DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE (DIPSA)
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
SOC. COOP. AGRICOLA BIODIVERSI

"PANE DELLA SALUTE: PROGETTO DI FILIERA CORTA PER LA VALORIZZAZIONE DI ANTICHE ACCESSIONI DI FRUMENTO TENERO"

RELAZIONE FINALE

Coordinatore del progetto: PROF. GIOVANNI DINELLI

Dipartimento di Scienze Agrarie
Viale Fanin 44 – 40127 Bologna
Email: giovanni.dinelli@unibo.it

INDICE

1.	PREMESSA GENERALE E OBIETTIVI DELLA RICERCA	2
2.	ALLESTIMENTO DELLA PROVA DI CAMPO	2
3.	RILIEVI AGRO-METEREOLOGICI E FENOLOGICI DELLE ANNATE AGRARIE 2009/2010 E 2010/2011	5
4.	RESA IN GRANELLA E QUALITA' COMMERCIALE	7
5.	VALUTAZIONI FITOPATOLOGICHE E ANALISI DELLE MICOTOSSINE	9
5.1.	Fusariosi	9
5.2.	Determinazione dei livelli di micotossine nella granella	10
6.	PROPRIETA' NUTRIZIONALI E NUTRACEUTICHE DELLE VARIETA' OGGETTO DI STUDIO ED EFFETTO DEI TRATTAMENTI BIODINAMICI	12
6.1.	Determinazione del contenuto in proteine, glutine, amido e lipidi	12
6.2	Determinazione del contenuto in ceneri ed elementi minerali	13
6.3.	Determinazione del contenuto in fibra alimentare	16
6.4.	Determinazione del contenuto in amido resistente	19
6.5.	Determinazione del contenuto in polifenoli e flavonoidi	20
6.6.	Analisi dell'attività antiossidante	26
6.7.	Determinazione del contenuto in carotenoidi	27
7.	PROPRIETA' REOLOGICHE DELLE FARINE	28
8.	PANEL TEST: ANALISI SENSORIALE SUI PRODOTTI FINITI (PANE)	30
9.	STUDIO DI INTERVENTO IN VIVO: VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEL CONSUMO DI PANE SUI PARAMETRI CORRELATI AL PROCESSO ATEROSCLEROTICO	34
CONCLUSIONI		36
BIBLIOGRAFIA		37

1. PREMESSA GENERALE E OBIETTIVI DELLA RICERCA

Il frumento è una delle principali colture nazionali e un'importante componente della dieta tradizionale italiana. Numerosi studi in letteratura hanno dimostrato che il consumo di prodotti a base di farina integrale di frumento può essere associato alla riduzione dell'incidenza di patologie cardiovascolari, diabete e tumori (Thompson, 1994; Jacobs et al., 1998; Adom et al., 2003). Questi effetti benefici sono da attribuire al peculiare contenuto in composti bioattivi della cariosside di frumento. In passato la ricerca sulla coltivazione del frumento è stata incentrata sul miglioramento della produzione, della resistenza a malattie e patogeni, e delle caratteristiche tecnologiche per la trasformazione. Scarsa attenzione è stata invece posta alle proprietà nutritive e ancor più nutraceutiche delle varietà migliorate. Nel caso del frumento tenero ciò ha portato, negli ultimi 50 anni, all'affermarsi di poche varietà selezionate che potessero rispondere alle esigenze dell'agricoltura convenzionale, garantendo elevate produzioni. Questa tendenza ha inevitabilmente favorito un processo di erosione genetica con perdita di geni utili e geni dalle potenzialità inespresse, portando a un forte restringimento della base genetica del genere *Triticum*. Tuttavia, negli ultimi tempi, il crescente interesse della ricerca verso gli effetti benefici degli alimenti ha dato notevole rilevanza al ruolo dei fitochimici introdotti quotidianamente attraverso il consumo di prodotti a base di frumento. In questo ambito un notevole interesse è stato rivolto alle varietà antiche, come fonte di variabilità genetica e in particolare per le potenziali proprietà nutraceutiche. Inoltre il tipo di gestione agronomica (convenzionale, biologica e biodinamica), così come la cultivar utilizzata, costituisce una componente importante nel determinare la qualità tecnologica e nutrizionale della granella. Successivamente i processi di trasformazione, il grado di raffinazione della farina, lo stoccaggio e nel caso specifico del pane la fermentazione e i trattamenti termici (cottura), concorrono anch'essi a modificare il contenuto finale in metaboliti secondari e la loro biodisponibilità (Dietrych-Szostak e Oleszek, 1999; Liukkonen et al., 2003; Falk et al., 2004; Ekinci, 2005; Gujska e Majewska, 2005). Risulta quindi fondamentale considerare tutte le fasi di produzione che vanno dalla semina all'ottenimento del prodotto finale (pane) per la completa determinazione delle proprietà funzionali. I genotipi delle varietà antiche di frumento tenero costituiscono un'importante bacino genetico di biodiversità per uno studio mirato all'identificazione di genotipi con parametri qualitativi di pregio (proprietà funzionali e salutistiche). La caratterizzazione dei profili fitochimici di tali genotipi, affiancata da studi agronomici, di qualità tecnologica e dell'attitudine panificatoria, può dunque portare all'ottenimento di alimenti arricchiti in modo naturale di componenti con accertata attività funzionale. Inoltre, tale ricerca consente di studiare gli effetti dell'ambiente di coltivazione e delle caratteristiche varietali sul contenuto in composti bioattivi, fornendo un approccio valido per una futura valorizzazione e qualificazione delle produzioni cerealicole nazionali.

2. ALLESTIMENTO DELLA PROVA DI CAMPO

Le tre varietà oggetto di studio includevano due varietà antiche (Inallettabile, Verna) e una cultivar moderna (Palesio). Le accessioni di antica costituzione sono state selezionate a partire da un germoplasma di frumento disponibile presso il Dipartimento di Scienze Agrarie dell'Università di Bologna, sulla base di precedenti prove sperimentali. La varietà moderna Palesio è stata scelta tra le varietà maggiormente diffuse in Emilia Romagna, selezionata come riferimento per le nuove varietà iscritte al registro varietale ENSE. Le tre varietà sono state seminate per due annate agrarie consecutive (2009/2010, 2010/2011) presso l'azienda Società Cooperativa Agricola Biodiversi (Parco della Chiusa Casalecchio di Reno; Coop. Agricola La Collina, Reggio Emilia), con una densità di semina pari a 180 kg/ha.

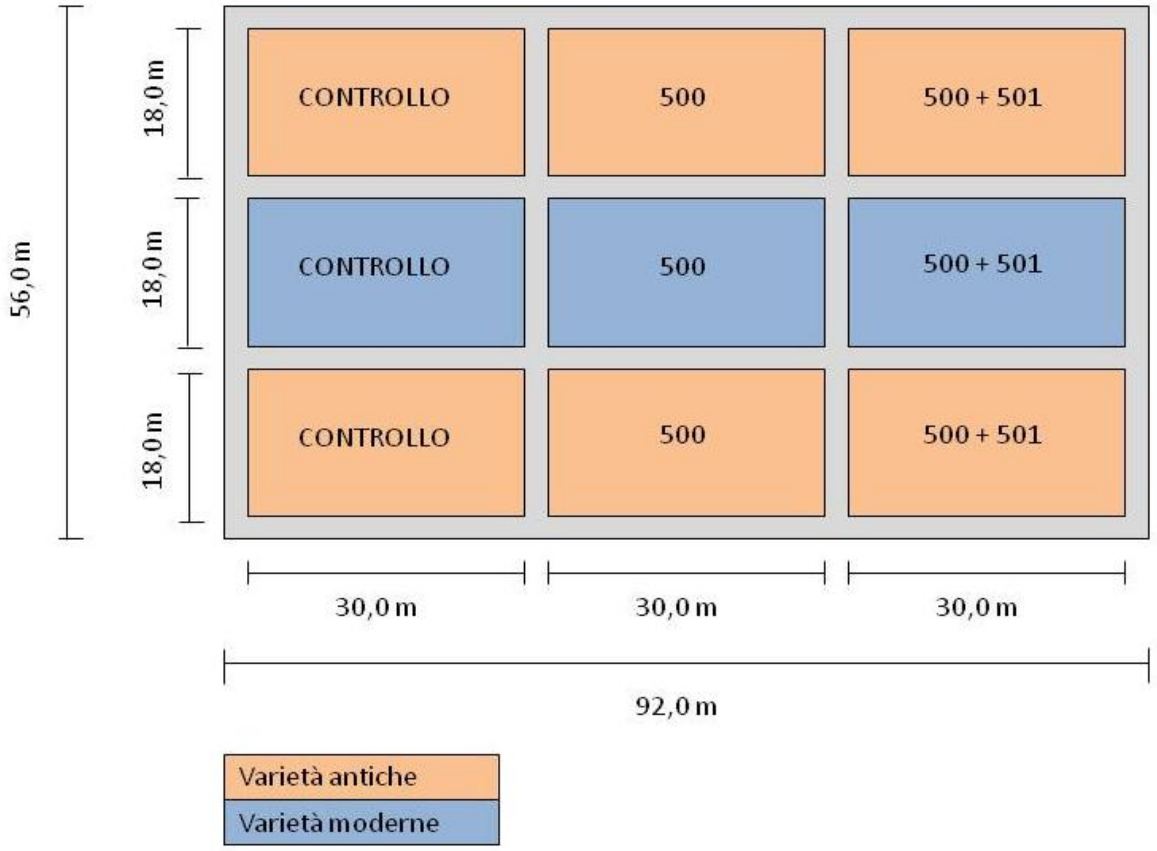


Figura 1. Schema sperimentale della prova di campo.

Lo schema sperimentale prevedeva tre tesi per ciascuna varietà:

- **TESI 1**: trattamento con preparato biodinamico 500 (corno letame)
- **TESI 2**: trattamento con preparato biodinamico 500 + 501 (corno letame + corno silice)
- **TESI 3**: controllo non trattato

Le tesi sono state disposte in pieno campo secondo uno schema sperimentale con 1 sola replica dove il main plot considerato è il livello del fattore varietà e come sub plot il tipo di varietà (varietà antiche e varietà moderna) (**Figura 1**). Ogni parcella aveva dimensioni pari a 18,0 x 30,0 m per consentire le operazioni di semina e raccolta con macchine operatrici noleggiate da contoterzisti. La superficie utilizzata per ciascuna prova annuale è risultata dunque pari a 4860,0 mq (540,0 mq x 9 tesi).

La gestione agronomica della prova sperimentale è stata condotta in accordo alle specifiche metodiche colturali biodinamiche, basate su alcuni principi fondamentali quali l'attivazione del terreno, per incrementare la biodisponibilità delle sostanze nutritive e facilitarne l'assorbimento da parte delle piante, la stimolazione del passaggio di sostanze nutritive dall'atmosfera alla terra attraverso le attività fisiologiche delle piante e la promozione dell'auto-regolazione delle piante, al fine di ottenere alimenti caratterizzati da un giusto equilibrio delle sostanze nutritive, a beneficio dei consumatori. Tali principi sono marcatamente in contrasto con le pratiche dell'agricoltura convenzionale, basata all'opposto su apporti chimici esterni di elementi nutritivi (concimi) e sostanze protettive/curative (fitofarmaci). In particolare, l' azienda non ha fatto ricorso durante il ciclo colturale alla letamazione o alla somministrazione di altri concimi ammessi in agricoltura biologica: l'area in cui sono state effettuate le prove di campo è stata oggetto di sovescio con foraggere e/o graminacee nel corso dell'annata agraria precedente alla sperimentazione (in

particolare prato poliennale per la prima stagione di crescita e orto/fagiolo per la seconda annata). L'intera area sperimentale non è stata coltivata con frumento nelle due annate agrarie precedenti l'inizio della sperimentazione. In accordo all'agrotecnica biodinamica, la rotazione, il cumulo (o compost) e i preparati biodinamici sono gli strumenti deputati a rafforzare la capacità auto-regolativa della terra, delle piante e dell'azienda agricola nel suo complesso. Di particolare rilevanza per l'approccio biodinamico sono i due preparati "da spruzzo": il preparato 500 (o cornoletame) (**TESI 1**) a base di letame, da irrorare sul terreno per favorire l'attività radicale e la crescita delle piante, ed il preparato 501 (o cornosilice) (**TESI 2**), a base di polvere di quarzo, da irrorare sulle piante per stimolare l'assimilazione e la fruttificazione. Nella **Tabella 1** vengono riportate le principali misure agronomiche adottate nella gestione delle prove sperimentali nell'azienda Biodiversi per le annate agrarie 2009/2010 e 2010/2011.
In entrambe le annate agrarie le semine sono state effettuate tardivamente (17 novembre 2009; 27 novembre 2010), per ragioni principalmente climatiche legate a piogge incessanti occorse nel periodo antecedente la semina. Nel corso della semina, per la prima annata agraria è stata effettuata una semina manuale a spaglio mentre per la seconda annata è stato possibile procedere con la semina meccanizzata mediante seminatrice parcellare. In entrambi gli anni, la raccolta è stata effettuata mediante l'utilizzo di mieti-trebbia il 16 luglio 2010 ed il 15 luglio 2011, con cicli colturali di 241 e 230 giorni rispettivamente.

Tabella 1. Caratteristiche salienti della gestione agronomica della prova sperimentale nel corso delle annate agrarie 2009/2010 e 2010/2011.

	2009/2010	**2010/2011**
Precessione colturale	Prato poliennale (2007-2009)	Verza/Insalata/Fagiolo (2009-2010)
Lavorazioni terreno		1 ripuntatura 35 cm
Aratura	25-30 cm	
Affinatura	2 passaggi con vibro-coltivaotre	2 passaggi con vibro-coltivatore
Preparati da spruzzo		
500	2 applicazioni (in pre-semina)	2 applicazioni (in pre-semina)
501	1 applicazione (in pre-levata)	1 applicazione (in pre-levata)
Altri trattamenti		--
Preparato biodinamico a base di equiseto	---	
Trattamento contro la lemna del frumento (in spigatura)	Piretro (in accordo ai dosaggi ammessi in biodinamica)	---
Principali avversità rilevate	Lema del frumento (20-30% delle foglie), presenza limitata di afidi	Allettamento parziale per vento e pioggia
Data di semina	17 Nov 2009	27 Nov 2010
Densità di semina	200 kg/ha	200 kg/ha
Modalità semina	Manuale a spaglio	Meccanica con seminatrice parcellare
Data di raccolta	16 Lug 2010	15 Lug 2011
Modalità raccolta	Meccanica con mieti-trebbia parcellare	Meccanica con mieti-trebbia parcellare
Durata ciclo colturale (giorni)	241	230

Nel corso del ciclo colturale del primo anno di sperimentazione (2009/2010), in fase di spigatura è stato osservato un attacco di media intensità della Lema del frumento. La Lema (*Lema melanoma*) è un coleottero che, sia nella sua forma adulta che in quella larvale, attacca le foglie del frumento. Nella prova sperimentale sono state osservate sia le larve che le caratteristiche erosioni fogliari longitudinali, parallele alle nervature, causate dalla attività masticatoria delle larve sulla pagina superiore delle foglie. Sebbene generalmente gli attacchi della Lema in fase di spigatura abbiano limitati effetti sulla produzione, è stato effettuato un trattamento con piretro (in accordo ai dosaggi ammessi in agricoltura biodinamica), allo scopo anche di controllare una leggera infestazione di afidi del frumento (*Sitobium avenae*). Nel corso della seconda annata agraria (2010/2011) non sono invece state riscontrate gravi infestazioni da patogeni. La principale avversità è risultata relativa a un parziale allettamento delle varietà di antica costituzione (a taglia alta) dovuto a fattori climatici quali vento e pioggia nelle ultime fasi del ciclo di crescita.

3. RILIEVI AGRO-METEREOLOGICI E FENOLOGICI DELLE ANNATE AGRARIE 2009/2010 E 2010/2011

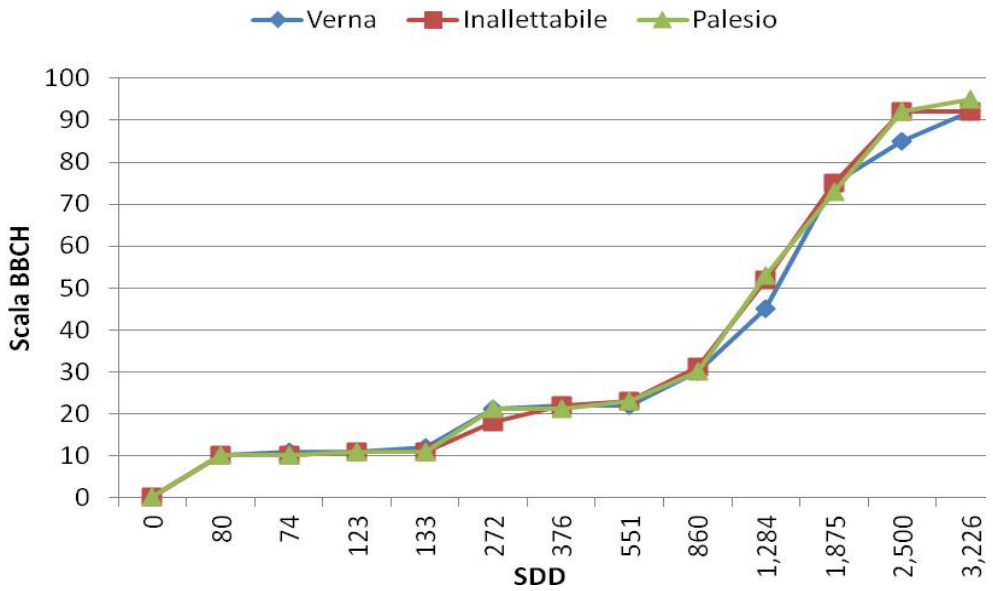
Durante lo svolgimento delle prove di pieno campo sono stati raccolti i principali dati meteorologici (precipitazioni, temperatura media minima e massima) mediante l'installazione di una centralina meteo in grado di memorizzare dati relativi a temperature, precipitazioni, umidità relativa, punto di rugiada, velocità e direzione del vento. Le variazioni occorse per tali parametri consentono di correlare la variabilità dei parametri produttivi e nutrizionali con i fattori ambientali, nonché l'interazione tra genotipo, ambiente e trattamento. In **Tabella 2** sono riportati i valori dei principali parametri meteorologici (temperatura, precipitazioni) registrati nel corso delle due stagioni di crescita. I mesi invernali (Dicembre, Gennaio, Febbraio) hanno mostrato temperature medie simili nelle due annate agrarie, raggiungendo valori minimi non comuni per la regione Emilia Romagna, pari a -10°C nel primo e -11°C nel secondo anno. Per quanto riguarda le precipitazioni, è stato osservato un generale aumento delle precipitazioni invernali durante il secondo anno (2010/2011) rispetto all'annata precedente. Nel corso dei mesi primaverili (Marzo, Aprile, Maggio), sono stati osservati valori medi di temperatura pressoché simili in entrambe le annate. Differenze considerevoli si possono osservare considerando la quantità di precipitazioni significativamente superiore durante la primavera e l'estate della prima annata agraria rispetto alla seconda. Le più abbondanti precipitazioni (>150 mm) sono state osservate nei mesi di Aprile, Maggio e Giugno, raggiungendo picchi di 394.8 e 411.6 mm. Al contrario, le fasi finali del ciclo colturale 2010/2011 sono state caratterizzate da condizioni marcatamente più secche, con precipitazioni quasi assenti nei mesi di Aprile, Maggio e Giugno.

Tabella 2. Temperature medie (°C) e precipitazioni (mm) mensili registrate presso l'azienda Agr. Coop. Biodiversi nelle annate agrarie 2009/2010 e 2010/2011.

	TEMPERATURA (°C)			PRECIPITAZIONI (mm)	
	2009/2010	2010/2011		2009/2010	2010/2011
Nov	9.8	2.3		124.0	124.0
Dic	3.1	2.5		67.8	179.1
Gen	0.9	1.6		65.0	54.0
Feb	4.7	4.7		66.0	147.3
Mar	8.0	8.9		84.0	179.7
Apr	14.4	15.8		144.6	9.0
Mag	18.6	18.6		394.8	16.2
Giu	23.4	21.5		411.6	115.2
Lug	27.3	23.1		5.6	25.2
Media	12.2	11.0	Totale	1363.4	849.7

Durante lo svolgimento della prova sperimentale, in entrambe le annate agrarie, è stata effettuata una caratterizzazione agronomica delle fasi fenologiche delle accessioni oggetto di studio, utilizzando la scala fenologica BBCH - Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and CHemical Industry (Stauss, 1994), un sistema ideato per codificare uniformemente stadi fenologici di sviluppo analoghi, osservabili sia in specie monocotiledoni che dicotiledoni. In **Figura 2** sono riportati gli andamenti fenologici delle tre varietà oggetto di studio, osservati nelle due annate agrarie, espressi sulla base della somma dei gradi giorno (SDD). Le differenze osservate negli stadi di crescita e sviluppo sono risultate maggiormente influenzate dalle caratteristiche varietali piuttosto che dalle differenti condizioni climatiche occorse nei due anni di coltivazione.

A)



B)

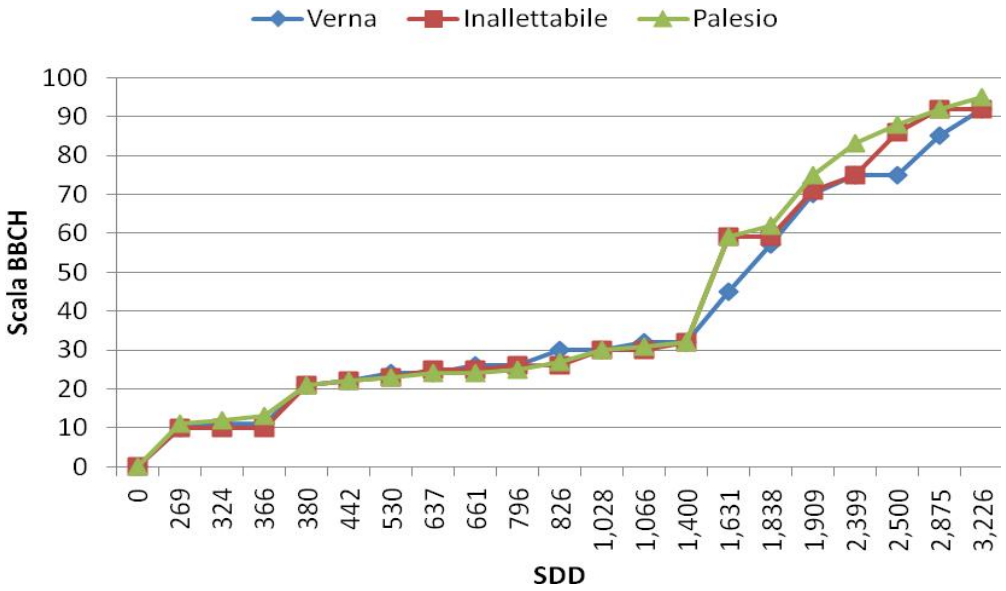


Figura 2. Fenologia dei tre genotipi di frumento oggetto di studio osservata durante le annate agrarie 2009/2010 (A) e 2010/2011 (B). Lo sviluppo fenologico è espresso mediante la scala BBCH in funzione della somma dei gradi giorno (SDD).

La fenologia del frumento è strettamente dipendente da fattori genetici derivanti dalle diverse necessità di vernalizzazione, risposta al fotoperiodo e precocità di ciascuna varietà. La conoscenza dello sviluppo fenologico di diverse varietà di frumento risulta essenziale per studiare l'adattamento dei genotipi a specifici ambienti e sistemi di coltivazione. Merita poi sottolineare che per le varietà di antica costituzione, non più registrate, risulta particolarmente difficile poter disporre di informazioni aggiornate. Durante i primi stadi fenologici (BBCH 10-30) non sono state osservate differenze significative tra le varietà, che hanno mostrato uno sviluppo pressoché simultaneo nel periodo di accestimento, in entrambe le annate. La cultivar moderna Palesio e le varietà antica Inallettabile hanno mostrato la maggiore precocità nel raggiungimento dello stadio di botticella (BBCH 45) e spigatura (BBCH 60), rispetto alla varietà Verna. La fase di fioritura (BBCH 69) è avvenuta all'incirca nello stesso periodo per tutti i genotipi ma sono state osservate differenze nella durata di tale periodo. In particolare, durante il secondo anno (2010/2011), le varietà antiche hanno mostrato un prolungamento della fase di fioritura della spiga mentre la varietà Palesio è risultata passare rapidamente agli stadi di maturazione successivi (BBCH 71-89). Tale evento è probabilmente riconducibile ad un aumento della velocità di maturazione della granella di Palesio durante il 2011 a causa delle condizioni ambientali più secche alla fine del ciclo colturale che hanno favorito la precocità della cultivar moderna. E' stato poi osservato che successivamente allo stadio di maturazione lattea (BBCH 73), la varietà antica Inallettabile ha mostrato uno sviluppo maggiormente allineato a quanto rilevato per Palesio, mentre Verna ha presentato un più lento riempimento delle cariossidi, fino al raggiungimento della maturità finale (BBCH 90).

4. RESA IN GRANELLA E QUALITA' COMMERCIALE

La raccolta è stata effettuata a maturazione piena (stadio fenologico 89 della scala BBCH) con umidità della cariosside ≤ 13% (seconda settimana di Luglio 2010 e 2011). Alla raccolta, per ciascuna tesi è stata determinata la resa (t/ha) e i parametri commerciali quali il peso ettolitrico (kg/hl) e il peso di mille semi. I risultati ottenuti sono riportati in **Tabella 3**.

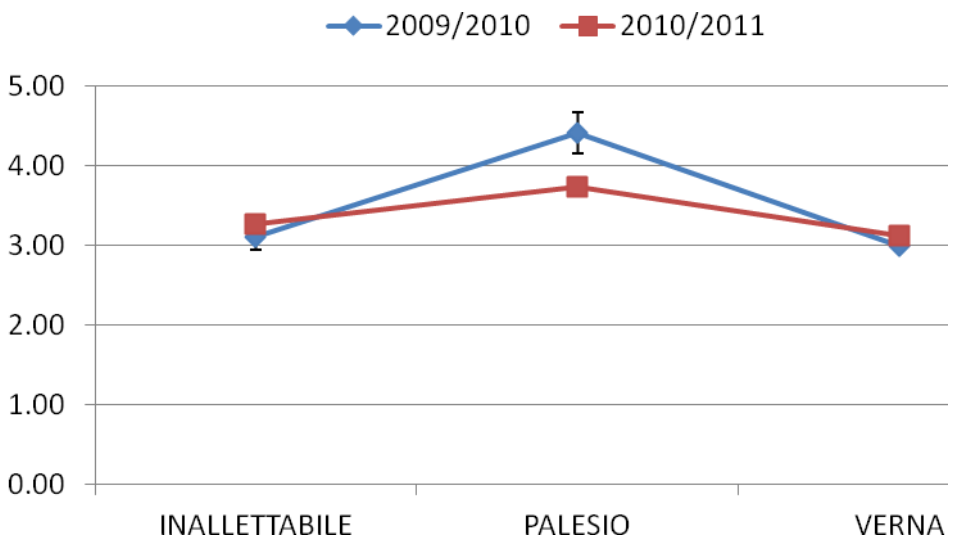
La varietà moderna Palesio ha fornito i valori di resa in granella più elevati, pari ad un valore medio di 4,1 t/ha. Le due accessioni di antica costituzione Inallettabile e Verna hanno fornito rese più basse, comprese tra 3,1 e 3,2 t/ha, i cui valori evidenziano però come il grande divario normalmente riscontrato in agricoltura convenzionale tra varietà antiche e moderne, viene fortemente ridotto quando tali varietà sono allevate in regimi a basso input.

Tabella 3. Resa in granella e qualità commerciale (peso ettolitrico, peso dei mille semi) delle varietà oggetto di studio.

		Resa (t/ha)	Peso ettolitrico (kg/ha)	Peso dei mille semi (g)
VARIETA	INALLETTABILE	3,2 (b)	77,2 (b)	43,0 (a)
	PALESIO	4,1 (a)	77,5 (a)	42,2 (a)
	VERNA	3,1 (b)	74,9 (c)	38,7 (b)
TRATTAMENTO	CONTROLLO	3,6 (a)	76,7 (a)	38,5 (b)
	500	3,5 (a)	76,7 (a)	40,8 (a)
	500 + 501	3,3 (b)	76,4 (a)	41,3 (a)
ANNO	2009/2010	3,5 (a)	77,8 (a)	41,1 (a)
	2010/2011	3,4 (a)	75,4 (b)	41,5 (a)
INTERAZIONI	V x T	***	***	***
	V x A	***	***	***
	T x A	***	***	***

Osservando l'interazione significativa tra varietà ed anno (V x A), riportata in **Figura 3A**, si può notare come la maggiore resa della cultivar moderna sia principalmente dovuta ad un vantaggio di tale genotipo nel corso della prima annata agraria, probabilmente legato a favorevoli condizioni ambientali, mentre nel secondo anno tutte le varietà coinvolte hanno mostrato simili valori di resa in granella.
Variazioni significative di resa sono state osservate anche in funzione del trattamento applicato. In particolare, considerando i valori medi ottenuti per ciascuna tesi sperimentale, si può notare che l'utilizzo dei preparati 500+501 ha indotto una lieve ma significativa diminuzione dei valori di resa in granella rispetto al controllo e alla tesi con trattamento 500 (da 3,5-3,6 a 3,3 t/ha) (**Tabella 3**). Tale risultato è fortemente influenzato dalla riduzione in resa della varietà moderna Palesio in seguito all'applicazione dei preparati biodinamici, come mostrato nel grafico relativo all'interazione Varietà x Trattamento (**Figura 3B**). Al contrario, le accessioni di antica costituzione hanno mostrato una maggiore stabilità, con valori di resa simili in tutte le tesi sperimentali.
La qualità commerciale del frumento include caratteristiche della cariosside come il peso ettolitrico e il peso dei mille semi, che forniscono importanti informazioni sulle performance in fase di molitura e sul potenziale di estrazione della farina dei campioni di granella. Sia il peso ettolitrico che il peso dei mille semi sono caratteristiche ereditarie determinate da fattori genetici; inoltre tali parametri possono essere ulteriormente influenzati dalle condizioni ambientali e dall'interazione genotipo x ambiente (Houshmand et al., 2004). Il peso ettolitrico esprime il grado di riempimento della cariosside. Valori troppo bassi di tale parametro possono causare un deprezzamento del prodotto o il rifiuto del materiale, poiché determina una bassa resa in farina. I risultati ottenuti per i campioni analizzati in tale studio hanno mostrato valori uguali o superiori al limite comunemente stabilito per la commercializzazione di frumento in Italia, cioè maggiori di 75 kg/hl (Cocchi et al., 2005), evidenziando dunque un adeguato sviluppo della cariosside. Il peso ettolitrico è risultato variare in funzione del genotipo, con valori compresi tra 74,9 (Verna) e 77,5 kg/hl (Palesio). Numerosi fattori possono determinare un decremento del peso ettolitrico, quali stress abiotici e biotici come avverse condizioni climatiche, danneggiamento da insetti, defogliazione, stress da caldo, allettamento o raccolta tardiva. Tutte le tesi sperimentali (controllo, 500, 500+501) hanno fornito cariossidi caratterizzate da un buon livello di riempimento, con valori medi di peso ettolitrico compresi nell'intervallo tra 76,4 e 76,7 kg/ha (**Tabella 3**). Sono state riscontrate differenze significative dei valori di peso ettolitrico in funzione dei fattori ambientali. Precedenti studi hanno evidenziato come l'elevata temperatura nelle fasi finali di maturazione possa influenzare negativamente la qualità commerciale, riducendo irreversibilmente il riempimento delle cariossidi e dunque i valori di peso ettolitrico (Gan et al., 2000; Rharrabti et al., 2003). In tale sperimentazione, le alte temperature e le scarse precipitazioni registrate nelle fasi finali del secondo anno potrebbero aver causato la diminuzione del peso specifico osservata tra le due annate (**Tabella 3**). Il peso ettolitrico della granella di frumento dipende dalle dimensioni, dalla forma e dallo sviluppo dell'endosperma della cariosside. In letteratura è stata riportata a lungo una associazione tra il peso ettolitrico e il peso della cariosside (Simmonds, 1989). Nel presente lavoro, tale correlazione tra peso ettolitrico e peso dei mille semi sembra essere rispettata in particolare per quanto riguarda le differenze osservate tra i genotipi. Infatti, la varietà antica Verna, che mostrava il peso ettolitrico più basso, è risultata caratterizzata anche dal minor valore del peso dei mille semi (38,7 g), mentre Inallettabile e Palesio hanno mostrato valori significativamente maggiori (rispettivamente pari a 43,0 e 42,2 g) (**Tabella 3**). E' stato inoltre osservato un miglioramento della qualità commerciale in seguito all'applicazione dei trattamenti biodinamici 500 e 500+501, le cui tesi sperimentali hanno mostrato valori medi rispettivamente pari a 40,8 e 41,3 g, significativamente superiori rispetto al controllo (38,5 g) (**Tabella 3**).

A)



B)

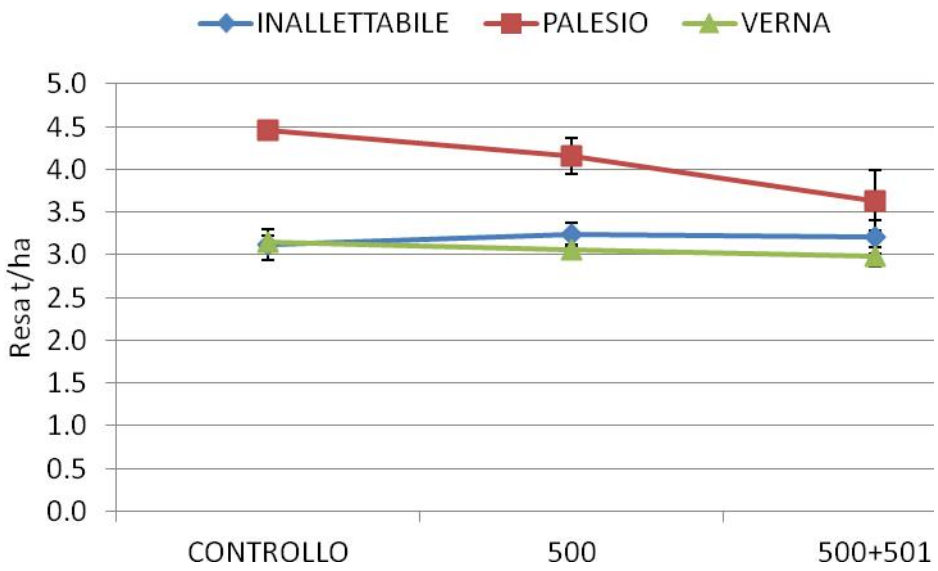


Figura 3. Interazione significativa osservata tra varietà ed anno di coltivazione (V x A) (A) e tra varietà e trattamento (V x T) (B) per la resa in granella

5. VALUTAZIONI FITOPATOLOGICHE E ANALISI DELLE MICOTOSSINE

5.1. Fusariosi

La fusariosi della spiga (FDS) è una delle più diffuse e dannose malattie del frumento a livello mondiale. L'incidenza e la gravità della FDS risultano variabili di anno in anno in funzione dell'andamento climatico, degli areali e delle varietà utilizzate, con conseguenti perdite di produzione unitamente a non trascurabili danni sulla granella di tipo qualitativo, quali la dimensione del chicco, il ridotto contenuto di proteine, la qualità della farina nella cottura e contaminazione da micotossine. La FDS è una malattia complessa causata da diverse specie di *Fusarium,* le più diffuse a livello mondiale risultano essere *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae* e *F. sporotrichioides*. Anche in Emilia Romagna *F. graminearum* e *F. culmorum* risultano le specie più diffuse con un incremento negli ultimi anni di *F. poae* (Pancaldi et al., 2010) considerato però un debole patogeno associato alla malattia.

Tabella 4. Presenza di Fusarium (espressa in percentuale di cariossidi infette) nella granella delle tre varietà oggetto di studio e identificazione delle specie fungine al microscopio ottico.

		2009/2010		2010/2011	
		Cariossidi infette (%)	Specie	Cariossidi infette (%)	Specie
Inallettabile	Controllo	0	-	2	Fp(2)
	500	0	-	6	Fp(4), Fv(1), Fg(1)
	500+501	0	-	3	Fp(3)
Palesio	Controllo	0	-	3	Fp(3)
	500	0	-	6	Fp(2), Fc(1), Fspp(3)
	500+501	2	Fg(2)	6	Fp(5), Fspp(1)
Verna	Controllo	0	-	4	Fp(2), Fspp(2)
	500	0	-	3	Fp(3)
	500+501	0	-	6	Fp(6)

Abbreviazioni: Fp, *Fusarium poae*; Fv,*Fusarium verticillioides*; Fg, *Fusarium graminearum*; Fc, *Fusarium culmorum*; Fspp*, Fusarium sporotrichioides*.

Nel primo anno (2009/2010) sulle cariossidi raccolte a fine prova è stata condotta un'analisi micologica su substrato agarizzato e sono stati isolati, in bassa percentuale, esclusivamente ceppi appartenenti a *F. graminearum,* mentre nel secondo anno (2010/2011) prevalentemente ceppi appartenenti a *F. poae* (**Tabella 4**)

5.2. Determinazione dei livelli di micotossine nella granella

La contaminazione delle farine da micotossine è un'importante problematica del settore biologico, nel quale l'applicazione di fungicidi non è ammessa. La tossina maggiormente comune nelle farine di frumento è il deossinivalenolo (DON o vomitossina) che appartiene alla classe dei tricoteceni ed è prodotto da numerosi funghi patogeni del genere *Fusarium* (soprattutto *F. culmrum* e *F. graminearum*) (Edwards, 2009). Le micotossine possono causare gravi problemi di sicurezza igienico-sanitaria nella produzione di cereali, poiché hanno effetti cronici sulla salute di uomo e animali, inibendo la sintesi delle proteine (Murphy et al., 2006).

Deossinivalenolo ([17])	
Cereali non trasformati ([18]) ([19]) diversi da grano duro, avena e granoturco	1 250
Grano duro e avena non trasformati ([18]) ([19])	1 750
Granoturco non trasformato ([18]), ad eccezione del granoturco non trasformato destinato alla molitura ad umido (*)	1 750 ([20])
Cereali destinati al consumo umano diretto, farina di cereali, crusca e germe come prodotto finito commercializzato per il consumo umano diretto, eccetto i prodotti alimentari di cui ai punti 2.4.7, 2.4.8 e 2.4.9	750
Pasta (secca) ([22])	750
Pane (compresi piccoli prodotti da forno), prodotti della pasticceria, biscotteria, merende a base di cereali e cereali da colazione	500
Alimenti a base di cereali trasformati e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini([3]) ([7])	200

Tabella 5. Tenori massimi di tricoteceni (DON) ammessi nei prodotti alimentari dal regolamento CE n. 1126/2007, espressi in ppb (µg/kg).

I livelli di DON sono regolamentati con un decreto della Commissione Europea (EC N. 1126/2007) che stabilisce i valori massimi ammessi per i cereali non trasformati e prodotti derivati (**Tabella 5**). L'accumulo di micotossine nella granella di frumento dipende dallo sviluppo del fungo, che a sua volta è strettamente correlato alle condizioni climatiche (Champeil et al., 2004). Inoltre, numerosi altri fattori possono contribuire all'accumulo di micotossine nella farina come la coltura utilizzata nell'annata precedente (che influenza la carica patogena del terreno) e la resistenza varietale alla fusariosi della spiga (Quaranta et al., 2010). La prima stagione di crescita (2009/2010) ha presentato caratteristiche climatiche particolarmente favorevoli per lo sviluppo di *Fusarium* durante il periodo di fioritura (Aprile-Maggio), con condizioni caldo-umide. Al contrario, nel corso della seconda annata agraria (2010/2011) le condizioni climatiche più secche della primavera hanno limitato l'insorgenza dell'infezione fungina.
Come riportato in **Tabella 6**, i campioni di granella ottenuti dal secondo anno hanno mostrato una qualità igienico-sanitaria ideale, con valori di DON molto bassi, inferiori a 0,06 ppm, al limite della capacità di rilevazione dello strumento. Un contenuto in micotossine lievemente maggiore è stato invece ottenuto per i campioni derivanti dal primo anno di coltivazione, con valori compresi tra 0 e 0,64 ppm. Tali livelli di micotossine sono comunque ampiamente al di sotto del limite massimo stabilito nel regolamento EU per cereali non processati (1,25 ppm) e per cereali destinati al consumo umano diretto (0,75 ppm) (**Tabella 5**). Si può inoltre osservare un effetto del trattamento con 500+501 che, nel primo anno, ha indotto una forte riduzione del tenore in micotossine nella granella delle varietà antiche Inallettabile e Verna, mentre nella varietà moderna è stato osservato un trend opposto (**Tabella 6**).

Tabella 6. Livelli di micotossine (DON) osservati nella granella delle varietà di frumento oggetto di studio

		DON (ppm)	
		2009/2010	2010/2011
Inallettabile	Controllo	0.26	0.06
	500	0.31	0.00
	500 + 501	0.00	0.05
Palesio	Controllo	0.00	0.00
	500	0.00	0.05
	500 + 501	0.64	0.05
Verna	Controllo	0.26	0.02
	500	0.00	0.05
	500 + 501	0.06	0.05

6. PROPRIETA' NUTRIZIONALI E NUTRACEUTICHE DELLE VARIETA' OGGETTO DI STUDIO ED EFFETTO DEI TRATTAMENTI BIODINAMICI

6.1. Determinazione del contenuto in proteine, glutine, amido e lipidi

Le varietà oggetto di studio sono state caratterizzate per il contenuto in proteine totali in accordo al metodo ufficiale AACC 46-12 (AACC, 1983) basato sulla metodica Kjeldahl utilizzando 6,25 come fattore di conversione. Il contenuto proteico rappresenta una delle maggiori problematiche nella produzione di frumento in biologico. Infatti l'accumulo di proteine nella cariosside di frumento è strettamente dipendente dalla disponibilità di azoto (N). Nei sistemi agronomici a basso input, la quantità di azoto disponibile nel terreno è legata ai processi di azotofissazione simbiotica e all'applicazione di concimi organici naturali come letame e composti biodinamici. In genere la mineralizzazione del letame e dei residui colturali fornisce elevati livelli di N all'inizio del ciclo colturale (quando l'assimilazione da parte della coltura è molto bassa) e limitate quantità negli stadi di crescita successivi quando la richiesta della coltura è maggiore (Wolfe et al., 2008). I fattori genetici influenzano fortemente l'efficienza d'accumulo dell'azoto, in particolare nel determinare lo sviluppo del sistema radicale e l'efficienza di traslocazione dell'azoto successivamente all'antesi (Laperche et al., 2006; Vaccari et al., 2007). Infatti, le tre varietà oggetto di studio hanno mostrato elevata variabilità nel contenuto proteico. L'accessione di antica costituzione Verna è risultata dal contenuto in proteine più elevato (14,2 g/100g) mentre la varietà moderna Palesio è risultata caratterizzata da livelli proteici marcatamente inferiori (11,6 g/100g), confermando la significativa determinazione genetica di tale fattore (**Tabella 7**). E' stato inoltre riscontrato un effetto del trattamento 500+501 che ha indotto un lieve ma significativo decremento dei livelli proteici della granella, rispetto al controllo e al trattamento con il preparato biodinamico 500 (**Tabella 7**). I risultati relativi alla determinazione quantitativa della frazione di glutine hanno confermato quanto osservato per il contenuto proteico totale. Le due varietà antiche Inallettabile e Verna hanno infatti mostrato un contenuto in glutine (rispettivamente 10,8 e 11,0 g/100g) significativamente maggiore rispetto a quanto riscontrato per la cultivar Palesio (7,1 g/100g) (**Tabella 7**).

Tabella 7. Contenuto in amido, proteine, glutine, lipidi e ceneri delle varietà di frumento oggetto di studio coltivate nelle annate agrarie 2009/2010 e 2010/2011.

		Amido (g/100g)	Proteine (g/100g)	Glutine (g/100g)	Lipidi (g/100g)	Ceneri (g/100g)
VARIETA	INALLETTABILE	64,1 (b)	13.4 (b)	10.8 (a)	4,2 (a)	2,1 (a)
	PALESIO	72,2 (a)	11.6 (c)	7.1 (b)	2,9 (b)	1,8 (b)
	VERNA	61,9 (c)	14.2 (a)	11.0 (a)	4,2 (a)	2,1 (a)
TRATTAMENTO	CONTROLLO	65,6 (a)	13.5 (a)	9.8 (a)	3,8 (a)	1,9 (a)
	500	65,7 (a)	13.3 (a)	9.6 (ab)	3,8 (a)	1,9 (a)
	500 + 501	66,9 (a)	12.4 (b)	9.5 (b)	3,8 (a)	2,0 (a)
ANNO	2009/2010	68,2 (a)	13.9 (a)	9.8 (a)	4,1 (a)	2,1 (a)
	2010/2011	63,9 (b)	12.3 (b)	9.5 (b)	3,4 (b)	1,9 (b)
INTERAZIONI	V x T	ns	ns	***	ns	ns
	V x A	***	*	***	ns	***
	T x A	ns	**	ns	ns	ns

L'amido rappresenta la maggiore fonte di carboidrati nella dieta e costituisce circa il 65-75% della cariosside di frumento, accumulato principalmente nell'endosperma (Dupont e Altenbach, 2003). L'amido è costituito da due polimeri, amilosio e amilopectina: il primo è caratterizzato da una struttura molecolare lineare, mentre il secondo presenta una struttura ramificata. Nell'endosperma della cariosside l'amido è accumulato in granuli classificati, sulla base del loro diametro, in A (>15 µm), B (5-15 µm) e C (<5 µm) (Wilson et al., 2006). Il rapporto tra amilosio e amilopectina è uno dei fattori che maggiormente determinano la digeribilità dell'amido, dovuta alla maggiore assimilabilità dell'amilopectina rispetto alle molecole di amilosio (Maningat et al., 2009). Entrambe le frazioni svolgono importanti ruoli funzionali poiché l'amido altamente digeribile (ricco in amilopectina) rappresenta la maggiore fonte di glucosio nella dieta fornendo energia prontamente disponibile, mentre l'amido lentamente assimilabile (ricco in amilosio) diminuisce la digeribilità dell'alimento ma riduce i livelli postprandiali di glucosio nel sangue e l'indice glicemico dell'alimento (Shewry et al., 2001). Nel frumento, il contenuto in amido è determinato sia da fattori ereditari che ambientali (Kindred et al., 2008).
I risultati relativi al contenuto in amido totale hanno evidenziato la relazione inversa esistente tra tale macronutriente e le proteine. Infatti, il maggior contenuto in amido (72.2 g/100g) è stato osservato per la varietà moderna Palesio caratterizzata dai livelli proteici più bassi. Inversamente, la varietà antica Verna è risultata caratterizzata da un contenuto in amido marcatamente inferiore (61.9 g/100g), mentre Inallettabile ha mostrato valori intermedi (64.1 g/100g) (**Tabella 7**). La cariosside di frumento contiene quantitativi molto bassi di lipidi, pari a circa il 2-4% del suo peso totale (Simmonds, 1989). I composti lipidici sono accumulati principalmente negli strati pericarpali e costituiscono circa il 15% del germe e il 6% della crusca (Pomeranz et al., 1966). Anche se i cereali hanno un modesto contenuto di lipidi, i prodotti a base di farina integrale rappresentano una buona fonte di vitamina E, che include sostanze lipidiche come tocoferoli e tocotrienoli (tocoli) (25% del contenuto lipidico totale) (Yu, 2008; Moore e Hao, 2012). Precedenti studi hanno dimostrato che i tocoferoli del frumento sono caratterizzati da una maggiore bioaccessibilità rispetto ad altre fonti di vitamina E, sottolineando l'importanza del consumo di farina integrale per il raggiungimento della razione minima giornaliera raccomandata (15 mg al giorno) (Reboul et al., 2006; Leenhardt et al., 2008). Nel frumento il contenuto in lipidi è principalmente una caratteristica varietale ed è debolmente influenzato dai fattori ambientali (Simmond, 1989). La presente ricerca ha evidenziato che le varietà antiche Inalettabile e Verna sono caratterizzate da un contenuto lipidico (4,2 g/100g) marcatamente superiore rispetto alla cultivar Palesio (2,9 g/100g) (**Tabella 7**). Tale dato risulta particolarmente interessante non solo da un punto di vista nutrizionale ma anche nutraceutico, poiché tra i lipidi del frumento sono compresi composti del complesso vitaminico del gruppo E, come tocoferoli e tocotrienoli, dotati di attività antiossidante (Lampi et al., 2008). Il trattamento non ha mostrato alcun effetto sull'accumulo di lipidi nelle cariossidi, mentre è stata osservata variabilità in funzione dell'annata agraria: le diverse condizioni climatiche verificatesi nel corso delle due stagioni di crescita hanno causato infatti un decremento del contenuto in lipidi, da 4,1 a 3,4 g/100g (**Tabella 7**).

6.2. Determinazione del contenuto in ceneri ed elementi minerali

Le ceneri sono costituite da materiale inorganico presente soprattutto negli strati più esterni della cariosside e sono correlate al tenore in minerali. Generalmente il contenuto in ceneri è utilizzato come parametro qualitativo per stimare la contaminazione delle farine bianche con la crusca ed è considerato dannoso per le proprietà tecnologiche poiché la crusca e alcune delle sue componenti possono influenzare negativamente la qualità degli impasti. Tuttavia, gli elementi minerali sono coinvolti in numerosi processi biologici e dunque rappresentano una importante componente della dieta umana. I minerali sono generalmente classificati come macro- (i.e. Ca, K, Mg, Na, P,) e

micro- (i.e. Fe, Cu, Co, Zn, Mn, Mo, Cr, Se) elementi, sulla base dell'apporto giornaliero raccomandato (rispettivamente più e meno di 100 mg/giorno). I cereali integrali sono una importante fonte alimentare di micronutrienti e contribuiscono significativamente al raggiungimento degli apporti giornalieri raccomandati (Fan et al., 2008). Il contenuto in ceneri può essere influenzato sia da fattori ereditari che ambientali. In particolare, la concentrazione di minerali nella granella è fortemente correlata allo stato minerale del suolo e all'efficienza di assimilazione e traslocazione delle varietà di frumento (Fan et al., 2008). Nel presente lavoro, il contenuto in ceneri, determinato in accordo al metodo ufficiale AACC 08-01 (AACC, 1983), non è risultato variare in funzione del trattamento applicato mentre un lieve decremento è stato riscontrato durante il secondo anno (**Tabella 7**). Osservando l'interazione significativa tra varietà ed anno si nota che la riduzione del contenuto in ceneri è legata sostanzialmente al minor accumulo di elementi minerali nelle cariossidi della varietà Verna durante il secondo anno, mentre le varietà Inallettabile e Palesio hanno mostrato valori stabili in entrambe le annate (**Figura 4**). Differenze significative sono state osservate tra i genotipi oggetto di studio, con le varietà antiche Inallettabile e Verna caratterizzate dal contenuto in ceneri più elevato (2,1 g/100g), mentre la cultivar moderna Palesio ha mostrato il quantitativo più basso (1,8 g/100g) (**Tabella 7**). Tali dati sembrano confermare quanto evidenziato in alcuni studi presenti in letteratura che indicano una progressiva diminuzione del contenuto in minerali verificatosi negli ultimi 160 anni nelle varietà di frumento (Fan et al., 2008; Ficco et al., 2009; Zhao et al., 2009; Rodriguez et al., 2011). Ad esempio, Fan et al. (2008) hanno evidenziato un decremento del contenuto in zinco, rame, ferro e magnesio con l'introduzione, nel 1960, di cultivar altamente produttive a taglia semi-nana. La minore capacità di accumulo di elementi minerali nelle cariossidi di frumento a taglia nana è probabilmente legata ad un minore sviluppo dell'apparato radicale (proporzionale alla parte epigea della pianta). D'altro canto, le varietà antiche che presentano valori di altezza della pianta compresi tra 100 e 150 cm, possiedono un sistema radicale maggiormente sviluppato che consente di esplorare una maggiore porzione di terreno e dunque un più elevato assorbimento di micronutrienti. Ulteriori interessanti considerazioni sulla variabilità dei genotipi oggetto di studio sono state fornite dall'analisi della composizione in elementi minerali delle farine oggetto di studio, mediante l'utilizzo di uno spettrometro a emissione ottica al plasma accoppiato induttivamente (ICP-OES IRIS Intrepid II XSP Radial, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (**Tabella 8**).

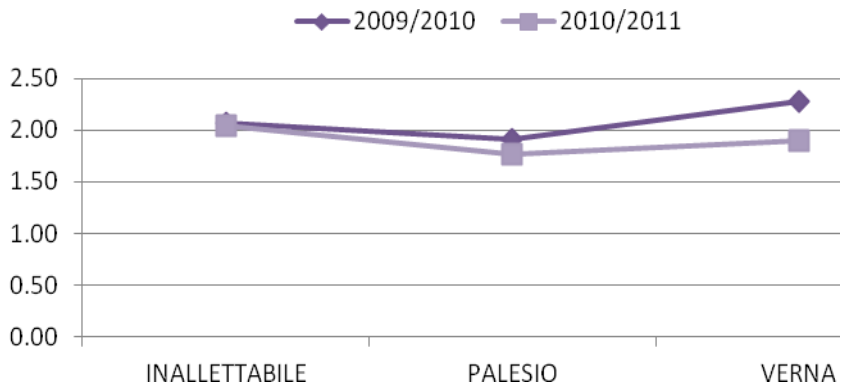


Figura 4. Interazione significativa osservata tra varietà e anno di coltivazione (V x A) per il contenuto in ceneri

Tabella 8. Elementi minerali identificati nelle farine delle varietà oggetto di studio, espressi in mg/kg.

	Varietà			Trattamento		
	INALLETTABILE	PALESIO	VERNA	CONTROLLO	500	500+501
Al	0,91	4,60	8,66	4,26	8,20	1,70
Ba	0,73	1,60	0,84	1,24	0,73	1,20
Ca	109,80	166,14	92,64	114,40	129,47	124,70
Cd	0,00(b)	0,02(ab)	0,03(a)	0,01	0,02	0,02
Co	0,17	0,14	0,24	0,32	0,00	0,23
Cr	0,47	1,25	1,16	1,27	0,64	0,99
Cu	4,24	4,54	4,71	4,16	4,77	4,56
Fe	26,46	35,39	35,96	32,59	33,99	31,23
K	2843,33(b)	3806,33(a)	4258,67(a)	3764,00	3632,67	3511,67
Li	0,37	0,79	1,06	0,89	0,58	0,74
Mg	610,70	1000,67	749,87	771,83	805,97	783,43
Mn	19,05	28,71	18,43	20,70	22,94	22,56
Mo	1,02	1,21	1,50	1,15	1,47	1,11
Na	47,53	30,79	34,47	39,33	37,34	36,13
Ni	0,03(b)	0,35(a)	0,15(ab)	0,10	0,20	0,23
P	3369,67(ab)	3009,67(b)	3682,00(a)	3231,33	3492,00	3338,00
Pb	0,46	0,00	0,00	0,00	0,22	0,24
Se	1,53	0,46	1,63	0,61	2,01	0,99
Sr	0,64	1,32	0,64	0,91	0,82	0,88
Zn	29,27	24,03	30,76	26,53	29,45	28,08
TOT	7066,36(b)	8118,01(ab)	8923,41(a)	8015,63	8203,48	7888,66

Tale analisi ha confermato la variabilità già osservata per il contenuto in ceneri esistente tra i genotipi oggetto di indagine, mentre non è stato riscontrato nessun effetto significativo dei trattamenti biodinamici (500, 500+501) sull'accumulo di elementi minerali nella granella rispetto al controllo. Considerando il contenuto totale in micronutrienti, si può osservare che la varietà antica Verna è risultata caratterizzata da un tenore in elementi minerali (8923,41 mg/kg) significativamente superiore rispetto a quanto ottenuto per Inallettabile (7066,36 mg/kg), mentre la varietà moderna Palesio ha mostrato valori intermedi (8118,01 mg/kg) (**Tabella 8**). I minerali presenti in maggiori quantità sono risultati i macroelementi fosforo (P), potassio (K), magnesio (Mg) e calcio (Ca), mentre i restanti 16 elementi rilevati erano presenti in quantità inferiore ai 50 mg/kg (**Tabella 8**). Potassio e Fosforo sono i minerali più abbondanti e corrispondono rispettivamente al 45% e 41% del contenuto totale. Il contenuto in P è risultato variare significativamente tra le varietà oggetto di studio, compreso tra 3009,67 mg/kg (Palesio) e 3682,00 mg/kg (Verna). Da un punto di vista nutrizionale, P è utilizzato principalmente come componente delle ossa (85% del fosforo totale presente nel corpo umano), ed inoltre svolge un importante funzione strutturale nelle membrane cellulari (fosfolipidi). I cereali sono una importante fonte di fosforo nella dieta ed è stato stimato che il consumo di circa 100 g di farina integrale di frumento corrisponda a circa il 33% della razione giornaliera raccomandata (Food and Nutrition Board, 1997). Elevata variabilità è stata osservata tra le varietà anche per il contenuto in potassio (K), compreso tra 2843,33 mg/kg (Inallettabile) e 4258,67 mg(kg (Verna). Nonostante K sia uno dei più abbondanti minerali della cariosside di frumento, si stima che 100 g di farina integrale contribuiscano solo per il 9% al raggiungimento della dose raccomandata (Food and Nutrition Board, 2004). L'importanza nutrizionale del potassio è data dalla sua presenza come catione negli spazi intracellulari, richiesta per il normale funzionamento cellulare. L'elevata concentrazione intracellulare di K è mantenuta dall'attività della pompa Na^+/K^+-ATPasi. Pertanto, il bilancio tra K e

sodio (Na) dovrebbe essere controllato, evitando il superamento dei massimi livelli raccomandati di Na (oltre 6,9 g/giorno) che causerebbero perdite di potassio. Nei campioni oggetto di studio, il rapporto Na/K è risultato molto basso (0.010), evidenziando una caratteristica interessante nella prevenzione e nel trattamento dell'ipertensione e delle patologie cardiovascolari (Rodriguez et al., 2011). Il contenuto in magnesio (Mg), compreso tra 610,70 e 1000,67 mg/kg, non ha mostrato differenze significative tra le varietà oggetto di studio (**Tabella 8**). Circa la metà del magnesio presente nel corpo umano è accumulato nelle ossa. Inoltre, esso è presente anche nei fluidi extracellulari dove svolge numerosi importanti ruoli fisiologici come cofattore nei sistemi enzimatici, come parte del complesso Mg-ATP o direttamente come attivatore enzimatico (Food and Nutrition Board, 1997). Il consumo di 100 g di farina integrale può assicurare circa il 27% della dose giornaliera raccomandata (Food and Nutrition Board, 1997). Anche per quanto riguarda il calcio (Ca) non sono state osservate differenze significative tra le varietà, con livelli di Ca compresi tra 92,64 e 166,14 (mg/kg). Anche se il contributo di 100 g di farina integrale al raggiungimento dell'apporto giornaliero raccomandato è limitato (circa 3,5%) (Food and Nutrition Board, 1997), la presenza di tale minerale è di particolare interesse nutrizionale in quanto componente essenziale di denti e ossa (oltre 99% del calcio totale presente nel corpo). Tra i 16 microelementi rilevati, zinco (Zn), ferro (Fe) e manganese (mn) erano presenti in concentrazioni più elevate (oltre 20 mg/kg), i cui livelli non sono risultati variare in funzione del genotipo. I resta tanti microelementi erano invece presenti in tracce (concentrazioni minori di 5 mg/kg) ed è stata osservata scarsa variabilità tra i genotipi. I risultati ottenuti per il contenuto in microelementi sono in generale accordo con quanto precedentemente riportato per numerose varietà di frumento allevate in agricoltura convenzionale, a basso input e biologica (Fan et al., 2008; Hussain et al., 2010; Rodriguez et al., 2011).

6.3. Determinazione del contenuto in fibra alimentare

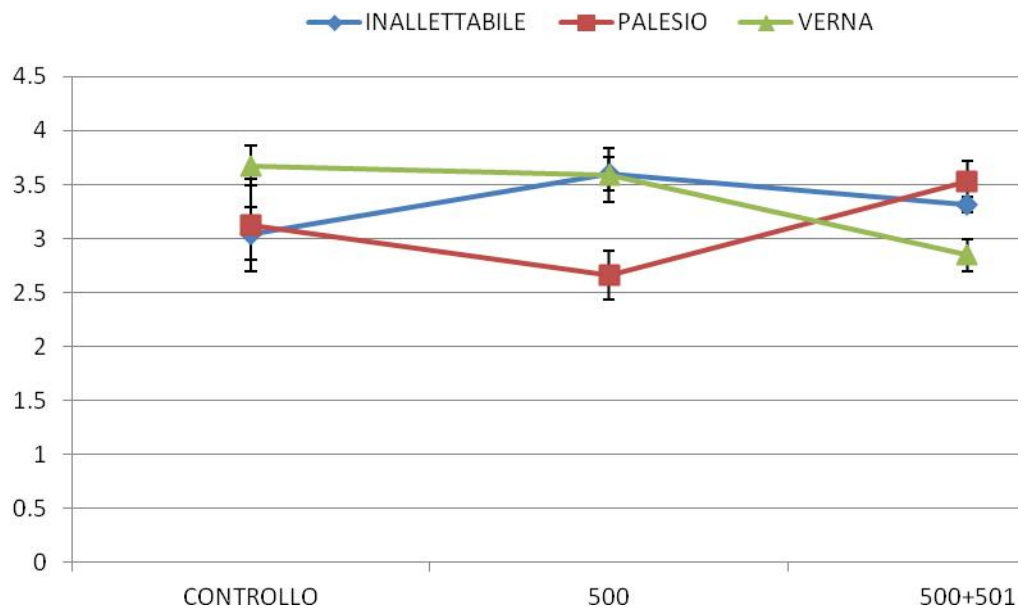
La determinazione del contenuto in fibra alimentare è stata condotta mediante l'estrazione delle frazioni solubili e insolubili, utilizzando il kit enzimatico della Megazyme (Megazyme International Ireland Ltd, Wicklow, Ireland) basato sulla procedura di Prosky et al. (1988). Gli effetti benefici derivanti dal consumo di prodotti a base di farina integrale sono stati ampiamente dimostrati in letteratura e includono un minor rischio di insorgenza di diabete tipo 2, tumori gastrointestinali e patologie cardiovascolari (Slavin, 2004; Anderson et al., 2009). Tali proprietà benefiche sono principalmente legate all'elevato contenuto in fibra della crusca di frumento, che contribuisce significativamente al raggiungimento della razione giornaliera raccomandata (30-35 g/giorno) (Harris e Smith, 2006). Recentemente si è osservato un crescente interesse dei consumatori riguardo la relazione esistente tra alimenti e salute e, conseguentemente, un aumento del consumo di prodotti a base di farina integrale come importante fonte di fibre nella dieta. Infatti la fibra alimentare è il principale fitochimico presente nella granella di frumento e può essere distinta in due categorie sulla base della solubilità in acqua. La fibra insolubile (IDF) costituisce la frazione principale e comprende polisaccaridi strutturali come lignina, cellulose e emicellulose (arabinoxilani insolubili) (Sidhu et al., 2007). L'IDF, rimanendo largamente non digerita, esercita effetti benefici diretti prevenendo costipazione e tumori (Alabaster et al., 1996; Charalampopoulos et al., 2002; Scheppach et al., 2004). La frazione solubile (SDF) invece include polisaccaridi non amilacei , β-glucani e pentosani (arabinoxilani solubili). Le proprietà benefiche di tale frazione sono attribuite alla modulazione dei livelli di glucosio e insulina nel sangue ed inoltre esercita una elevata attività prebiotica (Macfarlane et al., 2006; Roberfroid et al., 2010; Marotti et al., 2012). La fibra alimentare può agire come un induttore del senso di sazietà, prolungando la secrezione di ormoni regolatori dell'appetito nell'intestino, ed inoltre la viscosità della frazione solubile ritarda lo svuotamento gastrico e limita l'assorbimento di nutrienti riducendo la glicemia postprandiale

(Chaudri et al., 2008; Kristensen et al., 2010). Pochi studi hanno specificatamente indagato la variabilità esistente tra le varietà di frumento per il contenuto e la composizione in fibra alimentare, e attualmente scarse sono le informazioni in letteratura per quanto riguarda gli effetti dei fattori ambientali sull'accumulo di fibra nella cariosside (Gebruers et al., 2008; Shewry et al., 2010). Nel presente lavoro, i trattamenti biodinamici utilizzati (500 e 500+501) non hanno indotto variazioni nell'accumulo di fibra alimentare insolubile rispetto al controllo, mentre differenze significative sono state osservate in funzione del genotipo e dell'anno di coltivazione (**Tabella 9**). L'effetto delle diverse condizioni climatiche registrate nel corso delle due annate agrarie ha indotto un lieve decremento del contenuto in fibra insolubile, passando da un valore medio pari a 16,8 g/100g osservato nel 2009/2010 a 16,0 g/100g nel 2010/2011. La bassa entità di tale variazione conferma quanto già precedentemente indicando in letteratura riguardo l'elevata influenza dei fattori genetici varietali piuttosto che ambientali sul contenuto in fibra, avvalorato anche dalla mancanza di interazioni significative tra varietà, trattamento ed anno. Per quanto riguarda il contenuto in fibra solubile i valori medi ottenuti per ciascuna varietà, così come quelli relativi al trattamento e all'annata agraria, sono risultati piuttosto omogenei e non hanno mostrato differenze significative (**Tabella 9**). Tuttavia, sono state osservate per tale parametro interazioni significative tra varietà e trattamento e varietà ed anno. L'interazione Varietà x Trattamento (**Figura 5A**) ha evidenziato che i genotipi di frumento hanno risposto al trattamento applicato in modo differente. In particolare, il trattamento con 500 ha indotto un aumento del contenuto in fibra solubile nella varietà Inallettabile e un lieve decremento nella cultivar Palesio rispetto al controllo non trattato. L'applicazione del trattamento 501, in aggiunta al 500, ha portato a una diminuzione del contenuto in SDF per la varietà Verna e, all'opposto, un aumento di tale parametro nella granella di Palesio. Le tre varietà oggetto di studio hanno mostrato una diversa reazione metabolica non solo in risposta al trattamento applicato ma anche alle diverse condizioni climatiche di crescita, come mostrato dall'interazione Varietà x Anno (**Figura 5B**). Considerando i valori ottenuti per ciascun genotipo nei due anni, si nota che la varietà Inallettabile ha subito un lieve decremento del contenuto in SDF nel corso del secondo anno, mentre Palesio e Verna hanno mostrato un trend opposto dato da un maggior accumulo di componenti solubili della fibra. Tali risultati sembrano suggerire che il contenuto in fibra alimentare del frumento sia principalmente un carattere ereditario (dipendente quindi dal background genetico della varietà), specie per quanto riguarda le componenti insolubili che ne costituiscono la frazione più abbondante, mentre l'accumulo di fibra solubile risente maggiormente dei fattori esterni quali l'agrotecnica adottata (trattamento con preparati biodinamici) e le condizioni climatiche.

Tabella 9. Contenuto in fibre insolubili (IDF), fibre solubili (SDF), fibre totali (TDF) e amido resistente delle varietà di frumento oggetto di studio coltivate nelle annate agrarie 2009/2010 e 2010/2011.

		IDF (g/100g)	SDF (g/100g)	TDF (g/100g)	Amido Resistente (g/100g)
VARIETA	INALLETTABILE	16,3 (b)	3,3 (a)	19,6 (b)	0,76 (b)
	PALESIO	15,4 (c)	3,1 (a)	18,5 (c)	1,04 (a)
	VERNA	17,4 (a)	3,4 (a)	20,8 (a)	0,57 (c)
TRATTAMENTO	CONTROLLO	16,4 (a)	3,3 (a)	19,7 (a)	0,75 (b)
	500	16,4 (a)	3,3 (a)	19,7 (a)	0,78 (b)
	500 + 501	16,3 (a)	3,2 (a)	19,5 (a)	0,85 (a)
ANNO	2009/2010	16,8 (a)	3,3 (a)	20,0 (a)	0,84 (a)
	2010/2011	16,0 (b)	3,2 (a)	19,3 (b)	0,75 (b)
INTERAZIONI	V x T	ns	***	ns	***
	V x A	ns	*	ns	***
	T x A	ns	ns	ns	***

A)



B)

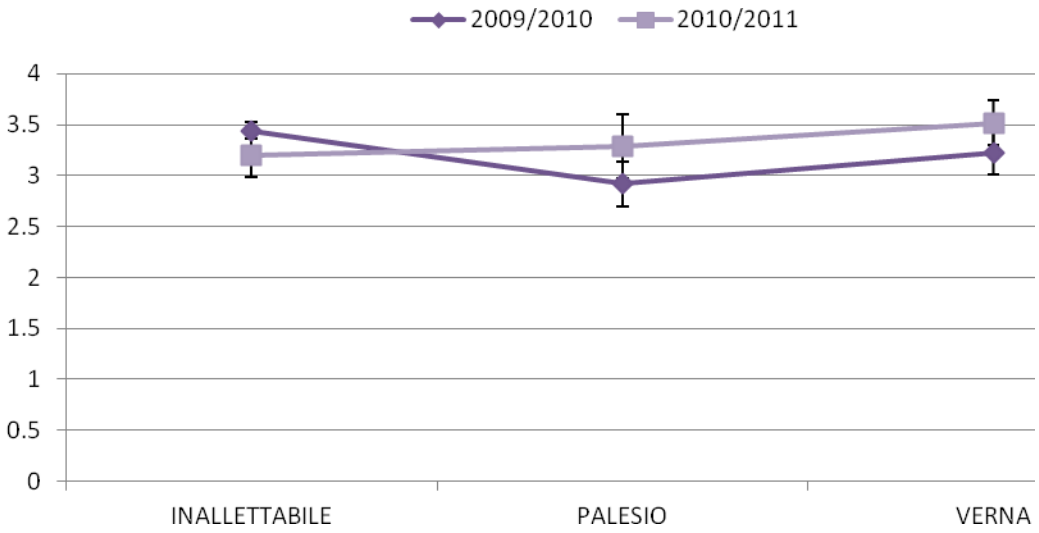
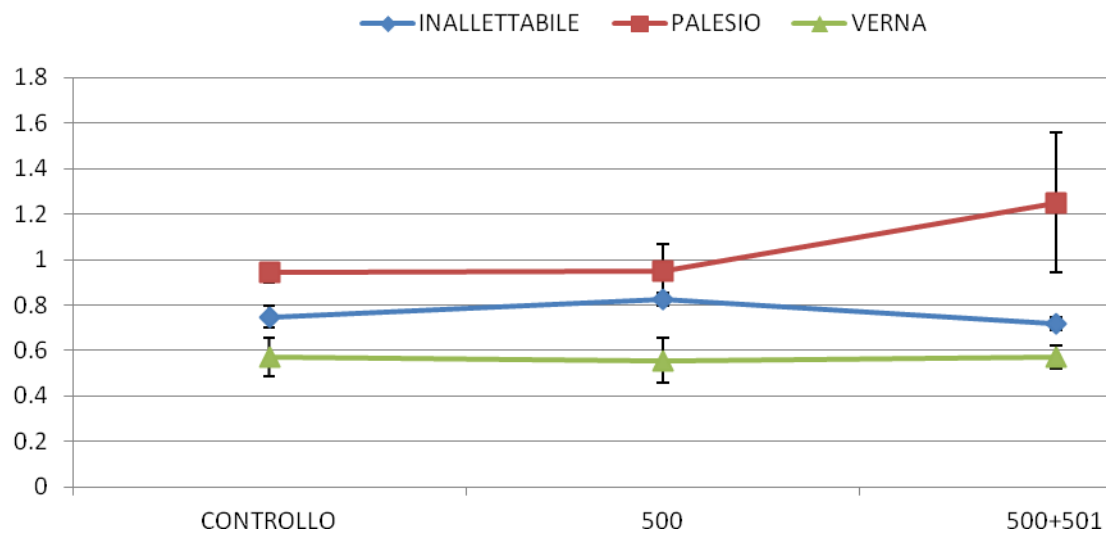


Figura 5. Interazione significativa osservata tra varietà e trattamento (V x T) (A) e tra varietà e anno di coltivazione (V x A) (B) per il contenuto in fibra solubile.

6.4. Determinazione del contenuto in amido resistente

L'amido resistente è la frazione di amido che sfugge alla digestione enzimatica nell'intestino e dunque raggiunge il colon dove è digerito dalla flora microbica (Lehman and Robin, 2007). L'amido resistente è considerato come una componente della fibra alimentare poiché fisiologicamente simile alla fibra solubile fermentabile. Gli effetti benefici dell'amido resistente includono effetti positivi sul colon dovuti al nutrimento della mucosa attraverso la fermentazione microbica e l'elevata produzione di acidi grassi a catena corta (ad es. butirrato). Inoltre, l'amido resistente induce un abbassamento del pH e delle concentrazioni di ammonio nel colon e un incremento della massa fecale che porta ad una diluzione di possibili sostanze cancerogene (come ad esempio gli acidi biliari) (Muir et al., 2004). Tali benefici sono stati correlati ad una minore incidenza di cancro al colon e di patologie infiammatorie dell'intestino (Jenkins e Kendall, 2000). La cariosside di frumento può presentare livelli variabili di amido resistente, in relazione alla dimensione e alla composizione dei granuli di amido. Il contenuto in amido resistente è una caratteristica principalmente varietale che, però, può essere fortemente influenzata da fattori ambientali e da processi di trasformazione (es. cottura ad elevate temperature) che possono indurre modificazioni nell'organizzazione strutturale delle molecole di amido. Nel presente studio, è stata osservata ampia variabilità nel contenuto in amido resistente tra le tre varietà analizzate. In particolare, i livelli più elevati di amido resistente sono stati ottenuti per la varietà moderna Palesio (pari a 1,04 g/100g) e quelli più bassi per la varietà Verna (0,57 g/100g), mentre Inallettabile ha mostrato valori intermedi (**Tabella 9**). Similmente a quanto osservato per il contenuto in amido totale, una lieve diminuzione della frazione di amido resistente da 0,84 a 0,75 g/100g è stata osservata nel corso della seconda stagione di crescita (2010/2011). Il trattamento con il preparato biodinamico 500 non ha causato differenze significative nell'accumulo di amido resistente rispetto al controllo, mentre un lieve aumento è stato osservato associando il 500 con il preparato 501. L'effetto del trattamento 500+501 può essere meglio spiegato osservando l'interazione significativa tra varietà e trattamento (V x T) mostrata in **Figura 6A**, che chiaramente evidenzia come le varietà di antica costituzione Inallettabile e Verna abbiano mostrato un contenuto in amido resistente pressoché invariato nelle tre tesi sperimentali, mentre la varietà Palesio ha risposto al trattamento 500+501 con un significativo incremento di tale frazione. Le tre varietà oggetto di studio hanno mostrato una marcata variabilità anche nella risposta ai fattori ambientali, come mostrato dall'interazione significativa tra varietà ed anno (V x A) (**Figura 6B**). Infatti, nel corso della prima annata agraria (2009/2010), le condizioni ambentali non hanno indotto particolari variazioni nell'accumulo di amido resistente e le tre varietà hanno mostrato valori medi circa uguali. Al contrario, i fattori climatici della seconda stagione di crescita (2010/2011) hanno causato un significativo incremento dei livelli di amido resistente per la varietà Palesio ed un opposto decremento per la varietà Verna.

A)



B)

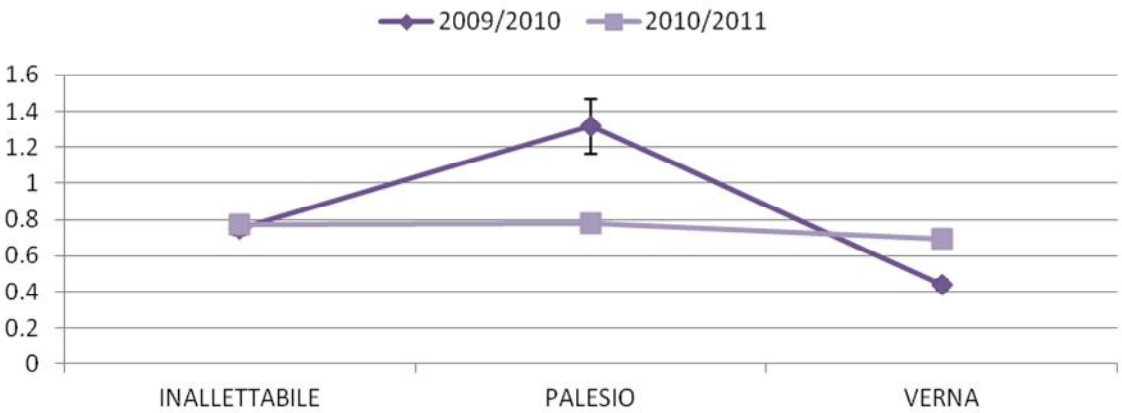


Figura 6. Interazione significativa osservata tra varietà e trattamento (V x T) (A) e tra varietà e anno di coltivazione (V x A) (B) per il contenuto in amido resistente.

6.5. Determinazione del contenuto in polifenoli e flavonoidi

Polifenoli e flavonoidi costituiscono la più rappresentativa classe di antiossidanti in frumento ed esercitano elevata attività antiossidante agendo come *radical scavenger*. Studi epidemiologici in letteratura hanno dimostrato il loro ruolo nella prevenzione di tumori e in numerose patologie cardiovascolari (Carter et al., 2006; Fardet et al., 2010). Nella cariosside di frumento, i composti fenolici sono accumulati principalmente negli strati più esterni della cariosside e possono esistere in forma solubile (liberi) o insolubile (legati). Spiccate proprietà benefiche sono state dimostrate per entrambe le frazioni fenoliche, in particolare per la loro azione antiradicalica. Inoltre, i composti fenolici insolubili, legati alle componenti della parete cellulare (es. arabinoxilani), possono resistere al processo di digestione e raggiungere il colon, dove sono parzialmente degradati dalla microflora intestinale. La frazione fenolica così liberata può esercitare direttamente i suoi benefici effetti, riducendo l'incidenza di cancro al colon, poiché essendo assorbiti dalle cellule endoteliali possono esercitare in loco una potente azione protettiva (antiossidante) (Kroon et al., 1997). Durante lo sviluppo della cariosside, l'accumulo di composti fenolici può variare in funzione del genotipo e dell'ambiente. Precedenti studi hanno evidenziato un'elevata variabilità nel contenuto in polifenoli sia tra diverse varietà di frumento che tra diversi ambienti di coltivazione, specialmente in relazione alle condizioni ambientali e alle pratiche colturali adottate. Generalmente, si ritiene che il frumento prodotto in agricoltura biologica possa

presentare un contenuto in composti fenolici maggiore rispetto alle varietà allevate in regime convenzionale, in seguito a un cambiamento del metabolismo della pianta verso la sintesi di composti contenenti carbonio (inclusi metaboliti secondari non azotati come polifenoli e flavonoidi). In accordo all'ipotesi del bilancio carbonio/azoto, la bassa disponibilità di azoto tipica dei sistemi biologici indurrebbe l'attivazione della via metabolica dei fenilpropanoidi, promuovendo la biosintesi di fenoli piuttosto che di proteine e di altri composti contenenti azoto (Kovacik et al., 2007). Tuttavia, i risultati disponibili in letteratura sono altamente contrastanti. Ad esempio, Zuchowski *et al.* (2011) ha rilevato un maggior contenuto in acidi fenolici in frumento allevato in conduzione biologica rispetto ad una sua coltivazione convenzionale. Tali dati sono in aperto contrasto con un precedente studio, in cui non sono state osservate differenze significative, relativamente al contenuto in acidi fenolici, per varietà di frumento allevate per tre anni in entrambi i sistemi agronomici (convenzionale/biologico) (Stracke et al., 2009). Occorre sottolineare che in tale studio le relazioni osservate tra i due sistemi agronomici erano fortemente influenzate sia dalle differenze varietali sia dalle diverse condizioni climatiche delle tre annate agrarie: tale evidenza suggerisce che le variazioni ambientali possono avere un impatto sull'accumulo di polifenoli maggiore rispetto al metodo di produzione. I campioni analizzati nel presente progetto di ricerca hanno mostrato una significativa variabilità per il contenuto in polifenoli e flavonoidi, sia in funzione del genotipo che del trattamento e dell'annata agraria (**Tabelle 10, 11**). I principali fattori che hanno contribuito alla variabilità del contenuto in composti antiossidanti sono da ascrivere alle condizioni climatiche delle due annate agrarie, che hanno indotto una probabile maggiore attività del metabolismo secondario della via dei fenilpropanoidi da cui derivano i composti fenolici durante la prima stagione di crescita, come evidenziato dai più elevati livelli di polifenoli e flavonoidi. La variabilità osservata può essere correlata alle condizioni climatiche fortemente divergenti per i due cicli colturali. Secondo quanto indicato in letteratura, le condizioni di crescita, come ad esempio la radiazione solare e il numero di ore con temperatura superiore ai 32°C durante le fasi di riempimento delle cariossidi, possono essere associate ad un incremento della formazione di radicali liberi; conseguentemente, l'aumento dello stress ossidativo promuove nella pianta la biosintesi di composti antiossidanti come autodifesa allo stress ambientale (Yu et al., 2003). In aggiunta, la sintesi dei composti fenolici nelle piante può essere indotta da stress di tipo biotico e dunque la variabilità osservata tra le due annate potrebbe essere correlata anche alla presenza di patologie a differenti livelli di severità (Dixon e Paiva, 1995). I trattamenti applicati (500, 500+501) non hanno invece esercitato un effetto rilevante sul contenuto in polifenoli e flavonoidi, eccetto per un lieve e statisticamente significativo incremento delle frazioni libere e legate dei polifenoli in seguito al trattamento con 500+501 (**Tabelle 10, 11**). Come menzionato in precedenza, il contenuto in polifenoli delle cariossidi di frumento è anche determinato da caratteristiche varietali, secondo quanto riportato in numerosi studi riguardanti genotipi di antica e moderna costituzione (Adom et al., 2005; Moore et al., 2005; Okarter et al., 2010; Heimler et al., 2010; Zuchowski et al., 2011; Di Silvestro et al., 2012). I campioni di granella analizzati nel presente lavoro hanno mostrato elevata variabilità nel contenuto in composti fenolici per tutte le frazioni. La varietà antica Verna, caratterizzata da granella rossa, ha mostrato il maggior contenuto in polifenoli e flavonoidi, sia nella frazione libera che legata (**Tabelle 10, 11**). Tale risultato era atteso poiché molti composti fenolici sono pigmenti che conferiscono colore ai tessuti vegetali (Liu et al., 2010). La cultivar moderna Palesio è caratterizzata anch'essa da granella di colore rosso, tuttavia tale genotipo è risultato caratterizzato da bassi livelli di composti fenolici, al pari (per quanto riguarda i flavonoidi) o al di sotto (per il contenuto in polifenoli) di quanto osservato per la varietà antica a granella chiara Inallettabile.

Tabella 10. Contenuto in polifenoli liberi, legati, totali e percentuale di polifenoli legati sul contenuto totale delle varietà di frumento oggetto di studio coltivate nelle annate agrarie 2009/2010 e 2010/2011.

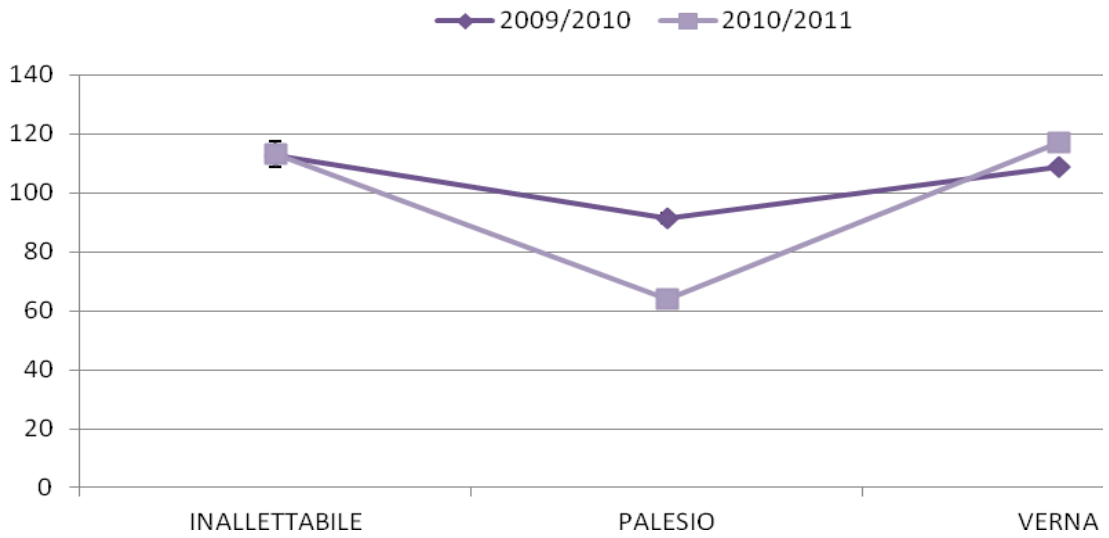
		Polifenoli liberi (mg/100g)	Polifenoli legati (mg/100g)	Polifenoli totali (mg/100g)	% Polifenoli legati
VARIETA	INALLETTABILE	113,0 (a)	113,5 (b)	226,4 (b)	50,0 (c)
	PALESIO	77,8 (b)	109,0 (c)	186,8 (c)	58,7 (a)
	VERNA	113,0 (a)	141,5 (a)	254,4 (a)	55,6 (b)
TRATTAMENTO	CONTROLLO	100,8 (ab)	121,0 (ab)	221,8 (b)	55,0 (a)
	500	99,3 (b)	118,7 (b)	217,9 (b)	54,6 (a)
	500 + 501	103,6 (a)	124,3 (a)	227,9 (a)	54,7 (a)
ANNO	2009/2010	104,4 (a)	129,3 (a)	233.7 (a)	55,3 (a)
	2010/2011	98,1 (b)	113,3 (b)	211,4 (b)	54,2 (b)
INTERAZIONI	V x T	ns	***	*	***
	V x A	***	***	***	***
	T x A	**	ns	***	ns

Tabella 11. Contenuto in flavonoidi liberi, legati, totali e percentuale di flavonoidi legati sul contenuto totale delle varietà di frumento oggetto di studio coltivate nelle annate agrarie 2009/2010 e 2010/2011.

		Flavonoidi liberi (mg/100g)	Flavonoidi legati (mg/100g)	Flavonoidi totali (mg/100g)	% Flavonoidi legati
VARIETA	INALLETTABILE	32,5 (b)	14,2 (b)	46,7 (b)	30,1 (a)
	PALESIO	33,7 (b)	13,1 (c)	46,7 (b)	29,0 (a)
	VERNA	42,4 (a)	15,1 (a)	57,5 (a)	26,3 (b)
TRATTAMENTO	CONTROLLO	36,9 (a)	13,9 (a)	50,8 (a)	28,0 (b)
	500	36,7 (a)	14,0 (a)	50,8 (a)	28,0 (b)
	500 + 501	34,9 (b)	14,5 (a)	49,5 (a)	30,0 (a)
ANNO	2009/2010	39,9 (a)	13,2 (b)	53,1 (a)	25,1 (b)
	2010/2011	32,4 (b)	15,1 (a)	47,5 (b)	32,1 (a)
INTERAZIONI	V x T	**	**	**	**
	V x A	***	**	***	***
	T x A	**	ns	*	ns

Nelle **Figure 7, 8 e 9** sono riportate alcune delle interazioni significative osservate tra varietà ed anno (V x A) e varietà e trattamento (V x T) per le diverse frazioni fenoliche analizzate. L'interazione V x A osservata per il contenuto in polifenoli e flavonoidi liberi evidenzia chiaramente che la varietà moderna Palesio è quella che ha risentito maggiormente delle variazioni ambientali, mostrando un forte decremento dei livelli di composti fenolici durante la seconda annata, mentre le varietà antiche Inallettabile e Verna hanno subito variazioni di lieve entità. Le tre varietà oggetto di studio hanno mostrato una diversa risposta anche ai trattamenti applicati, come evidenziato dalle interazioni V x T osservate per la frazione legata di polifenoli e flavonoidi (**Figura 9**). Per entrambe le classi fenoliche si può notare come la varietà antica Inallettabile non risulta influenzata dall'applicazione dei preparati biodinamici (500, 500+501) mostrando un contenuto in polifenoli e flavonoidi legati pressoché invariato. Al contrario, le varietà Palesio e Verna hanno risposto ai trattamenti con un progressivo decremento per l'una e aumento per l'altra, sottolineando la rilevanza che i fattori fisiologici della cultivar svolgono nell'interagire con i trattamenti applicati nel corso del ciclo colturale.

A)



B)

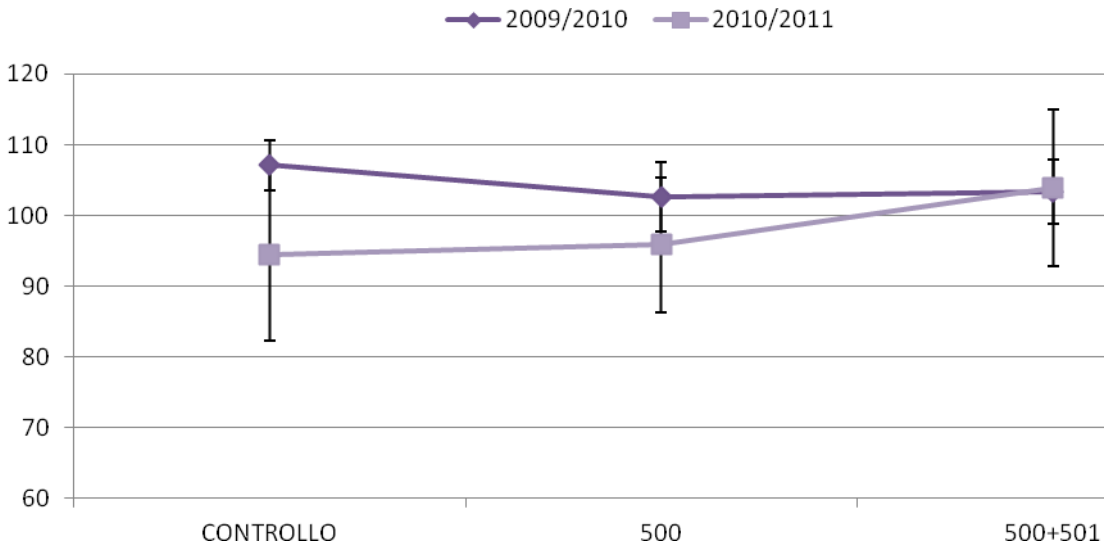
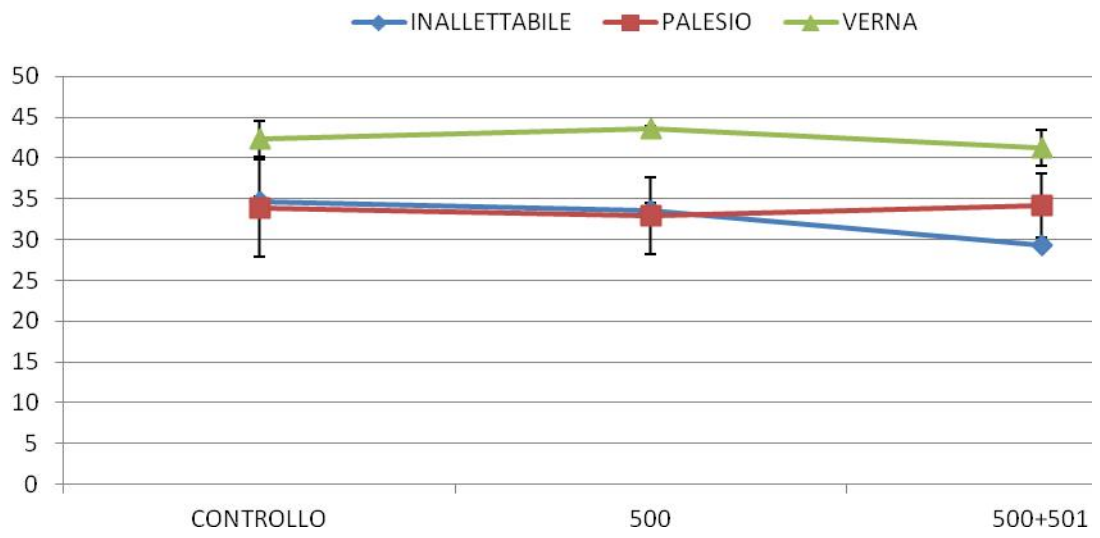


Figura 7. Interazione significativa osservata tra varietà e anno di coltivazione (V x A) (A) e tra varietà e trattamento (V x T) (B) per il contenuto in polifenoli liberi.

A)



B)

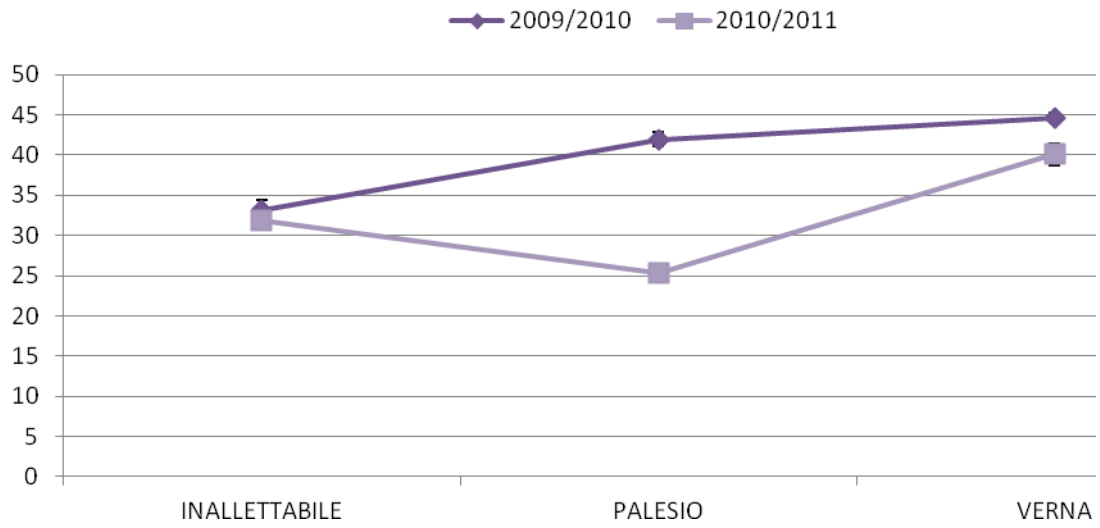
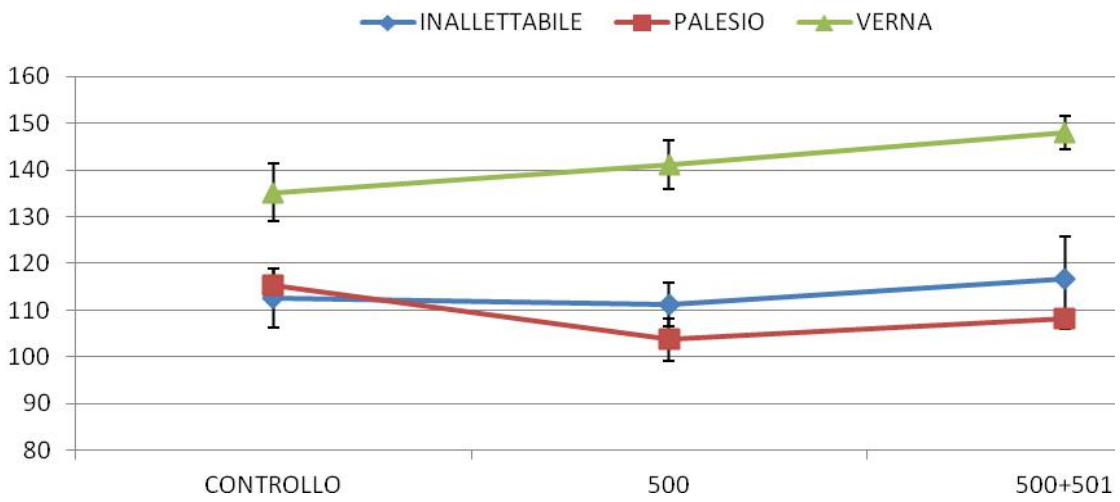


Figura 8. Interazione significativa osservata tra varietà e anno di coltivazione (V x A) (A) e tra varietà e trattamento (V x T) (B) per il contenuto in flavonoidi liberi.

A)



B)

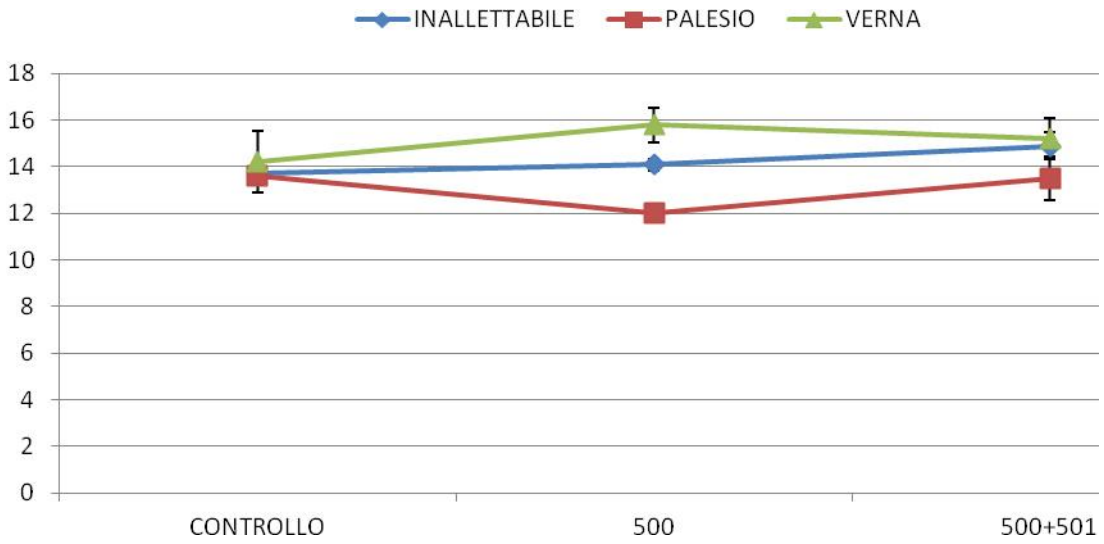


Figura 9. Interazione significativa osservata tra varietà e trattamento (V x T) per il contenuto in polifenoli (A) e flavonoidi legati (B).

6.6. Analisi dell'attività antiossidante

Numerosi studi hanno correlato l'incidenza di patologie come cancro e malattie cardiovascolari con la presenza nell'organismo umano di specie chimiche altamente reattive (radicali liberi) (Halliwell and Gutteridge, 1989; Chen et al., 1995; Benzie, 2000). Pertanto, il consumo di alimenti ricchi in antiossidanti può efficientemente contribuire a diminuire l'insorgenza di patologie scatenate dallo stress ossidativo (Renaud et al., 1998; Temple, 2000). I radicali liberi sono molecole instabili che presentano uno o più elettroni spaiati e possono essere disattivati dai composti antiossidanti mediante conversione in molecole maggiormente stabili. Come sottolineato precedentemente, i polifenoli costituiscono il principale gruppo di antiossidanti del frumento e possono agire come agenti riducenti, donatori di idrogeno, *quencer* di ossigeno singoletto e agenti chelanti di ioni metallici. Tali proprietà antiossidanti derivano dalla presenza di numerosi gruppi idrossilici legati alla struttura aromatica dei composti fenolici e alla geometria molecolare (Halliwell and Gutteridge, 1989). L'attività antiossidante delle varietà di frumento studiate è stata determinata mediante l'utilizzo di due test *in vitro* (analisi DPPH e FRAP). L'analisi DPPH consente di valutare il potenziale di radical *scavenger* mediato da scambio di protoni. Tale metodica si basa sull'utilizzo del 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), un radicale stabile che simula l'attività dannosa dei radicali liberi presenti nell'organismo umano (Brand-Williams et al., 1995; Yu et al., 2002). L'analisi FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Activity) permette invece di valutare le proprietà antiradicaliche misurando la riduzione degli ioni ferrosi Fe(III) in ioni ferrici Fe(II) operata dai composti antiossidanti mediante scambio di elettroni (Benzie and Strain, 1996).

I più elevati valori di attività antiossidante sono stati ottenuti per la varietà antica Verna, pari a 9,5 µmol/g per il test DPPH e 2,3 mmol/kg per l'analisi FRAP (**Tabella 12**). Le varietà Inallettabile e Palesio hanno invece mostrato simile potere antiossidante, con valori compresi tra 8,2 e 8,8 µmol/g per il test DPPH e pari a 2,1 mmol/100g per l'analisi FRAP. Tali risultati riflettono quanto osservato per il contenuto in composti fenolici delle tre varietà di frumento, confermando il ruolo centrale che questi composti svolgono come agenti antiossidanti. Similmente a quanto osservato per il contenuto in composti fenolici, sono state riscontrate differenze significative anche nell'attività antiossidante dei campioni allevati nelle due annate agrarie, con la granella ottenuta dal primo anno di sperimentazione caratterizzata dal potere riducente più elevato (**Tabella 12**).

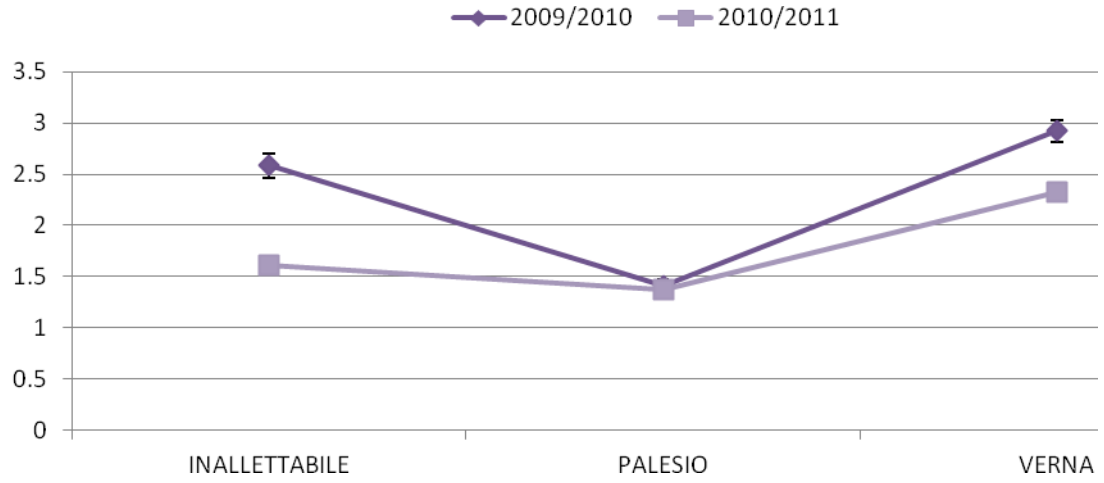
Tabella 12. Attività antiossidante delle varietà oggetto di studio allevate nelle due annate agrarie, determinata mediante test DPPH e FRAP e contenuto in carotenoidi.

		DPPH (µmol/g)	FRAP (mmol/100g)	Carotenoidi (mg/kg)
VARIETA	INALLETTABILE	8,8 (b)	2,1 (b)	2,1 (b)
	PALESIO	8,2 (c)	2,1 (b)	1,4 (c)
	VERNA	9,5 (a)	2,3 (a)	2,6 (a)
TRATTAMENTO	CONTROLLO	8,9 (a)	2,2 (a)	2,1 (a)
	500	8,7 (a)	2,1 (a)	2,0 (a)
	500 + 501	8,9 (a)	2,2 (a)	2,0 (a)
ANNO	2009/2010	9,6 (a)	2,2 (a)	2,3 (a)
	2010/2011	8,1 (b)	2,1 (b)	1,8 (b)
INTERAZIONI	V x T	ns	ns	***
	V x A	*	ns	***
	T x A	ns	ns	ns

6.7. Determinazione del contenuto in carotenoidi

I carotenoidi sono metaboliti secondari che svolgono importanti funzioni fisiologiche nella cariosside di frumento, poiché sono in grado di stabilizzare i radicali liberi e proteggere il seme dai processi di deterioramento. La luteina è il carotenoide più abbondante nella cariosside integrale di frumento, seguita da zeaxantina e β-carotene (Adom et al., 2003). Se introdotti in quantità sufficienti con la dieta, i carotenoidi possono agire come potenti antiossidanti e proteggere la salute dell'uomo da molte patologie croniche. In particolare, studi epidemiologici hanno correlato l'elevato apporto di carotenoidi alimentari con una minore incidenza della degenerazione della macula oculare in età avanzata (Granado et al., 2003). Infatti, luteina e zeaxantina sono i pigmenti più abbondanti della macula che tutelano gli occhi dal danneggiamento ossidativo, proteggendo dalle radiazioni blu-violette (400-490 nm) e stabilizzando i radicali liberi. Nella presente ricerca, il contenuto in carotenoidi è risultato variare principalmente in funzione del genotipo (**Tabella 12**). La varietà Verna ha mostrato il contenuto in carotenoidi più elevato (2,6 mg/kg), circa doppio rispetto a quanto osservato per la varietà moderna Palesio (1,4 mg/kg), mentre Inallettabile ha mostrato livelli di carotenoidi intermedi (2,1 mg/kg). Il trattamento non ha esercitato alcuna influenza sull'accumulo di tali pigmenti, mentre è stato osservato un effetto parziale della stagione di crescita evidenziato da un più elevato contenuto nel primo anno (2,3 mg/kg) rispetto al secondo (1,8 mg/kg). Tale risultato, similmente a quanto già osservato per il contenuto in composti fenolici, può essere correlato alle temperature più elevate della prima annata agraria che potrebbero aver favorito la biosintesi di carotenoidi come forma di difesa dagli stress abiotici (luce, temperatura). L'interazione significativa osservata tra varietà ed anno e riportata in **Figura 10A**, evidenzia che l'incremento della biosintesi dei carotenoidi durante il primo anno ha interessato principalmente le varietà antiche Inallettabile e Verna, mentre Palesio ha mostrato valori circa uguali in entrambe le annate. Tale dato sembra suggerire che l'effetto della selezione attuata sulla varietà moderna abbia portato a favorire i processi metabolici relativi a macronutrienti come proteine e amido, sfavorendo altre vie metaboliche ritenute non utili nei programmi di miglioramento moderni. Le varietà selezionate sembrano dunque avere una minore capacità di rispondere alle fluttuazioni ambientali rispetto alle accessioni di antica costituzione. Tale concetto può essere confermato anche considerando l'interazione significativa tra varietà e trattamento (V x T), la quale mostra che la varietà moderna Palesio non risente degli effetti del trattamento con 500 e 500+501 rispetto al controllo in termini di contenuto in carotenoidi (**Figura 10B**). L'applicazione dei preparati biodinamici ha invece causato differenti risposte fisiologiche nelle varietà antiche, inducendo in particolare un incremento in Inallettabile e un decremento in Verna a seguito dell'applicazione combinata dei preparati 500+501. Tali variazioni sono comunque di lieve entità e confermano quanto già indicato in letteratura riguarda alla predominante determinazione genetica del contenuto in carotenoidi (Adom et al., 2003; Moore et al., 2005; Okarter et al., 2010).

A)



B)

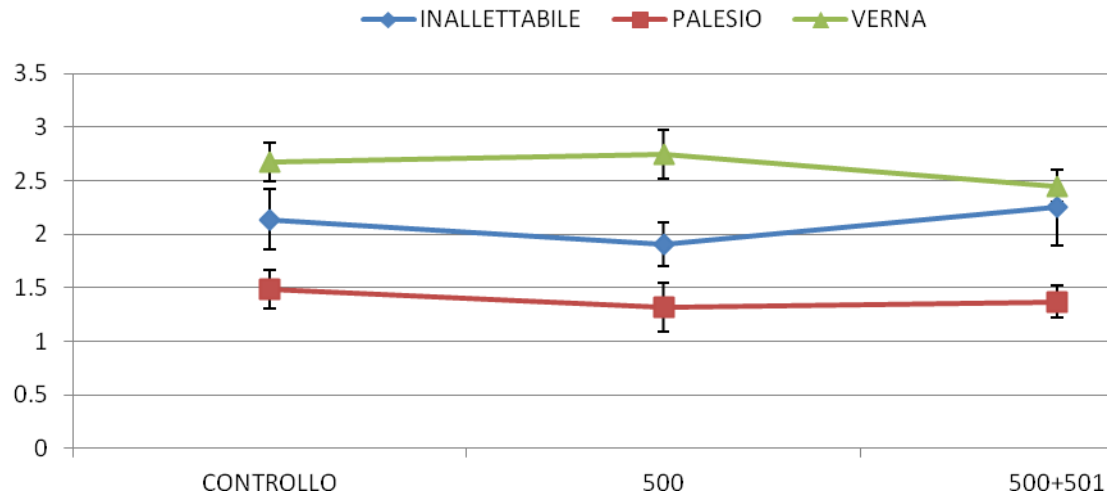


Figura 10. Interazione significativa osservata tra varietà e anno di coltivazione (V x A) (A) e tra varietà e trattamento (V x T) (B) per il contenuto in carotenoidi.

7. PROPRIETA' REOLOGICHE DELLE FARINE

La qualità molitoria e tecnologica è stata uno dei principali obiettivi dei programmi di miglioramento dopo la "Rivoluzione Verde". Anche se i tratti richiesti possono variare a seconda dell'uso finale sul mercato, la selezione delle cultivar è stata di frequente condotta per soddisfare i requisiti dell'industria di trasformazione, per ottenere dunque farine in grado di tollerare stress tecnologici molto elevati durante l'impastamento e la lievitazione (Cocchi et al., 2005). Due dei principali fattori della qualità della farina (il tempo di impasto e il volume) sono strettamente correlati con le componenti del glutine (glutenine, gliadine) (Lookhart and Albers, 1988; Suchy et al., 2003). A causa della relazione negativa tra la resa e la concentrazione di proteine, in passato è stata effettuata una selezione per ottimizzare la qualità tecnologica del glutine facendo perno su intensivi apporti di fertilizzanti durante tutto il ciclo colturale (Wolfe et al., 2008). Non è pertanto casuale che spesso l'uso di varietà moderne in agricoltura biologica e a basso input ha portato

all'ottenimento di un prodotto non in grado di soddisfare le richieste del settore di trasformazione. Nel presente lavoro di ricerca, le farine raffinate ottenute dai tre genotipi oggetto di indagine, allevati in accordo alle tre tesi sperimentali, sono state analizzate mediante alveografo di Chopin per valutarne le proprietà reologiche in accordo al metodo ufficiale 54-30A (AACC, 1995). Dalle farine ottenute per ciascuna varietà sono stati formati degli impasti discoidali successivamente insufflati a formare delle bolle; la variazione di pressione all'interno di ciascuna bolla è stata registrata in forma grafica come "alveogramma" (Borghi et al., 1997). L'altezza massima di tale curva fornisce una stima della tenacità dell'impasto (*P*, espresso in mm), mentre la lunghezza misura l'estensibilità (*L*, espresso in mm) e l'indice di rigonfiamento (*G*, in ml). L'area sottesa alla curva è invece proporzionale all'energia richiesta per causare la rottura della bolla (*W*, espresso in J x 10^{-4}). Inoltre è stato calcolato il rapporto tra altezza e lunghezza del picco (*P*/L) per ottenere un indice comunemente utilizzato per descrivere la qualità reologica del glutine (Preston e Williams, 2003). Considerando i valori medi ottenuti per ciascuna varietà, l'indice *W* è risultato variare tra 108,33 x 10^{-4} J (Inallettabile) e 128,67 x 10^{-4} J (Palesio) (**Tabella 13**). La varietà moderna Palesio e l'accessione di antica costituzione Verna hanno mostrato valori di *W* simili (rispettivamente 128,67 e 124,33 x 10^{-4} J) mentre per la varietà Inallettabile tale indice ha evidenziato una scarsa forza del glutine. I restanti parametri alveografici considerati non sono risultati variare in funzione del genotipo. I valori di *P* legati alla tenacità dell'impasto sono risultati compresi tra 58,33 mm (Inallettabile) e 71,00 mm (Verna), mentre l'indice *L* correlato alla estensibilità dell'impasto è risultato compreso tra 52,00 mm (Verna) e 60,33 mm (Inallettabile). Nessuna differenza significativa è stata inoltre osservata tra i genotipi per l'elasticità dell'impasto espressa dall'indice di rigonfiamento *(G*), compreso tra 16,03 ml (Verna) e 17,13 ml (Inallettabile) (**Tabella 13**). In Italia, le farine sono comunemente classificate in quattro gruppi (frumento di forza, FF; frumento panificabile superiore, FPS; frumento panificabile, FP; frumento da biscotto, FB) sulla base delle loro proprietà tecnologiche, secondo quanto proposto da ASSINCER (Associazione Intersettoriale Cereali e altri seminativi) (Cocchi et al., 2005). Tale classificazione si basa sull'Indice Sintetico di Qualità che include indici alveografici come *W* e *P*/*L*. I valori ottenuti nella presente ricerca sono risultati corrispondere al range di valori attribuito all'ultima classe (FB) per quanto riguarda l'indice W (140-110 x 10^{-4} J), ma hanno mostrato una media tenacità ed estensibilità degli impasti data da valori di *P*/*L* corrispondenti alla classe dei frumenti panificabili (FP) (1,2-0,7). Le proprietà reologiche osservate sono risultate generalmente inferiori a quanto riportato in letteratura per varietà moderne di frumento allevate in sistemi convenzionali e a basso input (Lopez-Bellido et al., 1998; Guarda et al., 2004).

Tabella 13. Proprietà reologiche delle farine oggetto di studio ottenute mediante alveografo di Chopin.

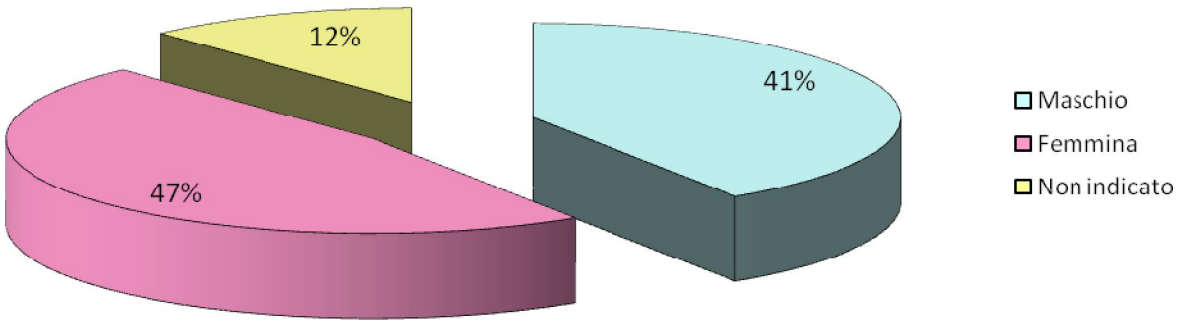
		W (x 10^{-4} J)	*P* (mm)	*L* (mm)	*P*/*L*	*G* (ml)
Varietà	INALLETTABILE	108,33 (b)	58,33 ns	60,33 ns	1,06 ns	17,13 ns
	PALESIO	128,67 (a)	64,00 ns	54,00 ns	1,33 ns	16,23 ns
	VERNA	124,33 (a)	71,00 ns	52,00 ns	1,38 ns	16,03 ns
Trattamento	CONTROLLO	123,67 ns	68,00 ns	56,67 ns	1,40 ns	16,57 ns
	500	123,33 ns	61,33 ns	61,33 ns	1,05 ns	17,37 ns
	500+501	114,33 ns	64,00 ns	48,33 ns	1,32 ns	15,47 ns

8. PANEL TEST: ANALISI SENSORIALE SUI PRODOTTI FINITI (PANE)

L'analisi sensoriale è un metodo che consiste nella valutazione delle caratteristiche di un prodotto attraverso gli organi di senso; è uno strumento che viene utilizzato in moltissimi campi, ma probabilmente l'alimentazione è il campo dove tale pratica trova il maggior sviluppo. Al fine di determinare il profilo sensoriale dei pani ottenuti dalle singole varietà di frumento e di conoscere le preferenze dei consumatori, sono stati condotti test di accettazione sensoriale. Una parte della semente prodotta durante le due annate agrarie (2009/2010, 2010/2011) è stata destinata alla macinazione mediante mulino a pietra e burattata in modo da ottenere una farina semi-integrale (tipo 2). Il pane è stato ottenuto con lievitazione a pasta acida, utilizzando la stessa composizione di lievito, a partire dalle farine delle tre varietà oggetto di studio (Verna, Inallettabile e Palesio). Le valutazioni sensoriali sono state condotte su di un panel di assaggiatori non addestrati, ovvero consumatori selezionati a random, chiamati ad esprimere un giudizio di preferenza e accettabilità. I panel test sono stati effettuati mediante approccio diretto nei seguenti luoghi: "Forno Baracca", Nonantola (MO); Agriturismo "Podere Santa Croce", Argelato (BO); La Collina Società Cooperativa Agricola, Codemendo (RE); Cooperativa Agricola Biodiversi, Casalecchio di Reno (BO) (**Figura 11**); Az. Ferri, Anzola dell'Emilia (BO). La scheda di valutazione fornita agli assaggiatori comprendeva una prima sezione relativa ai dati anagrafici dell'intervistato (sesso ed età) ed una seconda sezione relativa alla valutazione delle caratteristiche sensoriali del pane (valutazione visiva, olfattiva e gustativa). La scala di valutazione utilizzata andava da 1 a 9, dove con 1 veniva identificato il livello minimo di gradimento, mentre con 9 il livello di massimo gradimento. Per impedire ogni tipo di condizionamento le valutazioni sensoriali sono state condotte in cieco assegnando ad ogni tipologia di pane un codice identificativo. In totale sono state effettuate 368 interviste, in un panel di consumatori piuttosto eterogeneo, le cui caratteristiche sono rappresentate in **Figura 12**.

Figura 11. Panel test effettuato presso la Cooperativa agricola Biodiversi (Casalecchio di Reno, BO) il 16 Ottobre 2011.

A)



B)

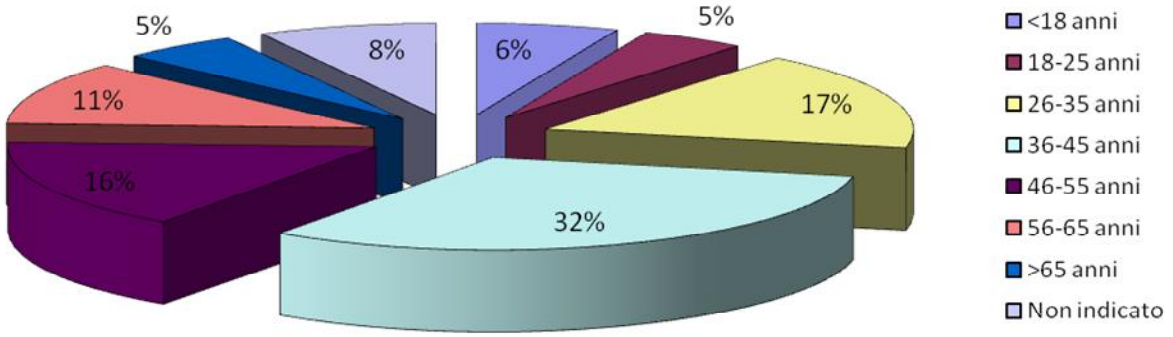


Figura 12. Caratteristiche del panel di consumatori intervistati: A) sesso; B) età.

Considerando la valutazione complessiva dei pani, tutti hanno ottenuto un punteggio medio superiore alla sufficienza ed in particolare compreso tra 6,86 ± 0,20 (Verna) e 7,52 ± 0,22 (Palesio) (**Figura 13**). Per quanto riguarda la valutazione visiva, i pani ottenuti dalle farine di Inallettabile e Palesio hanno ottenuto una valutazione media maggiore (pari a 7,43 ± 1,25 e 7,52 ± 1,05) rispetto a quanto assegnato al pane Verna (7,01 ± 1,51). La valutazione olfattiva invece ha evidenziato che il pane Palesio, avendo ottenuto un punteggio medio di 7,74 ± 1,38 sia preferito dai consumatori rispetto ai pani ottenuti dalle varietà antiche Verna e Inallettabile, che hanno ottenuto una valutazione rispettiva di 6,94 ± 1,35 e 7,09 ± 1,20. Infine in merito alla preferenza gustativa, similmente a quanto osservato per l'analisi visiva, i pani Inallettabile e Palesio hanno ottenuto una valutazione di 7,49 ± 1,25 e 7,54 ± 1,18 rispettivamente, che è risultata statisticamente superiore rispetto al pani Verna con un voto medio di 6,63 ± 1,50. I grafici in **Figura 14** mostrano, per ciascun parametro sensoriale, la frequenza percentuale dei voti assegnati alle sei tipologie di pane in esame. Visivamente tutti i pani sono stati apprezzati e almeno il 77% degli assaggiatori ha assegnato un punteggio superiore alla sufficienza; in particolare il pane ottenuto dalla farina di Palesio non ha ottenuto nessuna valutazione di basso gradimento (inferiore a 6). Anche per quanto riguarda la preferenza olfattiva i pani sono stati apprezzati con votazioni superiori alla sufficienza per almeno il 68% degli assaggiatori. Dal punto di vista gustativo infine la maggior parte degli assaggiatori (60%) ha giudicato ottimale tale parametro per tutti i pani assaggiati, assegnando votazioni comprese tra il 7 ed il 9.

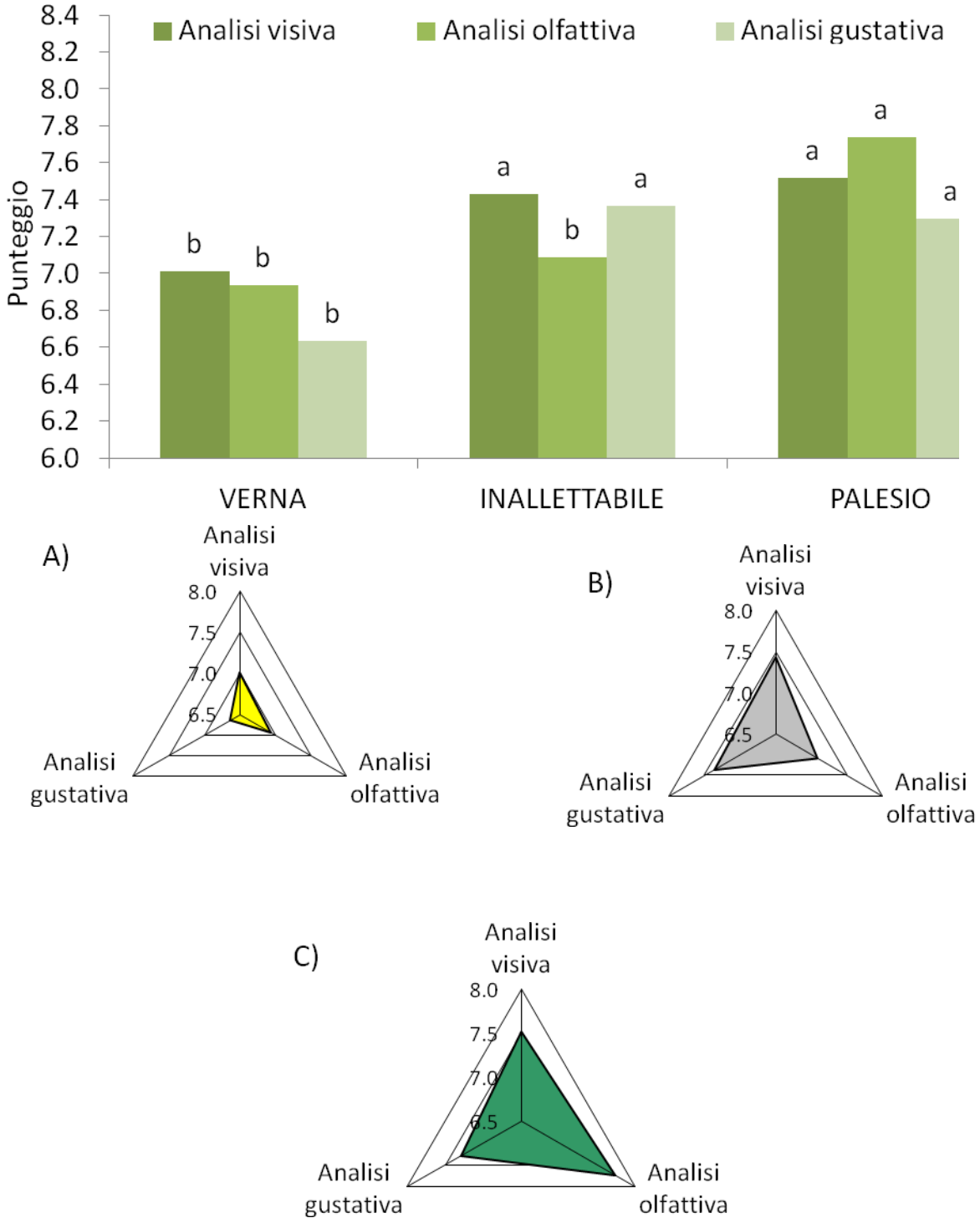


Figura14. Punteggio medio ottenuto per ciascuna caratteristica sensoriale presa in esame (analisi visiva, olfattiva e gustativa). A, Verna; B, Inallettabile; C, Palesio.

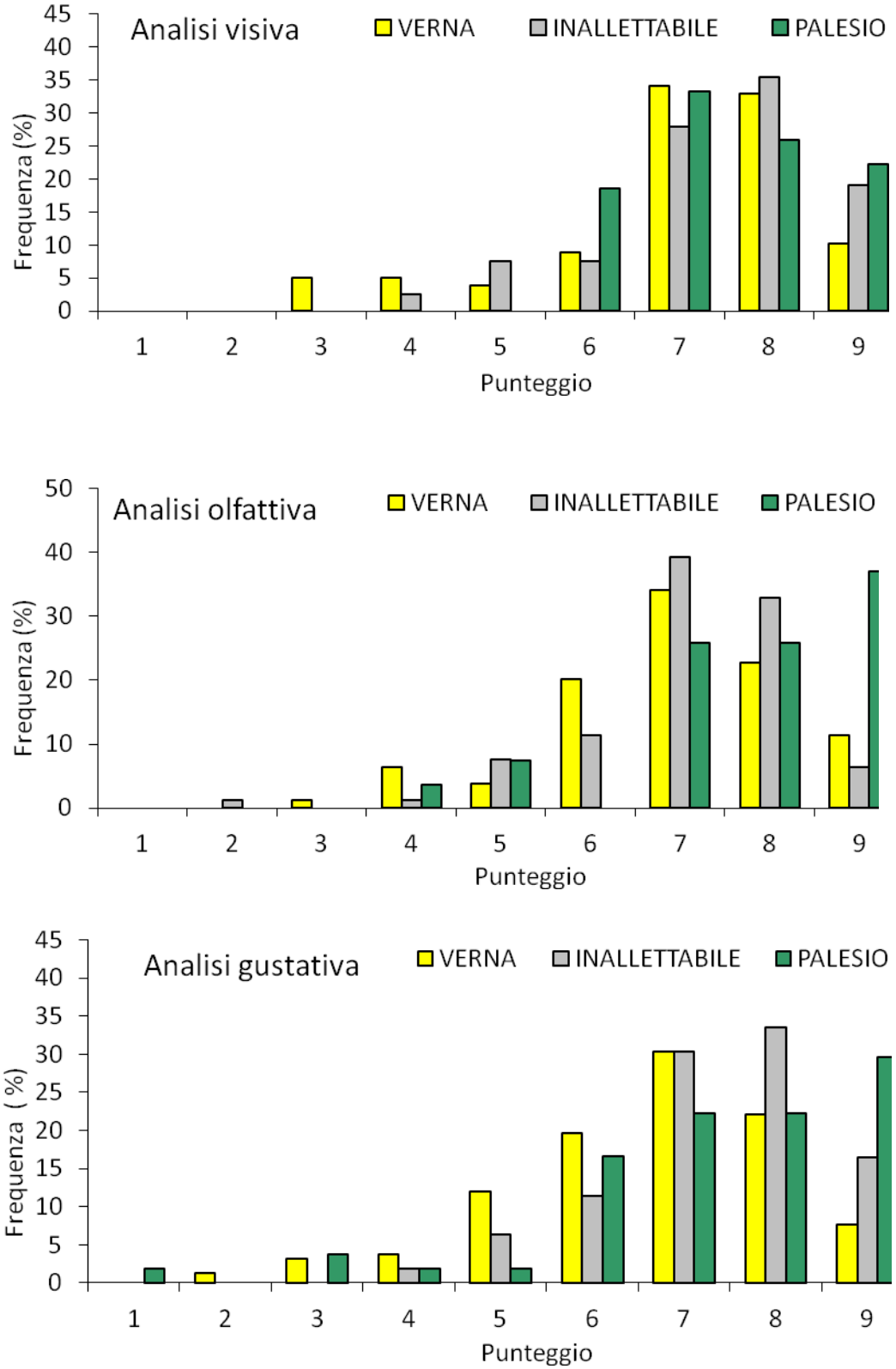


Figura 14. Frequenze percentuali dei voti assegnati alle caratteristiche sensoriali in esame.

9. STUDIO DI INTERVENTO *IN VIVO*: VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEL CONSUMO DI PANE SUI PARAMETRI CORRELATI AL PROCESSO ATEROSCLEROTICO

La presente ricerca ha previsto uno studio *In vivo* allo scopo di valutare l'influenza delle proprietà benefiche del pane ottenuto da varietà antiche di frumento su parametri correlati al processo aterosclerotico. Lo studio di intervento ha coinvolto 20 soggetti sani, senza alcuna evidenza di malattia aterosclerotica clinicamente rilevabile, ma ad alto rischio (>15% a 5 anni secondo le carte del rischio cardiovascolare della Società Europea di Cardiologia). I soggetti includevano 9 maschi e 11 femmine di età compresa tra i 21 e i 61 anni (età media 39,5). Lo schema sperimentale adottato ha previsto un "periodo test" di 10 settimane, durante il quale i soggetti sono stati alimentati con una dieta a base di pane (150 g al giorno) ottenuto per lievitazione con pasta acida di farina tipo semi-integrale derivante dalla macinazione a pietra di granella della varietà antica Verna ottenuta dalle prove sperimentali di campo. Tale varietà è stata scelta sulla base dei risultati ottenuti dalle analisi del profilo nutrizionale e funzionale, in virtù dell'elevato contenuto in fibra alimentare, polifenoli e flavonoidi. Successivamente al Periodo Test, è stato effettuato un "periodo di wash-out" della stessa durata del precedente (10 settimane) ed infine, un "periodo di controllo", nel corso del quale i soggetti hanno assunto 150 g al giorno di pane disponibile in commercio. Sul gruppo di individui è stato verificato l'effetto dell'assunzione a medio termine di tale alimento mediante la determinazione del profilo lipidico (colesterolo totale, colesterolo LDL, colesterolo HDL, trigliceridi), infiammatorio (interleuchina-6, interleuchina-8, inteleuchina-10, TNF-alfa) ed emoreologico (viscosità del sangue, filtrazione eritrocitaria, viscosità del plasma). Tali parametri sono stati determinati in 4 fasi della sperimentazione: all'inizio del periodo test (T0), alla fine del periodo test (T1), all'inizio del periodo di controllo (T2), alla fine del periodo di controllo (T4).

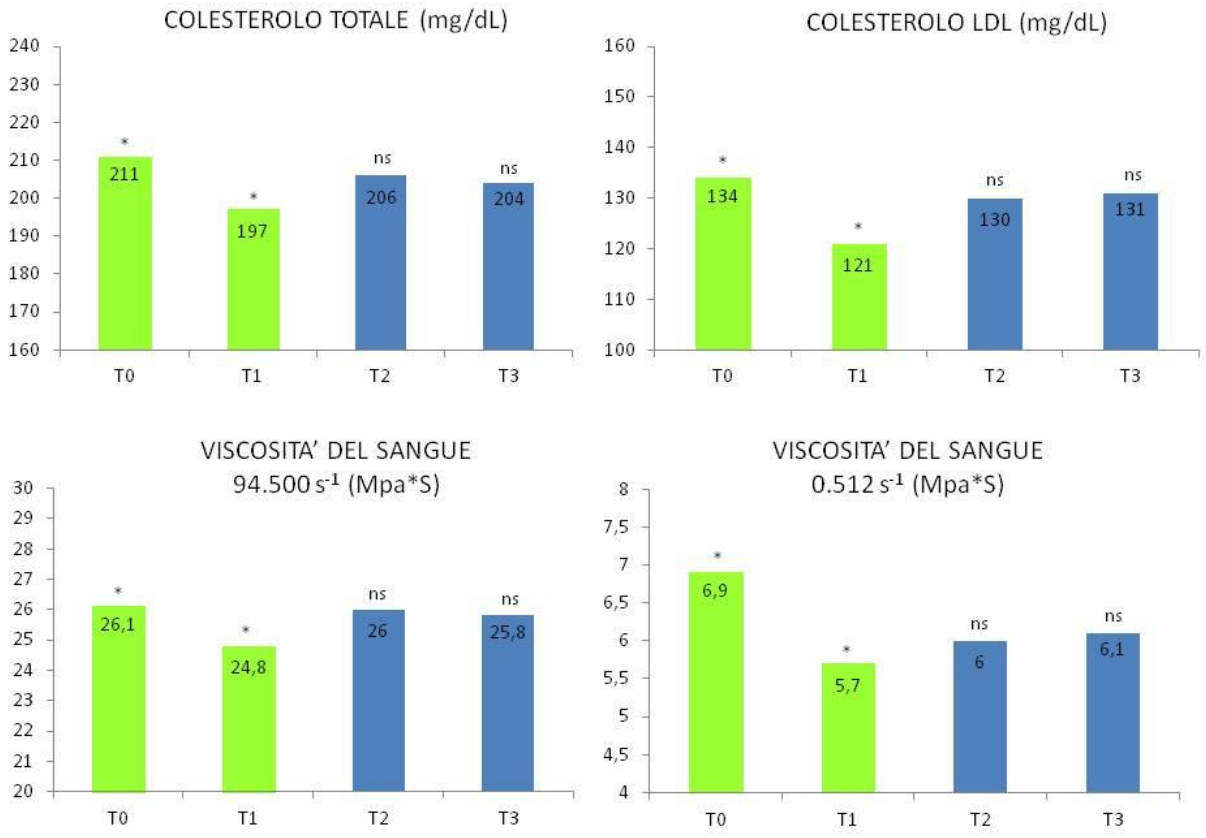


Figura 15. Risultati relativi al profilo lipidico e emoreologico ottenuti nella quattro fasi della sperimentazione (T0, T1, T2, T3).

I risultati relativi alla determinazione del profilo lipidico dei soggetti coinvolti sono riportati in **Figura 15**. Si può osservare come il consumo di pane Verna durante il periodo test abbia indotto un significativo miglioramento del colesterolo totale, che ha mostrato una riduzione da 211 (T0) a 197 mg/dL(T1), e del colesterolo LDL, con riduzione da 134 (T0) a 121 mg/dL(T1). Al contrario, i valori di colesterolo totale e LDL ottenuti nei due prelievi T2 e T3 del periodo di controllo non hanno mostrato variazioni significative. Per quanto riguarda il profilo emoreologico, in **Figura 15** sono riportati i risultati ottenuti nella determinazione della viscosità del sangue ad elevato e basso gradiente di velocità. Anche per tali parametri è stata osservata una riduzione significativa dei livelli di viscosità alla fine del periodo test, mentre il consumo di pane commerciale non ha indotto variazioni. Di notevole rilevanza è inoltre il dato relativo al tasso di filtrazione eritrocitaria mostrato in **Figura 16**. Si può notare infatti un significativo miglioramento di tale parametro durante il consumo di pane Verna (periodo test), che ha indotto un aumento da 8.4 a 9.1 %, mentre nel periodo di controllo tale valore è risultato stabile e pari a 8.3-8.4%. Infine, per quanto riguarda il profilo antinfiammatorio, in **Figura 16** sono riportati i risultati relativi ai livelli di due citochine (interleuchina-6 e -8). I soggetti coinvolti hanno mostrato livelli di interleuchine piuttosto stabili, compresi tra 2,8 e 3,6 mg/dL per l'interleuchina-6 e tra 26,2 e 28,1 mg/dL per l'interleuchina-8, e non è stata osservata alcuna differenza in seguito al consumo di pane Verna e di pane commerciale. I risultati ottenuti dallo studio in vivo suggeriscono che il consumo di pane di varietà antiche di frumento, come ad es. Verna, sembra indurre cambiamenti biochimici benefici in soggetti sani, per quanto concerne i minori livelli circolatori di marker del processo aterosclerotico, come colesterolo e viscosità del sangue. Tali dati risultano particolarmente interessanti nell'ottica di definire e fornire raccomandazioni alimentari alla popolazione umana per la prevenzione primaria di patologie cardiovascolari.

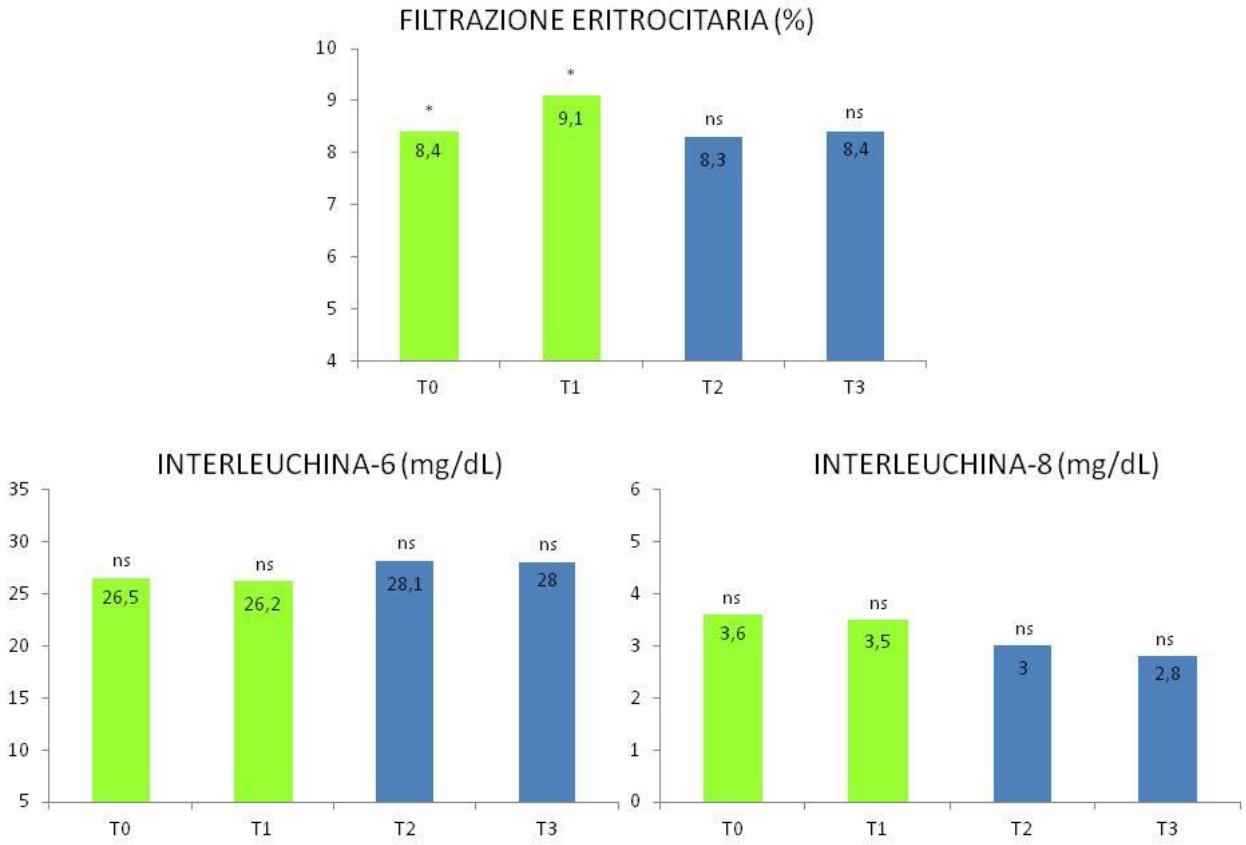


Figura 16. Risultati relativi a tasso di filtrazione eritrocitaria e profilo infiammatorio ottenuti nella quattro fasi della sperimentazione (T0, T1, T2, T3).

CONCLUSIONI

Le varietà di frumento tenero oggetto di studio allevate in accordo a un regime di coltivazione biodinamico hanno mostrato performance agronomiche di livello medio-alto per il settore a basso input e interessanti caratteristiche di qualità commerciale, nonché nutrizionale e nutraceutica. In particolare, la resa in granella è risultata essere in linea con le medie nazionali ottenute in agricoltura biologica e biodinamica. Inoltre si è potuto osservare come il grande divario solitamente presente in termini di produttività tra varietà antiche e moderne allevate in regimi di coltivazione convenzionali, venga notevolmente ridotto quando tali varietà sono sottoposte ad una coltivazione a basso input. L'utilizzo dei preparati biodinamici 500 (corno letame) e 500+501 (corno letame + corno silice) ha indotto modificazioni sia sui parametri di qualità commerciale, sia di qualità nutrizionale e funzionale della granella raccolta. Ad esempio, si è osservata una diminuzione del tenore in micotossine nella granella delle varietà antiche trattate con il preparato 500+501. I valori di micotossine, comunque, sono risultati per tutte le varietà e per tutti i trattamenti ben al di sotto dei valori massimi ammessi per i cereali non trasformati e per prodotti derivati dal decreto della Commissione Europea (EC N. 1126/2007), garantendo quindi un elevato standard igienico- sanitario dei prodotti finali. Per quanto riguarda gli effetti dei trattamenti biodinamici sulle proprietà nutrizionali e nutraceutiche delle varietà oggetto di studio, è stato riscontrato un incremento del contenuto di fibra solubile della varietà Inallettabile e del contenuto in polifenoli della varietà Verna in seguito all'applicazione del preparato 500. Sebbene la determinazione delle proprietà tecnologiche delle farine abbia mostrato valori di indici alveo grafici piuttosto bassi, la panificazione con metodo tradizionale basato su lievitazione in pasta madre ha fornito un prodotto finale generalmente apprezzato dai consumatori, come dimostrato dalle analisi sensoriali svolte. Inoltre, lo studio *In vivo* ha evidenziato che il consumo di pane prodotto con la varietà antica Verna può indurre cambiamenti biochimici benefici per quanto concerne i minori livelli circolatori di marker del processo aterosclerotico, come colesterolo e viscosità del sangue. Tali dati risultano particolarmente interessanti nell'ottica di definire e fornire raccomandazioni alimentari alla popolazione umana per la prevenzione primaria di patologie cardiovascolari. In conclusione, l'utilizzo di varietà antiche può garantire standard produttivi paragonabili a quelli delle varietà moderne se coltivate in un regime a basso input come l'agricoltura biodinamica. In aggiunta, tali varietà possiedono caratteristiche qualitative di pregio che sono state perse o sfavorite nel processo di selezione delle varietà moderne principalmente mirato all'aumento della produttività e della qualità tecnologica. In particolare, l'accessione di antica costituzione Verna è emersa per le peculiari proprietà nutraceutiche, dimostrate sia dalle determinazioni analitiche si dallo studio in vivo, e può dunque fornire un interessante materiale di partenza per lo sviluppo di varietà adatte all'agricoltura biologica e biodinamica dotate di spiccate proprietà nutraceutiche.

BIBLIOGRAFIA

Adom KK, Sorrells Me, Liu RH (2005). Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 2297–2306.

Adom K.K., Sorrells M.E., Liu R.H., (2003). Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties. J.Agric. Food Chem., 51: 7825-7834.

Alabaster O, Tang Z, Shivapurkar N (1996). Dietary fiber and the chemopreventive modelation of colon carcinogenesis. Mutation Research, 350:185- 197.

American Association of Cereal Chemists (1983). A.A.C.C. Approved Methods, 8th ed. St Paul, Minn. USA.

American Association of Cereal Chemists (1995). A.A.C.C. Approved Methods, 9th ed. St. Paul, Minn. USA.

Anderson JW, Baird P, Davis RDJ, Ferreri S, Knudtson M, Koraym A, Waters V, Williams CV (2009). Health benefits of dietary fiber. Nutrition Reviews, 67(4):188–205.

Benzie IF (2000). Evolution of antioxidant defence mechanisms. European Journal of Nutrition, 39: 53-61.

Carter JW, Madl R, Padula F (2006).Wheat antioxidants suppress intestinal tumor activity in Min mice. Nutrition Research, 26:33–38.

Benzie IF, Strain JJ, 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power": the FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239: 70-76.

Borghi B, Corbellini M, Minoia C, Palumbo M, Di Fonzo N, Perenzin M (1997). Effects of Mediterranean climate on wheat bread-making quality. European Journal of Agronomy, 6:145-154.

Brand-Williams W, Cuvelier HE, Berset C (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm. Wiss. Technol., 28: 25-30.

Champeil A, Fourbet JF, Doré T, Rossignol L (2004). Influence of cropping system on Fusarium head blight and mycotoxin levels in winter wheat. Crop Protection, 23: 531-537.

Charalampopoulos D, Wang R, Pandiella SS, Webb C (2002). Application of Cereals and Cereal Components in Functional Foods: A Review. International Journal of Food Microbiology, 79: 131-141.

Chaudhri OB, Salem V, Murphy KG, Bloom SR (2008). Gastrointestinal satiety signals. Annual Review of Physiology, 70:239–255.

Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Amen BN (1995). Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. Procedures National Academies of Science, 92: 4337-4341.

Cocchi M , Corbellini M, Foca G, Lucisano M, Pagani MA, Tassi L, et al. (2005). Classification of bread wheat flours in different quality categories by a wavelet-based feature selection/classification algorithm on NIR spectra. Analytica Chimica Acta, 544 :100–107.

Dietrych-Szostak D., and Oleszek W., (1999). Effect of processing on the flavonoid content in buchwheat (Fagopyrum esculentum Möench) grain. J. Agric. Food Chem., 47: 4384-4387.

Di Silvestro R, Marotti I, Bosi S, Bregola V, Segura Carretero A, Sedej I, Mandic A, Sakac M, Benedettelli S, Dinelli G (2012). Health-promoting phytochemicals of Italian common wheat varieties grown under low-input agricultural management. Journal of the Science of Food and Agriculture, DOI: 10.1002/jsfa.5590.

Dixon RA, Paiva NL (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. The Plant Cell, 7:1085-1097.

Dupont FM, Altenbach SB (2003). Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. Journal of Cereal Science, 38:133-146.

Edwards SG (2009). Fusarium mycotoxin content of UK organic and conventional wheat. Food Additives and Contaminants, 26(4):496-506.

Ekinci R., (2005). The effect of fermentation and drying on the water-soluble vitamin content of tarhana, a traditional Turkish cereal food. Food Chemistry, 90: 127-132.

Falk J., Krahnstöver A., van der Kooij T.A.W., Schlensong M., Krupinska K., (2004). Tocopherol and tocotrienol accumulation during development of caryopses from barley (Hordeum vulgare L.). Phytochemistry, 65: 2977-2985.

Fan MS, Zhao FJ, Fairweather-Tait SJ, Poulton PR, Dunham SJ, McGrath SP (2008). Evidence of decreasing mineral density in wheat grain over the last 160 years. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 22:315–324.

Fardet A (2010). New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole-grain cereals: What is beyond fibre? Nutrition Research Review, 23:65–134.

Ficco DBM, Riefolo C, Nicastro G, De Simone V, Di Gesù AM, Beleggia R, Platani C, Cattivelli L, De Vita P (2009). Phytate and mineral elements concentration in a collection of Italian durum wheat cultivars. Field Crops Research, 111:235–242.

Food and Nutrition Board, National Academies (1997). Dietary reference intakes for calcium, phosphorous, magnesium, vitamin D, and fluoride. Retrieved February 6, 2009 from The National Academies Press: http://www.nap.edu/.

Food and Nutrition Board, National Academies (2004). Dietary reference intakes for water, potassium, sodium, chloride, and sulphate. Retrieved February 6, 2009 from The National Academies Press: http://www.nap.edu/.

Gan YT, McCaig TN, Clarke P, DePauw RM, Clarke JM, McLeod JG, (2000). Test-weight and weathering of spring wheat. Canadian Journal of Plant Science, 80:677-685.

Gebruers K, Dornez E, Boros D, Fras A, Dynkowskaw, Bedo Z, Rakszegfi M, Delcour Ja, Courtin Cm (2008). J. Agric. Food Chem. 2008, 56, 9740–9749.

Granado F, Olmedilla B and Blanco I, Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. Br J Nutr 90:487–502 (2003).

Guarda G, Padovan S, Delogu G (2004). Grain yield, nitrogen-use efficiency and baking quality of old and modern Italian bread-wheat cultivars grown at different nitrogen levels. European Journal of Agronomy, 21:181–192.

Gujska E., & Majewska K., (2005). Effect of baking process on added folic acid and endogenous folate stability in wheat and rye breads. Plant Foods for Human Nutrition, 60: 37-42.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1989). Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press.543.

Harris PJ, Smith BG (2006). Plant cell walls and cell-wall polysaccharides: structures, properties and uses in food products. International Journal of Food Science and Technology, 41(2):129–143.

Heimler D, Vignolini P, Isolani L, Arfaioli P, Ghiselli L, Romani A (2010). Polyphenol Content of Modern and Old Varieties ofTriticum aestivum L. and T. durum Desf. Grains inTwo Years of Production. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 58:7329–7334.

Houshmand S, Arzani A, Maibody SA (2004). Influences of drought and salt stress on grain quality of durum wheat. Proceedings of the 17th EUCARPIA General congress. Tulln. Austria, 383-386.

Hussain A, Larsson H, Kuktaite R, Johansson E (2010). Mineral composition of organically grown wheat genotypes: contribution to daily minerals intake. International Journal of Environmental Research Public Health, 7:3442–3456.

Jacobs DR, Jr.; Meyer KA, Kushi LH, Folsom AR, (1998). Whole grain intake may reduce risk of coronary heart disease death in postmenopausal women: The Iowa Women's Health Study. The American Journal of Clinical Nutrition, 68: 248-257.

Jenkins DJ, Kendall CW (2000). Resistant starches. Current Opinion in Gastroenterology, 16:178–183.

Kindred DR, Verhoeven TMO, Weightman RM, Swanston JS, Agu RC, Brosnan JM, Sylvester-Bradley R (2008). Effects of variety and fertiliser nitrogen on alcohol yield, grain yield, starch and protein content, and protein composition of winter wheat. Journal of Cereal Science, 48:46-57.

Kovacik J, Klejdus B, Backor M, Repcak M (2007). Phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic compounds accumulation in nitrogen-deficient Matricaria chamomilla leaf rosettes. Plant Science, 172:393–399.

Kristensen M, Morten G. Jensen MG, Riboldi G, Petronio M, Bugel S, Toubro S, Tetens I, Astrup A (2010). Wholegrain vs. refined wheat bread and pasta. Effect on postprandial glycemia, appetite, and subsequent ad libitum energy intake in young healthy adults. Appetite, 54:163-169.

Kroon PA, Faulds CB, Ryden P, Robertson JA, William G (1997). Release of Covalently Bound Ferulic Acid from Fiber in the Human Colon. Journal of Agricoltural and Food Chemistry, 45:661-667.

Lampi A.M., Nurmi T., Ollilainen V., Piironen V. (2008) Tocopherols and tocotrienols in wheat genotypes in the HEALTHGRAIN diversity screen. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 9716-9721.

Laperche A, Devienne-Barret F, Maury O, Legouis J, Ney B (2006). A simplified conceptual model of carbon/nitrogen functioning for QTL analysis of winter wheat adaptation to nitrogen deficiency. Theor Appl Genet, 113:1131–1146.

Leenhardt F, Fardet A, Lyan B, Gueux E, Rock E, Mazur A, Chanliaud E, Demignè C, Rémésy C (2008). Wheat germ supplementation of a low vitamin E diet in rats affords effective antioxidant protection in tissues. Journal of the American College of Nutrition, 27(2):222–228.

Lehman U, Robin F (2007). Slowly digestible starch - ist structure and health implications: a review. Trends in Food Science & Technology, 18:346-355.

Liu QM, Yang XM, Zhang L, Majetich G (2010). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of chlorogenic acid from Folium eucommiae and evaluation of its antioxidant activity. Journal of Medicinal Plants Research, 4:2503-2511.

Liukkonen K-H, Katina K., Wilhelmsson A et al., (2003). Process-induced changes on bioactive compounds in whole grain rye. Proceedings of the Nutrition Society, 62: 117-122.

Lookhart GL, Albers LD (1988). Correlations between reversed-phase high-performance liquid chromatography and acid- and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic data on prolamins from wheat sister lines differing widely in baking quality. Cereal Chemistry, 65:222-227.

Lopez-Bellido L, Fuentes M, Castillo JE, Lopez-Garrido FJ (1998). Effects of tillage, crop rotation and nitrogen fertilization on wheat-grain quality grown under rainfed Mediterranean conditions. Field Crops Research, 57:265-276.

Macfarlane S, Macfarlane GT, Cummings JH (2006). Prebiotics in the gastrointestinal tract. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 24:701–714.

Maningat CC, Seib PA, Bassi SD, Woo KS, Lasater GD (2009). Wheat starch: production, properties, modification and uses. In: Starch: Chemistry and Technology, Elsevier Inc.

Marotti I, Bregola V, Aloisio I, Di Gioia D, Bosi S, DI Silvestro R, Quinn R, Dinelli G (2012). Prebiotic effect of soluble fibres from modern and old durum-type wheat varieties on Lactobacillus and Bifidobacterium strains. Journal of the Science of Food and Agriculture, DOI:10.1002/jsfa.5597.

Moore J, Hao J (2012). Antioxidant and health promoting properties of wheat (Triticum spp.). In: Cereals and Pulses: Nutraceutical Properties and Health Benefits. First Edition. Edited by Yu L.L., Tsao R., Shashidi F. Wiley-Blackwell, Inc. Oxford, OX4 2DQ.

Moore J, Hao Z, Zhou K, Luther M, Costa J, Yu LL (2005). Carotenoid, Tocopherol, Phenolic Acid, and Antioxidant Properties of Maryland-Grown Soft Wheat. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53:6649-6657.

Muir JG, Yeow EG, Keogh J , Pizzey C , Bird AR, Sharpe K, et al. (2004). Combining wheat bran with resistant starch has more beneficial effects on fecal indexes than does wheat bran alone. The American Journal of Clinical Nutrition, 79:1020–1028.

Murphy PA, Hendrich S, Landgren C, Bryant CM (2006). Food mycotoxins: an update (scientific status summary). Journal of Food Science, 71:51–65.

Okarter N, Liu CS, Sorrells ME, Liu RH (2010). Phytochemical content and antioxidant activity of six diverse varieties of whole wheat. Food Chemistry 119: 249-257.

Pancaldi D, Tonti S, Prodi A, Salomoni D, Dal Prà M, Nipoti P, Alberti I, Pisi A (2010). Survey of the main causal agents of fusarium head blight of durum wheat around Bologna, Northern Italy. Phytopathologia Mediterranea, 49:258-266.

Pomeranz Y, Chung O, Robinson RJ (1966). Lipids in wheat from various classes and varieties. Journal of the American Oil Chemist's Society, 43(8):511-514.

Preston KR, Williams PC (2003). Analysis of wheat flour. Elsevier Science Ltd.: 2543-2550.

Prosky L, Asp NG, Scheweizer TF, de Vries JW, Furda I (1988) Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. Journal of the Association of Analytical Chemistry, 71: 1017-1023.

Quaranta F, Amoriello T, Aureli G, Belocchi A, D'Egidio MG, Fornara M, Melloni S, Desiderio E (2010). Grain Yield, Quality and Deoxynivalenol (DON) Contamination of Durum Wheat (Triticum Durum Desf.): Results of National Networks in Organic and Conventional Cropping Systems. Italian Journal of Agronomy 4: 353-366.

Reboul E, Desmoulins-Malezet C, Richelle M, Pirisi V, Perrot E, Borel P (2008). Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54:8749-8755.

Renaud SC, Gueguen R, Schenker J, d'Houtaud A (1998). Alchool and mortality in middle-aged men from eastern France. Epidemiology, 9: 184-188.

Rharrabti Y, Villegas D, Royo C, Martos-Nunez V, Garcia del Moral LF (2003). Durum wheat quality in Mediterranean environments II. Influence of climatic variables and relationships between quality parameters. Field Crops Research, 80:133-140.

Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, et al. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health b enefits. British Journal of Nutrition, 104:S1-S63.

Rodriguez LH, Afonso Morales D, Rodriguez Rodriguez E, Diaz Romero C (2011). Mineral and trace elements in a collection of wheat landraces from the Canary Islands. Journal of Food Composition and Analysis, 24:1081–1090.

Scheppach W, Luerhs H, Melcher R, Gostner A, Schauber J, Kudlich T, Weiler F, Menzel T (2004). Antiinflammatory and anticarcinogenic effects of dietary fibre. Clinical Nutrition Supplements, 1:51–58.

Shewry PR, Piironen V, Lampi AM, Edelmann M, Kariluoto S, Nurmi T, Fernandez–Orozco R, Ravel C, Charmet G, Andersson AAM, Aman P, Boros D, Gebruers K, Dornez E, Courtin CM, Delcour JJA, Rakszegi M, Bedo Z, Ward JL (2010). The HEALTHGRAIN wheat diversity screen: effects of genotype and environment on phytochemicals and dietary fiber components. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58:9291–9298.

Shewry PR, Popineau Y, Lafiandra D, Belton P (2001). Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the EUROWHEAT project. Trends in Food Science & Technology, 11:433–441.

Sidhu JS, Kabir Y, Huffman FG (2007). Functional foods from cereal grains. International Journal of Food Properties, 10:231-244.

Simmonds DH (1989). Wheat and wheat quality in Australia. Melbourne, CSIRO.

Slavin JL (2004). Whole grains and human health. Nutrition Research Reviews. 17:99-110.

Stauss R (1994). Compendium of growth stage identification keys for mono- and dicotyledoneus plants; Stauss, R. (ed.), Basel.

Stracke BA, Eitel J, Watzl B, Mader P, Rufer CE (2009). Influence of the Production Method on Phytochemical Concentrations in Whole Wheat (Triticum aestivum L.): A Comparative Study. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57:11116-10121.

Suchy J, Lukow 0M, Fu BX (2003). Quantification of monomeric and polymeric wheat proteins and the relationship of protein fractions to wheat quality. Journal of the Science of Food and Agriculture, 83:1083-1090.

Temple NJ (2000). Antioxidant and disease: more questions than answers. Nutritional Research, 20:449-459.

Thompson L.U., (1994). Antioxidant and hormone-mediated health benefits of whole grains. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 34: 473-497.

Vaccari FP, Ranieri R, Matese A, Miglietta F (2007). Enhanced temperature during grain filling reduces protein concentration of durum wheat. Italian Journal of Agronomy, 4:393-400.

Wilson JD, Bechtel DB, Todd TC, Seib PA (2006). Measurement of wheat starch granule size distribution using image analysis and laser diffraction technology. Journal of Cereal Science, 83(3):259-268.

Wolfe MS, Baresel JP, Desclaux D, Goldringer I, Hoad S, Kovacs G, Loschenberger F, Miedaner T, Ostergard H, Lammerts Van Bueren ET (2008) Developments in breeding cereals for organic agriculture. Euphytica, 163:323–346.

Yu L. 2008. Wheat Antioxidants. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NY 07030.

Yu L, Perret J, Harris M, Wilson J, Haley S (2003). Antioxidant Properties of Bran Extracts from “Akron” Wheat Grown at Different Locations. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 51: 1566-1570.

Yu L, Haley S, Perret J, Harris M, Wilson J, Qian M (2002). Free radical scavenging properties of wheat extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50:1619-1624.

Zhao FJ, Su YH, Dunham SJ, Rakszegi M, Bedo Z, McGrath SP, Shewry PR (2009). Variation in mineral micronutrient concentrations in grain of wheat lines of diverse origin. *Journal of Cereal Science*, 49:290–295.

Zuchowski J, Jonczyk K, Pecio L, Oleszek W (2011). Phenolic acid concentrations in organically and conventionally cultivated spring and winter wheat. Journal of the Science of Food and Agriculture, 91:1089-1095.