



**RELAZIONE SULL'ATTIVITA' DI RICERCA FINALIZZATA ALLA SPERIMENTAZIONE  
DAL TITOLO: *“Monitoraggio della qualità chimica, biochimica e nutrizionale di  
farine, integrali e semintegrali, di grani campani biologici e di loro miscele per la  
formulazione di prodotti funzionali e salutistici (SANUS PANEM)”***

Il presente contratto per attività di ricerca finalizzata alla sperimentazione prevede lo svolgimento di diverse fasi di laboratorio con l'obiettivo di monitorare la qualità chimica, biochimica e nutrizionale di farine integrali e semintegrali di grani campani biologici fornite dal committente **“EURO PROGRAM Srl”** e di loro miscele per la formulazione di prodotti funzionali e salutistici (**SANUS PANEM**)”

Le attività prevedono lo studio di farine integrali e semintegrali di grani campani biologici al fine di dare maggior peso alle proprietà di prevenzione delle produzioni cerealicole e del loro impiego in miscele con componenti specifici per lo sviluppo di un sistema modello per la formulazione di prodotti da forno funzionali e salutistici acquistabili, oltre che in appositi rivendite di nicchia, anche presso farmacie locali.

La realizzazione di prodotti da forno funzionali e salutistici verrà effettuata con aggiunte di componenti specifici, molecole bioattive, sia di natura idrofila che lipofila.

Nell'ambito del contratto saranno eseguite le seguenti attività:

Analisi composizionale delle granelle e dei prodotti finiti, umidità, proteine, carboidrati, lipidi, fibra, ceneri mediante indagini analitico-strumentali, valutazione del profilo degli acidi grassi (trigliceridi e acidi grassi), del profilo sterolico, del contenuto di tocoferoli, del profilo proteico, del contenuto di micro e macro elementi nonché di elementi xenobiotici, dei polifenoli totali e specifici e dell'attività antiossidante mediante utilizzo di accurate e sofisticate strumentazioni, tra le quali la cromatografia liquida (HPLC), la gascromatografia (GC), la spettrometria di massa (MS), la spettroscopia di emissione al plasma (ICP) e la spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FTIR), analisi della shelf life e valutazione sensoriale dei prodotti realizzati.



## **Elenco dei campioni forniti da EURO PROGRAM:**

S. Cappelli rimacinato Bio 2018 L2/19  
S. Cappelli farina 1 Bio 2018 L2/19  
S. Cappelli farina 0 2018 L2/19  
Soleio 2017 rimacinato L1/19  
Soleio 2017 farina 1 L1/19  
Soleio 2017 farina 0 L1/19  
Risciola farina 1 2018 L12/18  
Risciola farina 0 2018 L12 /18

## **METODOLOGIE**

### **Analisi delle Proteine**

#### Soluzioni impiegate per il trattamento dei campioni

Sol A: NaCl 0,5 M

Sol B: 80 mM Tris-HCl pH 8,5, 50% isopropanolo, 20 mM DTT

Sol C: 330 mM Tris-HCl pH 7, 2% SDS, 10% glicerolo

Sol D: 25 mM Tris-HCl pH 8,5, 6M urea, 2% SDS

Le prime tre soluzioni hanno lo scopo di separare le proteine solubili (albumine e globuline) dalle insolubili (gliadina e glutenina), mentre la quarta solubilizza tutte le proteine.

Sono, pertanto, stati preparati 3 campioni per ogni tipo di farina.

In totale si ottengono 24 campioni.

#### **Preparazione campioni di proteine solubili.**

150 mg di farina si sospendono in 1,5 ml di soluzione A per 1 ora a temperatura ambiente. Si centrifuga ed il supernatante viene utilizzato per l'analisi delle proteine mediante elettroforesi e per il dosaggio delle proteine.

#### **Preparazione campioni di proteine insolubili.**

Il residuo solido rimasto dalla centrifugazione si sospende in 1,5 ml di soluzione B per 16 ore a temperatura ambiente. Si centrifuga ed al supernatante viene aggiunto acetone freddo. In questo modo si ha la precipitazione delle proteine insolubili. La sospensione si centrifuga ed il residuo solido si solubilizza nella soluzione C.

Tale soluzione viene utilizzata per l'analisi delle proteine mediante elettroforesi e per il dosaggio delle proteine.

#### **Preparazione campioni di proteine totali.**

100 mg di farina si sospendono in 4 ml di soluzione D. La soluzione si bolle per 5 minuti. Si centrifuga ed il supernatante viene utilizzato per l'analisi delle proteine mediante elettroforesi e per il dosaggio delle proteine.

Nota: i surnatanti ottenuti da tutti i campioni sono molto viscosi.



### **Dosaggio delle proteine mediante il saggio Bradford (reattivo Bio-Rad)**

Per la quantificazione delle proteine presenti nei campioni si utilizza una retta di taratura preparata con Albumina di Siero Bovina (standard 0,1% in acqua). Ai campioni diluiti 1:10 si aggiunge il reattivo di Bio-Rad. La reazione è immediata e l'assorbimento del colore blu sviluppato viene letto a 595 nm.

Tutti i 24 campioni sono stati analizzati in triplo (72 campioni totali).

Si riportano di seguito soltanto i risultati riguardanti il contenuto delle proteine solubili in tutti i campioni, poiché le soluzioni usate per la preparazione delle proteine insolubili e delle proteine totali danno interferenza con il saggio.

Il colore che si sviluppa in questi campioni, dopo l'aggiunta del reattivo Bio-Rad, è verde mentre il colore previsto dal saggio varia dal grigio al blu.

Inoltre, sul manuale d'uso del metodo è dichiarata l'interferenza del detergente SDS nel saggio. Poiché questo composto è presente sia nei campioni di proteine insolubili che totali, i risultati ottenuti non vengono considerati attendibili.

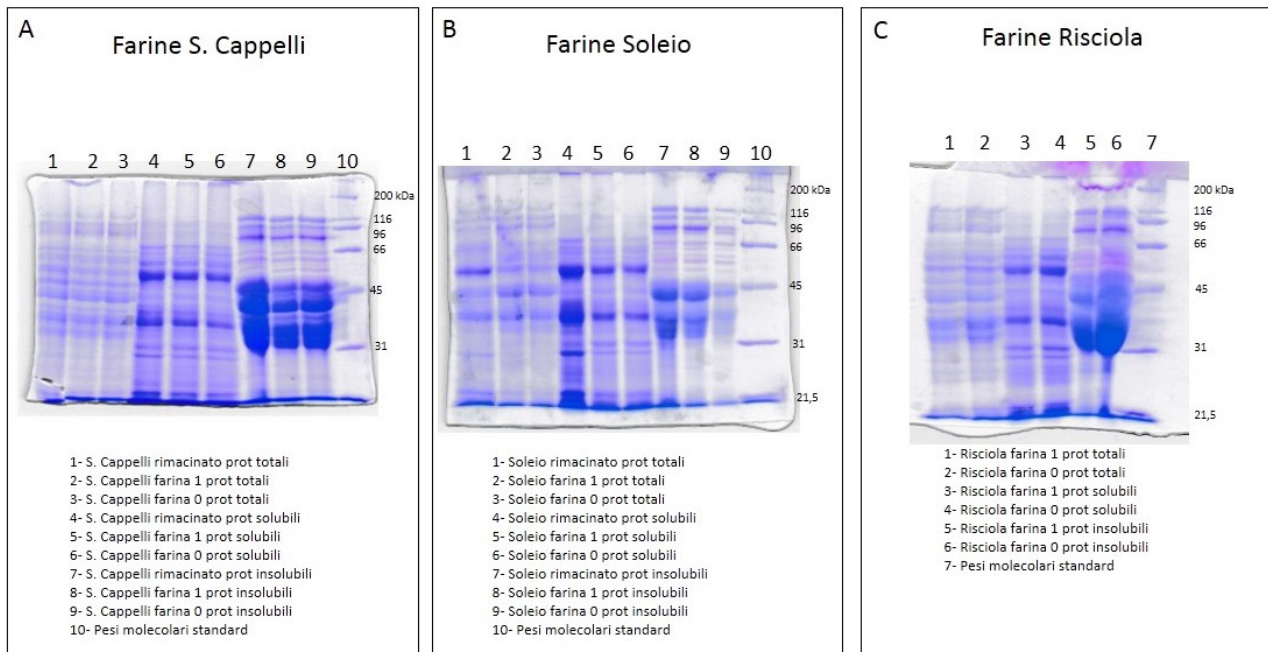
#### **Proteine solubili**

S. Cappelli rimacinato Bio 2018 L2/19	1,5 mg/ml	15,2 mg/g
S. Cappelli farina 1 Bio 2018 L2/19	1,5 mg/ml	15,2 mg/g
S. Cappelli farina 0 2018 L2/19	1,1 mg/ml	11,0 mg/g
Soleio 2017 rimacinato L1/19	2,1 mg/ml	20,8 mg/g
Soleio 2017 farina 1 L1/19	1,1 mg/ml	11,0 mg/g
Soleio 2017 farina 0 L1/19	1,0 mg/ml	9,7 mg/g
Risciola farina 1 2018 L12/18	2,0 mg/ml	19,6 mg/g
Risciola farina 0 2018 L12 /18	2,6 mg/ml	26,5 mg/g



## Elettroforesi di proteine su gel di poliacrilammide

Si esegue un'analisi elettroforetica in condizioni denaturanti in gel dello spessore di 1,0 mm e con percentuale di acrilammide del 10%.



### **Pannello A: farine S. Cappelli**

#### Proteine totali

In tutti e 3 i campioni di farine, la distribuzione delle proteine totali è compresa in un intervallo molto ampio (tra 116,0 e circa 35,0 kDa).

#### Proteine solubili

Nelle proteine solubili sono evidenti due proteine maggioritarie: una a circa 56,0 kDa e l'altra a circa 37,0 kDa.

#### Proteine insolubili

La maggioranza delle proteine insolubili ha un peso molecolare compreso tra circa 47,0 kDa e 31,0 kDa (frazioni a basso peso molecolare).

Il campione della lane 7 (farina rimacinata proteine insolubili) presenta un contenuto della frazione compresa tra 47,0 e 31,0 kDa, superiore a quello delle farine 1 e 0 (lane 8 e 9).

**Cappelli rimacinato: maggior quantità di proteine insolubili.**

### **Pannello B: farine Soleio**

#### Proteine totali

In tutti e 3 i campioni di farine, la distribuzione delle proteine totali è compresa in un intervallo molto ampio (tra 116,0 e circa 35,0 kDa) con una proteina (a circa 56,0 kDa) maggiormente rappresentata nella farina rimacinata (lane 1).

#### Proteine solubili



# Consiglio Nazionale delle Ricerche

## Istituto di Ricerca sugli Ecosistemi Terrestri

Nelle proteine solubili sono evidenti due proteine maggioritarie: una a circa 56,0 kDa e l'altra a circa 37,0 kDa, in tutti e tre i campioni. Tali proteine sono le maggioritarie anche nei campioni di farine S. Cappelli.

### Proteine insolubili

Il profilo proteico è somigliante a quello delle farine S. Cappelli, ma la quantità delle proteine nella frazione a basso peso molecolare (47,0-31,0 kDa) è inferiore. Inoltre, passando dal rimacinato, alla farina 1 e poi alla 0 la quantità di proteine insolubili diminuisce.

**Soleio rimacinato: maggior quantità di proteine solubili e insolubili.**

**Soleio farina 0: poche proteine insolubili.**

### **Pannello C: farine Risciola**

#### Proteine totali

La distribuzione delle proteine totali è assimilabile a quella delle farine Cappelli e Soleio. Il contenuto delle proteine totali nella farina 0 è leggermente superiore a quello della farina 1.

#### Proteine solubili

Anche per le farine Risciola, nelle proteine solubili sono maggiormente evidenti le due proteine a circa 56,0 e 37,0 kDa. E' anche più evidente delle altre, una banda a 31 kDa.

#### Proteine insolubili

Mentre nell'intervallo 116-circa 80 kDa, nelle farine S. Cappelli e Soleio sono evidenti tre bande proteiche, nelle farine Risciola la banda intermedia è molto scarsamente rappresentata. La frazione a basso peso molecolare è maggiore quantitativamente nella farina 0 rispetto alla 1.

Come quantità totale, le proteine insolubili delle farine Risciola si collocano tra le Cappelli e le Soleio.

**Risciola farina 0: maggior quantità di proteine totali e insolubili.**