

Caratterizzazione dei polisaccaridi dell'orzo

I β -glucani sono polisaccaridi lineari composti da catene di residui di glucosio polimerizzati attraverso legami β -(1-4) e β -(1-3). I legami β -(1-4) possono ripetersi da due a quattro volte consecutivamente, mentre i legami β -(1-3) sono presenti singolarmente. In altre parole, la struttura è composta maggiormente da unità di cellotriosio e cellotetraosio legate da legami β -(1-3). Il resto della struttura (5-10%) è composta da blocchi più lunghi formati da unità di glucosio (da 5 a 15) legate tramite legami β -(1-4) (Wood et al., 1994; Johansson et al., 2004).

L'orzo è uno dei cereali più ricchi in β -glucani. Infatti, il loro contenuto varia, secondo fattori genetici e ambientali, dal 2,5% all'11,3%. Rispetto ad altri cereali, la quantità di β -glucani nell'orzo è superiore a quella di avena (2,2-7,8%), segale (1,2-2,0%) e frumento (0,4-1,4%). All'interno dell'orzo si trovano principalmente nelle pareti cellulari dell'endosperma amidaceo (70-80%) e in minore percentuale nello strato aleuronico e negli strati più esterni della cariosside. Per questo motivo gli orzi senza glumelle (*hull-less barley*) hanno un contenuto più elevato in β -glucani. Inoltre, varietà particolari, ad esempio le varietà "waxy", che contengono amido principalmente composto da amilopectina, ne sono maggiormente ricchi (Izydorczyk e Dexter, 2008).

Gli arabinoxilani, invece, sono formati da residui di xilosio legati insieme da legami β -(1-4) e sostituiti generalmente in posizione O-2, O-3, o entrambe, da residui di arabinosio. Inoltre l'arabinosio può legare in diverse posizioni, residui di acido p-cumarico o ferulico. In genere, il rapporto tra arabinosio e xylosio negli arabinoxilani dell'orzo è di circa 0,6. Rispetto ad altri cereali, la quantità di arabinoxilani nell'orzo è generalmente inferiore a quella della

* Centro di Eccellenza per la Ricerca sulla Birra, Università degli Studi di Perugia

segale (7,6-12%), ma superiore a quella di avena (2,7-3,5%), sorgo (1,8%) e riso (2,6%) (Izydorczyk e Dexter, 2008). Infatti, alcune varietà, possono arrivare a contenere intorno al 12% di questi composti (Holtekjølén et al., 2006). Essi si ritrovano principalmente nello strato aleuronico (67-71%) e in minor quantità nelle pareti cellulari dell'endosperma.

Sia i β -glucani che gli arabinoxilani sono "non-starch polysaccharides (NSP)", cioè polisaccaridi non amidacei e sono molto conosciuti in ambito nutrizionale come ingredienti funzionali per le loro proprietà prebiotiche. Infatti, l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) li ha inseriti tra le fonti di fibra alimentare e ne ha riconosciuto le proprietà benefiche per la salute umana. Nello specifico, è stato scientificamente provato che i β -glucani dell'orzo e dell'avena hanno effetti significativi sull'abbassamento del colesterolo nel sangue, con conseguente diminuzione dei fattori di rischio che possono portare all'insorgenza di malattie coronariche (EFSA, 2011a). Inoltre, lo stesso panel scientifico che ha condotto lo studio, ha suggerito che il consumo di almeno 3 grammi al giorno di β -glucani, come parte di una dieta a basso contenuto di grassi saturi e di uno stile di vita sano, può promuovere la salute cardiovascolare. Nello stesso anno è stato pubblicato un parere dell'EFSA anche per gli arabinoxilani. Infatti, diversi sono stati gli studi per verificare gli effetti di questi polimeri sull'aumento del senso di sazietà, sulla capacità di ridurre i problemi di stitichezza e sulla riduzione della glicemia. Proprio riguardo l'ultimo punto è stata confermata una relazione causa-effetto tra il consumo di arabinoxilani e l'abbassamento della risposta glicemica post-prandiale (EFSA, 2011b). Il panel scientifico ha concluso che il quantitativo necessario da assumere nell'arco della giornata per avere tale effetto è di 8g di fibre ricche in arabinoxilani; di cui, questi, devono essere circa il 60%. Il controllo della glicemia attraverso un'alimentazione fortificata con arabinoxilani permette inoltre di prevenire l'obesità, il diabete e le patologie a essi correlate.

Dall'affermazione degli effetti benefici, è scaturito un forte interesse verso la produzione di alimenti funzionalizzati con β -glucani e arabinoxilani, confermato dalla crescente diffusione di pubblicità mediatiche riguardanti soprattutto pasta e prodotti da forno.

Anche se non sono chiari i meccanismi con cui questi polimeri possano avere effetti sulla salute umana, l'attenzione è rivolta allo studio delle loro proprietà reologiche, alla loro capacità di aumentare notevolmente la viscosità delle soluzioni e di formare gel (Lazaridou, 2003).

Oltre all'aspetto nutrizionale e salutistico, β -glucani e arabinoxilani sono oggetto di studio anche nell'ambito delle tecnologie alimentari, soprattutto nei processi di produzione di malto e birra. Nel settore birrario, infatti, questi

polimeri sono ben conosciuti per i problemi che possono creare durante i processi di filtrazione di mosto e birra, proprio a causa delle loro proprietà reologiche e del loro quantitativo. Perciò, il loro contenuto viene monitorato già a partire dall'orzo in modo da selezionare le varietà migliori e poi nel malto, per sapere se il relativo mosto avrà problemi di filtrazione oppure no. Infatti, mosti prodotti da malti poco modificati potrebbero avere un contenuto di β -glucani eccessivo con conseguenze negative in termini di velocità di filtrazione di mosto e birra e di resa in estratto (Jonkova e Surleva, 2013). Molto spesso si correla la presenza di β -glucani con la viscosità del mosto, che viene utilizzata come parametro predittivo per la futura filtrazione (Sadosky e Schwartz, 2002). Negli ultimi anni lo studio si è intensificato, poiché non è stato finora possibile definire una correlazione tra il quantitativo di β -glucani nel malto e nel mosto con la filtrabilità. A tal proposito l'attenzione si è spostata sull'analisi delle proprietà molecolari di questi polimeri per caratterizzarli, in termini di peso molecolare, struttura, conformazione, stato di aggregazione, viscosità intrinseca e dimensioni molecolari (Marconi et al., 2014). Oltretutto, problemi che spesso vengono attribuiti alla presenza di β -glucani potrebbero in realtà essere causati dagli arabinoxilani, poiché il loro contenuto nell'orzo è molto maggiore dei β -glucani. Tra l'altro, mentre i β -glucani vengono degradati a opera degli enzimi endogeni durante il maltaggio, gli arabinoxilani subiscono una degradazione molto meno marcata, restando inalterati nel malto finale e conseguentemente nel mosto e nella birra (Lee e Bamforth, 2009). Infatti, uno studio effettuato da alcuni ricercatori americani su diversi campioni di birra commerciale ha mostrato che il quantitativo di arabinoxilani è dieci volte superiore a quello dei β -glucani (Schwartz e Han, 1995).

Vista l'importanza di questi polimeri, sia in campo alimentare che birrario, il Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali (DSA3) e il Centro di Eccellenza per la Ricerca sulla Birra (CERB) dell'Università degli Studi di Perugia, sono impegnati da anni nello sviluppo di ricerche in ambito di cereali e prodotti a base di cereali arricchiti in β -glucani e arabinoxilani e studiano metodi per l'analisi chimica di questi composti anche nel processo di produzione della birra.

Il metodo analitico maggiormente utilizzato per l'analisi del contenuto totale di β -glucani in orzo, malto, mosto e birra e nei prodotti da forno, viene fornito dalla ditta Megazyme International sotto forma di kit enzimatico approvato da EBC, AOAC, AAOC e ICC. Il metodo, basato sulla procedura di McCleary e Glennie-Holmes (McCleary e Glennie-Holmes, 1985), permette di determinare il contenuto totale di questi composti nelle diverse matrici so-

lide e liquide. Brevemente, il metodo consiste nell'estrazione preliminare dei β -glucani dal campione di partenza e la loro successiva degradazione in glucosio per mezzo dell'aggiunta di enzimi specifici (lichenase e β -glucosidase). Successivamente quest'ultimo viene fatto reagire quantitativamente con un colorante specifico, fornito con il kit, per produrre un composto di colore rosso/rosa che viene analizzato allo spettrofotometro. Dall'assorbanza del prodotto di reazione si risale alla concentrazione iniziale di β -glucani che può essere espressa come percentuale su sostanza secca, per le matrici solide, oppure in milligrammi per litro, se il campione da analizzare è liquido.

A differenza dei β -glucani, non esiste un metodo quantitativo per l'analisi rapida di arabinosilani nei campioni di interesse. Infatti, in letteratura sono state pubblicate diverse metodiche per l'analisi di questi composti, che coinvolgono l'uso di diverse tecniche analitiche e strumentali (Englyst et al., 1982; Douglas, 1981). Molto spesso queste metodiche prevedono una fase preliminare di rimozione delle interferenze tramite etanolo puro o etanolo acquoso e la successiva estrazione acquosa dei polimeri. Durante l'estrazione vengono solubilizzate anche sostanze interferenti, come amido, destrine e proteine, che molto spesso vengono rimosse attraverso l'addizione di enzimi addetti alla loro demolizione (α -amilasi, amiloglucosidasi e pancreatina), prima di procedere con la precipitazione selettiva delle sostanze d'interesse e la successiva analisi strumentale.

Presso il DSA3 è in corso l'implementazione di un metodo analitico basato sulle suddette procedure per la determinazione di arabinosilani dalle matrici d'interesse, che prevede l'idrolisi acida degli estratti di arabinosilani in arabinosio e xilosio. Successivamente, lo xilosio viene fatto reagire con phloroglucinol secondo il metodo di Douglas (1981) per la determinazione spettrofotometrica.

Oltre alla determinazione del contenuto totale di β -glucani e arabinosilani è importante conoscere la dimensione di questi polimeri, il loro peso molecolare e quindi le diverse frazioni che compongono il polimero, le la viscosità intrinseca e tutte le altre proprietà molecolari di cui è già stata citata l'importanza. A questo scopo, presso il DSA3, è stato sviluppato un metodo per l'estrazione di β -glucani di orzo e malto e la successiva caratterizzazione tramite cromatografia a esclusione molecolare ad alte prestazioni (HPSEC) accoppiata con triplo detector (Marconi et al., 2014) (fig. 1).

Il metodo è stato anche impiegato, con ottimi risultati, all'interno di alcune ricerche attualmente in fase di ottimizzazione, per la caratterizzazione dei β -glucani solubili da sfarinati e prodotti da forno. La cromatografia a esclusione molecolare permette di separare i polimeri in base al loro raggio idrodi-

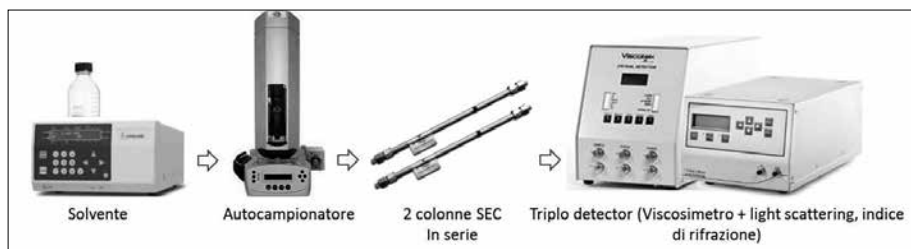
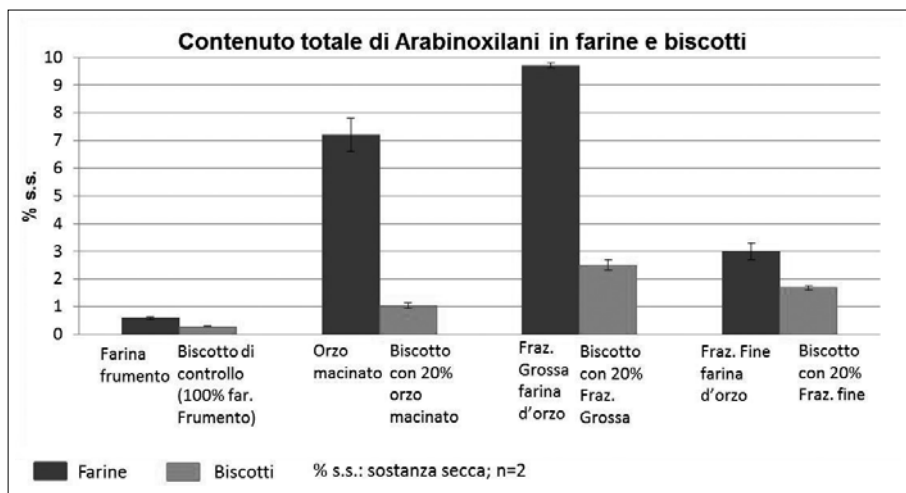


Fig. 1 Schema di un sistema HPSEC con triplo detector

namico. Le sostanze vengono fatte fluire attraverso un sistema HPLC in cui le colonne cromatografiche separano i composti secondo le loro dimensioni. La fase stazionaria porosa all'interno delle colonne permette alle molecole più grandi di passare attraverso gli spazi interstiziali, mentre le molecole piccole passano attraverso i pori allungando il tragitto. Questo sistema permette di ottenere un profilo cromatografico (cromatogramma) in cui le molecole più grandi eluiscono con un tempo di ritenzione minore rispetto a quelle piccole. Le molecole raggiungono successivamente il triplo detector composto da indice di rifrazione, viscosimetro e light scattering detector. I tre strumenti misurano in maniera assoluta la concentrazione, la viscosità intrinseca e il peso molecolare. Inoltre l'elaborazione software dei segnali permette di estrapolare ulteriori informazioni che riguardano la diverse frazioni di peso molecolare, la struttura e la forma del polimero in soluzione e il grado di ramificazione.

Le metodiche messe a punto vengono attualmente impiegate presso il DSA3 all'interno di due grandi aree di ricerca che riguardano la *produzione di biscotti con sfarinati arricchiti in β -glucani e arabinoxilani* e lo *studio del comportamento dei polisaccaridi non amidacei nel processo produttivo della birra* in collaborazione con altre Università del centro Italia, con aziende del settore e con il CERB.

L'area tematica che riguarda i prodotti da forno parte da uno screening varietale di orzi zootecnici coltivati nel campo sperimentale di Papiano (PG) dell'Università degli Studi di Perugia, al fine di selezionare le varietà più ricche in β -glucani e arabinoxilani da impiegare, come sfarinati, nella formulazione di biscotti a elevato valore nutrizionale. Inoltre, le varietà più adatte allo scopo vengono sottoposte a frazionamento, tramite classificazione ad aria, per ottenere sfarinati arricchiti in β -glucani e arabinoxilani da impiegare nelle formulazioni. È prevista anche la realizzazione su scala pilota e pre-industriale dei migliori prototipi realizzati in laboratorio. I primi prototipi sono già stati realizzati utilizzando una varietà di orzo *Lutece*, a elevato contenuto di β -glucani e arabinoxilani (4,2% e 7,2% rispettivamente) e confrontati con un

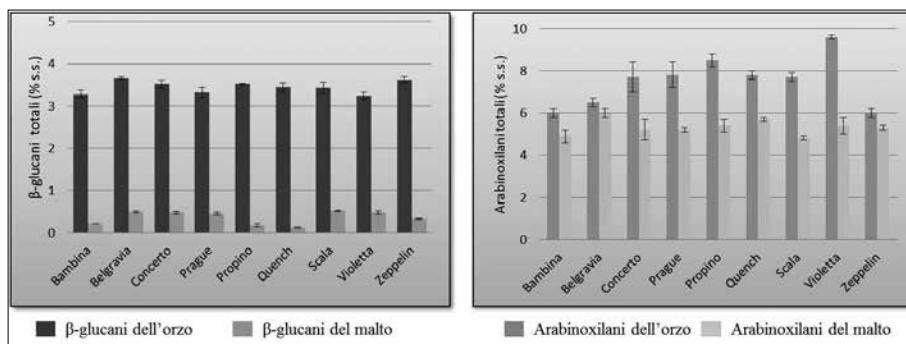


Graf. 1 *Contenuto totale di arabinoxilani in farine, frazioni ottenute tramite classificazione ad aria (fraz. Grossa e fraz. Fine) e nei biscotti formulate con il 20% di sfarinati*

biscotto realizzato con farina di frumento preso come riferimento. Nel grafico 1 vengono riportati i risultati relativi agli arabinoxilani (Falconi, 2015).

Dai primi risultati è stato possibile osservare un netto aumento del contenuto di β -glucani e arabinoxilani sostituendo il 20% della farina di frumento con quella di orzo. Inoltre, da un primo bilancio di massa si è notato che il quantitativo di questi polimeri viene conservato alla fine del processo produttivo, senza perdite durante la lavorazione e la cottura. A seguito di questi risultati è stato possibile realizzare biscotti altamente funzionali, utilizzando, al posto della farina di orzo, sfarinati precedentemente arricchiti con tecniche ad aria. In questo contesto prende importanza anche la caratterizzazione dei β -glucani e arabinoxilani nei biscotti finiti per ottenere informazioni sulle loro proprietà molecolari, oltre che alla quantità, al fine di migliorare il processo produttivo e preservare le proprietà correlate con gli effetti salutistici già evidenziati.

D'altro canto, in ambito birrario si è cercato di selezionare le varietà di orzo che offrono un minore contenuto di β -glucani e arabinoxilani, in modo da prevenire futuri problemi di filtrazione di mosto e birra. Lo studio è stato condotto su varietà di orzo coltivate nel campo sperimentale di Papiano (PG) dell'Università degli Studi di Perugia, delle quali 9 su 10 hanno mostrato un'ottima attitudine alla maltazione e sono state maltate presso l'impianto di micromalteria del CERB. Dall'analisi di β -glucani e arabinoxilani di orzi e malti corrispondenti sono emerse differenze sostanziali nel comportamento



Graf. 2 *Contenuto di β -glucani e arabinosilani in 9 varietà di orzo e nei corrispondenti malti espresso come percentuale su sostanza secca (media di 3 repliche)*

di questi due polimeri durante il maltaggio come riportato nel grafico 2 (Tomasi, 2015).

Innanzitutto è stato possibile confermare, in accordo con i dati di letteratura, che il contenuto di arabinosilani è generalmente maggiore di quello dei β -glucani. Inoltre si è visto che il comportamento dei due polimeri è diverso durante il maltaggio. Infatti, come atteso, è stato confermato che i β -glucani diminuiscono notevolmente, a seguito dell'azione degli enzimi endogeni che si sviluppano durante il maltaggio, mentre gli arabinosilani diminuiscono lievemente, evidenziando anche un differente comportamento degli enzimi addetti alla loro demolizione. Tramite l'analisi HPSEC degli estratti è stato possibile evidenziare che il processo di germinazione ha grande effetto anche sulle caratteristiche molecolari dei β -glucani (Marconi et al. 2014). Infatti, tempi di germinazione maggiori portano alla ulteriore diminuzione del contenuto e del peso molecolare dei β -glucani, con conseguente abbassamento delle dimensioni idrodinamiche e della viscosità intrinseca. Osservando le frazioni a diverso peso molecolare ottenute dal triplo detector si è visto che le frazioni di β -glucani a medio e alto peso molecolare (tra 100kDa e 400kDa e maggiori di 400kDa rispettivamente) diminuiscono a seguito del maltaggio, mentre le frazioni di arabinosilani a medio ed elevato peso molecolare si conservano nel malto finale. Inoltre, il triplo detector ha evidenziato una conformazione flessibile di tipo random coil per i β -glucani ($0,5 < \alpha < 0,8$), ma più rigida per gli arabinosilani ($\alpha > 0,8$), che mostrano anche maggiore raggio idrodinamico e viscosità intrinseca (dati non riportati). Questi risultati suggeriscono che gli arabinosilani potrebbero essere maggiormente responsabili di problemi spesso attribuiti ai β -glucani. Studi futuri riguarderanno le performance in fase di filtrazione dei mosti ottenuti dai malti, con l'obiettivo

di capire quale dei due polimeri ha maggiore effetto sulla filtrabilità e quali proprietà sono maggiormente coinvolte in questo processo.

RIASSUNTO

β -glucani e arabinoxilani sono i maggiori polisaccaridi non amidacei dell'orzo di grande interesse in campo alimentare e salutistico, ma anche in campo birrario. Recentemente sono stati inseriti dall'EFSA (European Food Safety Authority) tra le fonti di fibra solubile e sono stati accertati i loro benefici alla salute umana. In ambito birrario, invece, vengono spesso correlati con problemi di filtrazione di mosto e birra. Le relazioni causa-effetto di questi polimeri sono spesso associate alle loro proprietà, oltre che al contenuto, per cui la loro caratterizzazione, in termini di peso molecolare, struttura, conformazione, stato di aggregazione, viscosità intrinseca e dimensioni molecolari, è di grande interesse.

ABSTRACT

β -glucans and arabinoxylans are the main barley non-starch polysaccharides of great interest in the food and healthy, but also in brewing. They have recently been incorporated by EFSA among the sources of soluble fiber and their benefits to human health are verified. On the other hand, they are often related to wort and beer filtration problems in brewing. The cause-effect relationships of these polymers are often associated to their properties, in addition to the content, and thus, the characterization in terms of molecular weight, structure, conformation, state of aggregation, intrinsic viscosity and molecular size is of great interest.

BIBLIOGRAPHY

- DOUGLAS S.G. (1981): *A rapid method for the determination of pentosans in wheat flour*, «Food Chemistry», 7, pp. 139-145.
- EFSA (2011a): *Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to barley beta-glucans and lowering of blood cholesterol and reduced risk of (coronary) heart disease pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006*, «EFSA Journal», 9 (12), p. 2470.
- EFSA (2011b): *Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to arabinoxylan produced from wheat endosperm and reduction of post-prandial glycaemic responses (ID 830) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006*, «EFSA Journal», 9 (6), p. 2205.
- ENGLYST H., WIGGINS H. S., CUMMINGS J. H. (1982): *Determination of the Non-starch polysaccharides in Plant Foods by Gas- Liquid Chromatography of Constituent Sugars as Alditol Acetates*, «Analyst», 107, pp. 307-318.
- FALCONI C. (2015): *Innovative bakery products using flour with high nutritional properties*,

- Proceedings Books of XX Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science, Technology and Biotechnology, ISBN: 978-88-99407-02, pp 143-144.
- HOLTEKJØLEN A.K., UHLEN A.K., BRÅTHEN E., SAHLSTRØM S., KNUTSEN S.H. (2006): *Contents of starch and non-starch polysaccharides in barley varieties of different origin*, «Food Chemistry», 94, pp. 348-358.
- IZYDORCZYK M.S., J.E. DEXTER (2008): *Barley β -glucans and arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products – a Review*, «Food Research International», 41, pp. 850-868.
- JOHANSSON L., TUOMAINEN P., YLINEN M., EKHOLM P., VIRKKI L. (2004): *Structural analysis of water-soluble and -insoluble β -glucans of whole-grain oats and barley*, «Carbohydrate Polymers», 58, pp. 267-274.
- JOHANSSON L., TUOMAINEN P., YLINEN M., EKHOLM P., VIRKKI L. (2004): *Structural analysis of water-soluble and -insoluble β -glucans of whole-grain oats and barley*, «Carbohydrate Polymers», 58, pp. 267-274.
- JONKOVA G., SURLEVA A. (2013): *Impact of polysaccharides of malt on filterability of beer and possibilities for their reduction by enzymatic additives*, «Journal of Chemical Technology and Metallurgy», 48 (3), pp. 234-240.
- LAZARIDOU A., BILIADERIS C. G., IZYDORCZYK M. S. (2003): *Molecular size effects on rheological properties of oat β -glucans in solution and gels*, «Food Hydrocolloids», 17, pp. 693-712.
- MARCONI O., TOMASI I., DIONISIO L., PERRETTI G., FANTOZZI P. (2014): *Effects of malting on molecular weight distribution and content of water-extractable β -glucans in barley*, «Food Research International», 64, pp. 677-682.
- MCCLEARY B.V., GLENNIE-HOLMES M. (1985): *Enzymic quantification of (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 4)- β -D-glucan in barley and malt*, «Journal of the Institute of Brewing», 91, pp. 285-295.
- SADOSKY P., SCHWARTZ P.B. (2002): *Effect of arabinoxylans, β -glucans and Dextrins on the Viscosity and Membrane Filterability of a Beer Model Solution*, «Journal of the American Society of Brewing Chemists», 60 (4), pp. 153-162.
- SCHWARZ P. B., HAN J.-Y. (1995): *Arabinoxylan content of commercial beers*, «Journal of the American Society of Brewing Chemists», 53 (4), pp. 157-159.
- TOMASI I. (2015): *Behavior of non-starch polysaccharides during malting and brewing*, Proceedings Books of XX Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science, Technology and Biotechnology, ISBN: 978-88-99407-02, pp. 206-207.
- WOOD P.J., WEISZ J., BLACKWELL B.A. (1991): *Molecular characterization of cereal β -D-glucans. Structural analysis of oat β -D-glucan and rapid structural evaluation of β -D-glucan from different sources by high-performance liquid chromatography of oligosaccharides released by lichenase*, «Cereal Chemistry», 68 (1), pp. 31-39.