



Unione europea
Fondo sociale europeo



REGIONE DEL VENETO

**Regione del Veneto
Giunta Regionale
Direzione Formazione e Istruzione**

**RELAZIONE CONSUNTIVA SULL'ATTIVITA' DI RICERCA
(Assegni di ricerca)**

DGR n. 1463 del 08/10/2019

Cod. Ente: 1695 Rag. Sociale Università degli studi di Verona Asse Occupabilità

Cod. progetto 1695-0016-1463-2019 **Titolo** Fortificazione di prodotti da forno con polveri di vinaccia: studio degli effetti tecnologici, sensoriali e nutrizionali

Cod. Intervento 1695/10260512-004/231/DEC/20 **Titolo dell'intervento** CARATTERIZZAZIONE DELLA BIODISPONIBILITÀ DEI POLIFENOLI NEI DIGERITI DI PRODOTTI DA FORNO SPERIMENTALI **Sede** Verona

La sottoscritta **Barbara Simonato**

_____ in qualità di Referente/Tutor per la ricerca

Il sottoscritto **Gianluca Giuberti**

_____ in qualità di Referente/Tutor per la ricerca

con riferimento all' intervento in oggetto,

La sottoscritta **Mariasole Cervini**

_____ in qualità di Destinatario dell'intervento

in oggetto,

DICHIARANO

che l'intervento in oggetto nel **periodo dal 30/09/2020 al 29/09/2021** si è articolato nelle seguenti attività:

Attività:

Valutazione nutrizionale di pane fortificato con vinaccia di uva Corvina, muffin vegani fortificati con vinaccia di Cabernet dopo distillazione e grissini con vinaccia di Cabernet prima della distillazione. Messa a punto di un protocollo per digestione in vitro dei prodotti da forno fortificati sperimentali: pane, muffin vegani e grissini.
Valutazione della bioaccessibilità dei polifenoli nei digeriti di pane fortificato, a seguito di digestione in vitro atta a simulare il processo digestivo umano.
Valutazione delle modifiche a carico del microbiota intestinale in seguito a fermentazione statica in vitro di pane fortificato.
Valutazione dell'indice glicemico dei prodotti da forno sperimentali.

Metodologie operative

È stata effettuata una valutazione nutrizionale del pane, dei muffin e dei grissini fortificati con polvere di vinaccia.

Sono stati valutati: sostanza secca (metodo 930.15), ceneri (metodo 942.05), proteina grezza (metodo 976.05), lipidi grezzi (metodo 954.02).

Il contenuto totale di fibra alimentare (TDF), distinto poi in fibra solubile (SDF) e fibra insolubile (IDF), è stato determinato enzimaticamente (kit di test Megazyme K-TDFR-200A).

Il contenuto in amido totale è stato determinato enzimaticamente (kit di test Megazyme K-TSTA-100).

Il contenuto in glucosio e fruttosio è stato determinato enzimaticamente (kit di test Megazyme K-FRUGL).

I campioni sono stati analizzati in triplicato.

Sono state effettuate digestioni in vitro per ogni tipologia di campione in triplicato.

I campioni che sono stati sottoposti a digestione sono:

- Pane allo 0% - 5% e 10% di vinacce di uva Corvina (GP0 – GP5 – GP10);
- Grissini allo 0% - 5% e 10% di vinacce di Cabernet prima della distillazione (BS0 – BS5 – BS10);
- Muffin allo 0% - 5% e 10% di vinacce di Cabernet dopo distillazione (GM0 – GM5 – GM10);

I campioni sono stati incubati con reagenti e cocktail enzimatici per riprodurre il tratto gastro intestinale, come indica la metodica pubblicata da Minekus et al. (2014), che si basa su un modello di digestione statica tricompartimentale.

Durante la prima fase, denominata fase orale, i campioni sono stati macinati e addizionati ad una soluzione enzimatica, composta da una soluzione salivare simulata e α -amilasi (A3176; Sigma); il tutto è stato incubato in incubatore ad aria a 37°C per 200 rpm per 2 minuti.

Nel secondo passaggio, ovvero la fase gastrica, ai campioni è stata aggiunta una soluzione enzimatica composta da una soluzione gastrica simulata e pepsina (P7000; Sigma). L'incubazione è proseguita alle condizioni precedenti per 120 minuti.

Nell'ultimo step, cioè la fase intestinale, i campioni sono stati addizionati ad una soluzione enzimatica, composta da una soluzione intestinale simulata, pancreatina (P7545-8xUSP; Sigma) ed estratti di bile (B8631; Sigma).

Aliquote di ogni replicato, di ogni campione, sono state rimosse durante la fase gastrica e durante quella intestinale e immagazzinate a -20 °C.

Il destino dei polifenoli dopo ciascuna fase di digestione in vitro è stato valutato mediante cromatografia liquida ad alta prestazione-spettrometria di massa a tempo di volo quadrupolo (UHPLC-ESI/QTOF). Le aliquote liquide raccolte nelle diverse fasi digestive sono state centrifugate (7000 × g; 10 min) e filtrate (0,22 µm). Come fase mobile è stata usata una miscela di acetonitrile e acqua (VWR, Milano, Italia) acidificata con 0,1% di acido formico (v/v). Lo spettrometro di massa è stato usato in modalità di scansione positiva (ESI+) nell'intervallo 100–1200 m/z, iniettando tre replicati da 6 µL.

Il software Agilent Profinder B.06 è stato utilizzato per elaborare le caratteristiche di massa grezze.

Il processo di annotazione è stato eseguito con il database Phenol-Explorer 3.6, con una tolleranza di precisione di massa impostata su 5 ppm.

La bioaccessibilità dei polifenoli è stata calcolata secondo la seguente equazione:

$$\text{Bioaccessibilità} = (\text{PCA}/\text{PCB}) \times 100$$

dove PCA è il contenuto totale della sottoclasse fenolica nel campione (mg/g DM) dopo ogni fase di digestione in vitro, e PCB è la sottoclasse fenolica totale (polifenoli in forma libera e legata) contenuto negli stessi campioni prima della digestione in vitro.

Successivamente, sulla frazione di campione indigerito di pane fortificato con polvere di vinaccia allo 0% - 5% e 10%, è stata condotta una fermentazione statica in vitro con lo scopo di simulare ciò che avviene nel tratto intestinale umano e di studiare se esiste un'interazione delle vinacce aggiunte col microbiota intestinale.

È stata creata una soluzione unendo acqua distillata, soluzione tampone, soluzione macrominorale, soluzione microminorale e soluzione riducente (tampone di Menke); il tutto è stato posto in agitazione per qualche minuto e successivamente incubato in bagnetto termostato a 37°C insufflando CO₂. Questa soluzione è stata poi aggiunta a feci suine per creare il medium fecale utile all'analisi. I campioni indigeriti di pane sono stati quindi uniti al medium fecale; il tutto è stato mantenuto in agitazione (200 rpm) a 40°C. Sono state prelevate aliquote dopo 8, 24 e 48 ore di digestione, e al termine di questa fase i campioni sono stati congelati (-20°C).

Da ciascuna aliquota raccolta (8, 24 e 48 h) il DNA totale è stato estratto utilizzando lo strumento FastPrep®-24 con il FastDNA® Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Santa Ana, California, USA) seguendo il protocollo fornito. La qualità del DNA è stata controllata mediante elettroforesi su gel di agarosio ed è stato utilizzato il saggio di fluorescenza Qubit dsDNA HS (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) per determinare la concentrazione del DNA.

La regione V3-V4 del gene 16S rRNA batterico è stata amplificata utilizzando i primer Pro341F e Pro805R descritti da Takahashi et al (2014). È stato seguito il seguente protocollo PCR: denaturazione iniziale a 94 °C per 1 min, seguita da 25 cicli costituiti da denaturazione (94 °C per 30 secondi), annealing (55 °C per 30 secondi), estensione (68°C per 45 secondi) e una fase finale di estensione a 68 °C per 7 min. Per ogni campione, l'amplificazione del DNA è stata eseguita in duplicato. I prodotti della PCR sono stati purificati tramite sfere Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter, Indianapolis, USA) e combinati in uguale concentrazione molare per generare un pool di librerie. La libreria del gene 16S rRNA è stata sequenziata con letture paired-end 2 × 300 bp sul sistema MiSeq (Illumina).

Dopo che il sequenziamento è stato completato, i dati di sequenziamento sono stati elaborati utilizzando gli strumenti Qiime2 versione 2018.4.

È stata effettuata una valutazione dell'indice glicemico dei prodotti fortificati con polvere di vinaccia; l'analisi prevede di incubare il campione in una miscela tamponata multi-enzimatica che imita il tratto gastro intestinale.

I campioni sono stati macinati con masticatore meccanico manuale per simulare la masticazione, pesati e sottoposti a 3 fasi digestive.

Nella prima fase (fase orale) ai campioni macinati è stata aggiunta una soluzione salivare simulata contenente α -amilasi (Amylase, Sigma A3176) e sono stati incubati a 37°C x 200 rpm per 5 minuti.

Nel secondo passaggio (fase gastrica) ai campioni è stata aggiunta una soluzione a base di HCl 0,05N con pepsina (Pepsin, Sigma P7000) e sono stati incubati per altri 30 minuti.

Nell'ultima fase (fase intestinale) ai campioni è stata aggiunto un tampone acetato pH 5.2 e sono state prelevate le prime aliquote di digerito (T0) conservate in etanolo assoluto. Successivamente è stata aggiunta ai campioni la soluzione intestinale finale, contenente pancreatina (Pancreatine from porcine pancreas, sigma P-7545), amiloglicosidasi (Amyloglucosidase from aspergillus niger, sigma A-7095) e invertasi (Invertase, sigma 14504, Grade VII).

I campioni sono rimasti in incubazione a 37 °C x 200 rpm per un totale di 180 minuti e con prelievi effettuati a 30, 60, 120 e 180 minuti sempre in etanolo assoluto.

Per determinare il quantitativo di glucosio liberato ad ogni tempo di prelievo, è stato utilizzato come reagente il GODPOD (GLUCOSIO SL, Giese Diagnostics srl) e utilizzando per la lettura spettrofotometrica il platereader (mettere modello), pre incubando a 40°C per 20 minuti e leggendo i campioni con una lunghezza d'onda di 510 nm.

Risultati

Nei campioni di pane, il contenuto in proteina grezza e in zucchero libero sono risultati simili tra GP0, GP5 e GP10. Al contrario, l'inclusione di un livello più elevato di polvere di vinaccia (GPP) ha causato una diminuzione del contenuto totale di amido e un aumento del contenuto totale di fibre alimentari. Il pane GP10 può essere considerato un prodotto alimentare ad alto contenuto in fibra alimentare, avente un contenuto di TDF superiore a 6 g/100 g.

Nel muffin vegano formulato con un livello crescente di GPP di Cabernet dopo distillazione, le ceneri, TDF, IDF e SDF sono aumentate mentre il contenuto totale di amido e zucchero è diminuito di conseguenza al livello di inclusione di GPP nella ricetta.

Queste differenze sono legate alla composizione chimica degli ingredienti selezionati nonché al loro livello nella ricetta.

L'aumento del contenuto di ceneri è correlato al contenuto di macro e microelementi della GPP.

GM5 e GM10 sono caratterizzati da un maggiore contenuto di TDF rispetto al controllo (GM0).

GM10 può essere rivendicato come "fonte di fibra alimentare" poiché contiene più di 3 g/100 g di TDF.

Infine, non sono state rilevate differenze nel contenuto di proteine e grassi.

Nei grissini il contenuto di lipidi e ceneri aumenta con l'aumentare del livello di GPP nella formulazione. La sostituzione della farina di frumento con diverse quantità di GPP ha causato una riduzione del contenuto di proteine grezze e di amido totale nei campioni BS5 e BS10 rispetto a BS0. Anche il contenuto totale di TDF è aumentato. Di conseguenza, il campione BS10 può essere ritenuto ad "alto contenuto di fibre", in quanto contiene più di 6 g/100 g di TDF. La quota più rilevante di TDF nei grissini fortificati con GPP è rappresentata dalla frazione IDF circa il 70% del totale.

A seguito dell'inclusione di diversi livelli di vinaccia nel pane, il profilo QTOF-UHPLC ha permesso di osservare una grande abbondanza di flavonoidi e acidi fenolici.

Tra i flavonoidi, gli antociani, i flavonoli e i flavan-3-oli potrebbero essere considerati come marker dell'aggiunta di GPP.

Sono stati analizzati anche i cambiamenti nel profilo fenolico del pane allo 0% - 5% e 10% di vinacce di uva Corvina durante le fasi digestive.

La bioaccessibilità del composto fenolico può essere influenzata da interazioni tra fibra alimentare e gli altri componenti che caratterizzano la matrice alimentare come lipidi e proteine. Pertanto, i composti fenolici hanno mostrato diversi trend di bioaccessibilità, imposti principalmente dalla diversa percentuale di fibra in ogni campione di pane. È stato riscontrato che la bioaccessibilità degli antociani aumenta sia nel pane GP5 che nel pane GP10 quando si passa dalla fase gastrica a quella intestinale.

Si potrebbe ipotizzare che un contenuto maggiore in fibra alimentare determini un importante effetto vettore di antociani nell'intestino, a causa delle interazioni tra fibra e antociani, aumentando così la loro potenziale bioaccessibilità nel colon. L'inclusione di GPP ha determinato una maggiore bioaccessibilità dei flavoni dopo la fase intestinale per GP5 e GP10 rispetto al controllo, mentre GP5 ha mostrato la più alta bioaccessibilità dei restanti flavonoidi. Il campione GP5 ha mostrato anche un alto valore di bioaccessibilità per i composti a basso peso molecolare. Infine, valori di bioaccessibilità simili sono stati registrati per gli acidi fenolici quando si considera la fase intestinale. Questi risultati hanno mostrato che i valori di bioaccessibilità percentuale relativamente elevati osservati alla fine della fase intestinale per alcune classi fenoliche (es. antociani, flavoni, e tirosolo equivalenti) potrebbero promuovere un ambiente antiossidante nel tratto digestivo.

È stato osservato un profilo fenolico completamente diverso confrontando GP5 e GP10 con il controllo (GP0), sia a livello gastrico sia a livello intestinale.

Non è stata valutata la bioaccessibilità dei polifenoli nei grissini e nei muffin a causa di problemi legati alla strumentazione; non è stato possibile procedere con questa parte delle analisi entro i termini del progetto.

Per quanto riguarda i risultati microbiologici, non è emersa alcuna differenza significativa tra i diversi campioni presi in considerazione, per cui si può dedurre che l'utilizzo di polvere di vinaccia nei prodotti da forno sperimentali non abbia effetto, positivo o negativo, nel modulare il microbiota intestinale.

L'indice di idrolisi (HI) può essere utilizzato per calcolare un indice glicemico previsto (pGI); in generale, i campioni di pane fortificato sono caratterizzati da alti valori di HI e pGI.

Sia i valori HI che pGI hanno mostrato una diminuzione in seguito all'inclusione progressiva di GPP nel pane.

Questo può essere correlato a cambiamenti nella composizione chimica, ma anche alle possibili interazioni tra i diversi costituenti all'interno della matrice alimentare. In particolare, alcuni dei granuli di amido potrebbero subire una limitata gelatinizzazione dell'amido, a causa del contenuto di fibre alimentari della GPP, che può competere con amido per l'assorbimento dell'acqua e/o incapsulare l'amido durante i trattamenti idrotermici.

Il profilo fenolico della GPP potrebbe ridurre la digeribilità dell'amido in vitro, inibendo gli enzimi responsabili dell'idrolisi dell'amido e/o attraverso interazioni non covalenti con l'amido durante la cottura, portando alla formazione di complessi di amido meno accessibili agli enzimi.

Sede di svolgimento dell'attività

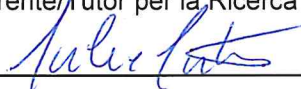
- Università degli studi di Verona – Dipartimento di Biotecnologie
- Università Cattolica del Sacro Cuore (sede di Piacenza) – DISTAS
- Smart working da domicilio assegnista

Verona, 29/09/2021

Firma del Destinatario



Firma del Referente/Tutor per la Ricerca
(Dott. Giuberti)



Firma del Responsabile di progetto
(Prof.ssa Simonato)





Unione europea
Fondo sociale europeo



REGIONE DEL VENETO

Regione del Veneto
Giunta Regionale
Direzione Formazione e Istruzione

ABSTRACT DI RICERCA
(intervento assegni di ricerca)

DGR n. 1463 del 08/10/2019

Cod. Ente: 1695 Rag. Sociale Università degli studi di Verona Asse Occupabilità

Titolo progetto Fortificazione di prodotti da forno con polveri di vinaccia: studio degli effetti tecnologici, sensoriali e nutrizionali

cod. 1695-0016-1463-2019 COD. CUP: B35J19001640002

Cod. Intervento 1695/10260512-004/231/DEC/20

Titolo dell'intervento: CARATTERIZZAZIONE DELLA BIODISPONIBILITÀ DEI POLIFENOLI NEI DIGERITI DI PRODOTTI DA FORNO SPERIMENTALI

Relativamente all'intervento in oggetto che si è svolto nel **periodo dal 30/09/2020 al 29/09/2021** viene riportato un breve abstract sull'attività di ricerca svolta:

È stata effettuata una valutazione nutrizionale del pane, dei muffin e dei grissini fortificati con polvere di vinaccia. Per caratterizzare la bioaccessibilità dei polifenoli nei campioni, sono state effettuate digestioni in vitro per ogni tipologia di campione in triplicato. Il destino dei polifenoli dopo ciascuna fase di digestione in vitro è stato valutato mediante UHPLC-ESI/QTOF. Sulla frazione di campione indigerito di pane fortificato con polvere di vinaccia, è stata condotta una fermentazione statica in vitro con lo scopo di simulare ciò che avviene nel tratto intestinale umano e di studiare se esiste un'interazione delle vinacce aggiunte col microbiota intestinale. È stata effettuata una valutazione dell'indice glicemico di tutti i campioni.

Nei campioni di pane, il contenuto in proteina grezza e in zucchero libero sono risultati simili tra il controllo e i campioni con polvere di vinaccia. L'inclusione di un livello più elevato di polvere di vinaccia ha causato una diminuzione del contenuto totale di amido e un aumento del contenuto totale di fibre alimentari.

Nel muffin vegano formulato con un livello crescente di polvere di vinaccia, le ceneri e la fibra totale sono aumentate. Non sono state rilevate differenze nel contenuto di proteine e grassi.

Nei grissini il contenuto di lipidi e ceneri aumenta con l'aumentare del livello di polvere di vinaccia nella formulazione. La sostituzione della farina di frumento con diverse quantità di polvere di vinaccia ha causato una riduzione del contenuto di proteine grezze e di amido totale nei campioni rispetto al controllo. Anche il contenuto totale di TDF è aumentato.

Il profilo QTOF-UHPLC ha permesso di osservare una grande abbondanza di flavonoidi e acidi fenolici. I composti fenolici hanno mostrato diversi trend di bioaccessibilità, imposti principalmente dalla diversa percentuale di fibra in ogni campione. È stato riscontrato che la bioaccessibilità degli antociani aumenta quando si passa dalla fase gastrica a quella intestinale.

Per quanto riguarda i risultati microbiologici, non è emersa alcuna differenza significativa tra i diversi campioni presi in considerazione, per cui si può dedurre che l'utilizzo di polvere di vinaccia nei prodotti da forno sperimentali non abbia effetto, positivo o negativo, nel modulare il microbiota intestinale.

Sia i valori HI che pGI hanno mostrato una diminuzione in seguito all'inclusione progressiva di polvere di vinaccia nel pane.

Verona , 29/09/2021

Firma del Destinatario (assegnista) Marionela Cecchi

Firma del Referente per la ricerca (Dott. Giuberti) Adriano Giuberti

Firma del responsabile di progetto
(prof.ssa Simonato) Barbara Simonato