Barley β-glucan reduced plasma glucose and insulin response compared with resistant starch in men. *Nutrition Research*, 26, 644-650.
18. Berglund, P. T., Fastnaught, C. E., & Holm, E. T. (1992). Food uses of waxy hull-less barley. *Cereal Foods World*, 37(7), 707-714.
19. Bhatta, R. S. (1993). Extraction and enrichment of (1→3)(1→4)-β-D-glucan from barley and oat brans. *Cereal Chemistry*, 70(1), 73-77.

20. Bhatta, R. S. (1995). Laboratory and pilot plant extraction and purification of  $\beta$ -glucans from hull-less barley and oat brans. *Journal of Cereal Science*, 22(2), 163.
21. Bhatta, R. S. (1997). Milling of regular and waxy starch hull-less barleys for the production of bran and flour. *Cereal Chemistry*, 74(6), 693-699.
22. Bhatta, R. S. (1999).  $\beta$ -glucan and flour yield of hull-less barley. *Cereal Chemistry*, 76(3), 314-315.
23. Bhatta, R. S., & Rosnagel, B. G. (1998). Comparison of pearled and unpearled Canadian and Japanese barleys. *Cereal Chemistry*, 75(1), 15-21.
24. Bohm, N. & Kulicke, W. M. (1999a). Rheological studies of barley (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucan in concentrated solution: mechanistic and Kinetic investigation of the gel formation. *Carbohydrate Research*, 315, 302-311.
25. Bohm, N. & Kulicke, W. M. (1999b). Rheological studies of barley (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucan in concentrated solution: investigation of the viscoelastic flow behaviour in the sol state. *Carbohydrate Research*, 315, 293-301.
26. Beaugrand, J., Cronier, D., Debeire, P., Chabbert, B. (2004). Arabinoxylan and hydroxycinnamate content of wheat bran in relation to endoxylanase susceptibility. *Journal of Cereal Science*, 40, 223-230.
27. Bhatta, R. S., Macgregor, A. W., Rosnagel, B. G. (1991). Total and acid-soluble beta glucan content of hullless barley and its relationship to acid-extract viscosity. *Cereal Chemistry*, 68, 221-227.
28. Boros, D., lukaszewski, A. J., Aniol, A., Ochodzki, P. (2002). Chromosome location of genes controlling the content of dietary fibre and arabinoxylans in rye. *Euphytica*, 128, 1-8.
29. Bunzel, M., Ralph, J., Funk, C., Steihart, H. (2003). Isolation and identification of a ferulic acid dehydrotrimer from saponified maize bran insoluble fibre. *European Food Research and Technology*, 217, 128-133.
30. Courtin, C. M., Dlcour, J. A. (2002). Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. *Journal of Cereal Science*, 35, 225-243.

31. Delcour, J. A., Van Win, H., Groebet, P. J. (1999). Distribution and structural variation of arabinoxylans in common wheat mill streams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 271-275.
32. Delaney B., Nicolosi, R.J., Wilson T.A., Carlson T., Frazer, S., Zheng G.H., Hess, R., Ostergren, K., Haworth L., Knutson, N. 2003. Beta-glucan fractions from barley and oats are similarly antiatherogenic in hypercholesterolemic Syrian golden hamsters. *Journal of Nutrition* 133, 468-475.
33. Dongowsky, G., Huth M., Gebhardt E., Flamme, W. 2002. Dietary fibre rich barley products beneficially affect the intestinal tract of rats. *Journal of nutrition*, 132, 3704-3714.
34. Fincher, G. B., Stone, B. A. (1996). Cell walls and their components in cereal grain technology. In Y. Pomeranz (Ed.), *Advances in Cereal science and Technology*. American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN, pp. 207-295.
35. Girhammar, U., Nair, B. M. (1992). Certain physical-properties of water-soluble non-starch polysaccharides from wheat, rye, triticale, barley and oats. *Food Hydrocolloids*, 6, 329-343.
36. Hosenery, R. C., Faubion, J. M. (1981). A mechanism for the oxidative gelation of wheat-flour water-soluble pentosans. *Cereal Chemistry*, 58, 421-424.
37. Huges, S.A., Schewry P.R., Gibson, G.R., McCleary, B.V., Rastall, R.A. 2008. In vitro fermentation of oat and barley derived  $\beta$ -glucans by human fecal microbiota. *Fems Microbiology Ecology*, 64, 482-493.
38. Iiyama, K., Lam, T. B. T., Stone, B. A. (1994). Covalent cross-links in the cell wall. *Plant physiology*, 104, 315-320.
39. Kulkarni, N., Shendye, A., Rao, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 411-456.
40. Lam, T. B. T., Kadoya, K., Iiyama, K. (2001). Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and para-coumaric acids are predominantly linked at

- the benzyl position of lignin, not the beta position, in grass cell walls. *Phytochemistry*, 57, 987-992.
41. Mantovani, M.S, Bellini M.F., Angeli J.P.F., Oliveira R.J., Silva A.F., Ribeiro L.R. 2008. B-glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. *Mutation Research* 658, 154-161.
  42. Mares, D. J. Stone, B. A. (1973). Studies on wheat endosperm. Chemical composition and ultra structure of the cell walls. *Australian Journal of Biological Science*, 26, 793-812.
  43. Ordaz-Ortiz, J. J., deVaux, M. F., Saulnier, L. (2005). Classification of wheat varieties based on structural features of arabinoxylans as revealed by endoxylanase treatment of flour and grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8349-8356.
  44. Porchia, A. C., Sorensen, S. O., Scheller, H. V. (2002). Arabinoxylan biosynthesis in wheat. Characterization of arabinosyl-transferase activity in Golgi membranes. *Plant physiology*, 130, 432-441.
  45. Rattan, O., Izydorczyk, M. S., Biliaderis, C. G. (1994). Structure and rheological behaviour of arabinoxylans from Canadian bread wheat flours. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 27, 550-555.
  46. Reimer, A. R., Thomson A.B.R., Rajotte R.V., Basu T.K., Ooraikul B., McBurney, M.I. 2000. Proglucagon messenger ribonucleic acid and intestinal glucose uptake are modulated by fermentable fibre and food intake in diabetic rats. *Nutrition Research* 20, 851-864.
  47. Saulnier, L., Peneau, N., Thibault, J. F. (1995a). Variability in grain extract viscosity and water-soluble arabinoxylan content in wheat. *Journal of Cereal Science*, 22, 259-264.
  48. Tahami A.A., El -Gohr A.A., El-Nahas S.M., Noshay, M.M. 2003.  $\beta$ -glucan inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adriamycin and cisplatin. *Mutation Research*. 541, 45-53.
  49. Udy, D. C. (1956). The intrinsic viscosities of the water-soluble component of wheat flour. *Cereal Chemistry*, 33, 67-74.

50. Vincken, J. P., de Keizer, A., Beldman, G., Voragen, A. (1995). Fractionation of xyloglucan fragments and their interaction with cellulose. *Plant Physiology*, 108, 1579-1585.
51. Wang, M., oudgenoeg, G., van Vliet, T., Hamer, R. J. (2003). Interaction of water unextractable solids with gluten protein: effect on dough properties and gluten quality. *Journal of Cereal Science*, 38, 95-104.
52. Williams B.A., Mikkelsen, D., Le Paih, L., Gidley M.J. 2010. In vitro fermentation kinetics and end-products of cereal arabinoxylans and (1,3;1,4)- $\beta$ -glucans by porcine faeces. *Journal of cereal science*. In press.
53. Zhang, P., Zhang, Q., Whistler, R.L. 2003. L-Arabinose release from arabinoxylans and arabinogalactan under potential gastric acidities. *Cereal Chemistry*, 80 (3), 252.254.

## **Sitografia**

<http://agricolturablognetwork.it>

<http://community.aster.it>

<http://energybalance.info>

<http://ilo.unife.it>

<http://it.wikipedia.org>

<http://secure.netsolhost.com>

<http://www.eufic.org>

<http://www.galbusera.it>