

RELAZIONE FINALE

Relazione finale del progetto di ricerca:

Confronto tra le qualità nutraceutiche ed organolettiche di campioni di aglio della Valdichiana e aglio, proveniente dallo stesso sito di coltivazione

24/12/2019

Revisione definitiva

Progetto di ricerca:

Qualità nutraceutiche ed organolettiche di campioni di *Allium ampeloprasum* L. var. Holmense (aglione della Valdichiana) e *Allium sativum* L. provenienti dal medesimo sito di coltivazione

Committente:



Qualità e Sviluppo Rurale srl

Team R&S - Sviluppo locale e valorizzazione territoriale
Piazza Grande,7
53045 Montepulciano, Siena



**Associazione per la Tutela e la Valorizzazione
dell'aglione della Valdichiana**

Piazza Grande,7
53045 Montepulciano, Siena

Gruppo di Ricerca:



Prof. Stefano Biagiotti - Responsabile scientifico

Università Telematica Pegaso



Prof. Lucia Guidi - Responsabile scientifico

Dipartimento di Scienze, Agrarie, Alimentari e Agro-Ambientali dell'Università di Pisa

Riproduzione vietata.

Finito di editare: 24/12/2019





1. Introduzione

Il panorama agro-alimentare italiano è caratterizzato da coltivazioni tradizionalmente attuate entro aree più o meno ristrette, caratterizzate da particolari condizioni pedo-climatiche e/o socio-economiche che hanno rappresentato il presupposto per lo sviluppo di una serie di prodotti definiti “**di nicchia**”. Questi prodotti, a differenza delle colture più comuni, di solito raggiungono produzioni alquanto limitate e sono presenti nella maggior parte dei casi solo nei mercati locali e vengono utilizzati per la preparazione di ricette tipiche della zona in cui vengono prodotti/commercializzati.

Prodotti di nicchia, tuttavia, possono anche essere molto interessanti per un pubblico più ampio perché spesso dotati di caratteristiche qualitative particolarmente importanti, spesso attribuibili ad un ridotto miglioramento genetico ed una ridotta standardizzazione colturale, aspetti connessi ad un depauperamento del patrimonio genetico e nutraceutico delle colture tradizionali. Questo è indubbiamente il caso dell’**Aglione della Valdichiana** (*Allium ampeloprasum* L. var. *holmense* Mill.), ortaggio molto interessante sia per le elevate dimensioni del bulbo, e per questo localmente noto come “aglio gigante”, sia, soprattutto, per la quasi totale assenza nel bulbo della alliina e dei suoi derivati, che sono presenti nell’aglio comune e responsabili della difficile digeribilità e, soprattutto, di quell’alito sgradevole che può creare disagio o addirittura indurre a privarsi del piacere di gustare piatti tradizionalmente aromatizzati con aglio.

Per questa sua afrodisiaca gentilezza, i produttori e i commercianti lo propongono “aglio del bacio” o “kissingarlic”, il cui uso sicuramente avrebbe fatto felice anche Shakespeare, il quale nel Sogno di una notte di mezza estate dice agli attori “*anime mie, badate a non mangiar aglio o cipolla, ché dobbiamo esalare tutti un alito che deve riuscir dolce e gradevole*” (tratto dal libro ‘L’Aglione della Valdichiana’ di Graziano Tremori e Gianfranco Santiccioli).

È chiaro che un prodotto così di eccellenza e così particolare deve essere tutelato nella sua tipicità e originalità.

Scopo del progetto

La convenzione di ricerca stipulata tra **Qualità Sviluppo Rurale** s.r.l. (Presidente: Per. Agr. Franco Fierli; Responsabile scientifico: Prof. Stefano Biagiotti) ed il Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali dell'Università di Pisa (di seguito denominato DiSAAA-a, Direttore: Prof. Alberto Pardossi; Responsabile scientifico: Prof.ssa Lucia Guidi) prevedeva la caratterizzazione nutrizionale e nutraceutica di campioni di *A. ampeloprasum* var. *holmense* Aglione della Valdichiana e *Allium sativum* L. provenienti dal medesimo sito di coltivazione. Lo scopo del progetto era quello di investigare in dettaglio le caratteristiche nutrizionali/nutraceutiche dell'Aglione della Valdichiana al fine di descriverne in dettaglio quei caratteri che non fossero emersi da precedenti lavori scientifici, grazie anche alla applicazione di indagini di metabolomica avanzata. Inoltre, la comparazione con campioni di aglio comune (co-coltivato nella stessa azienda) avrebbe permesso di mettere in luce le differenze peculiari nel profilo nutrizionale/nutraceutico esistenti tra queste due bulbose appartenenti alla famiglia delle Amaryllidaceae.

2. Materiali e metodi

2.1. Materiale vegetale

I campioni di aglione ed aglio sono stati forniti da Qualità e Sviluppo Rurale e provenienti da un'unica azienda in modo che le caratteristiche pedo-climatiche di coltivazione fossero le stesse per entrambi gli ortaggi. I campioni sono stati inviati al laboratorio di Biochimica Agraria del DiSAAA-a il giorno 26 giugno 2019 e immediatamente campionati per le diverse analisi. Una parte del materiale è stato tagliato e posto in azoto liquido e quindi conservato a – 80 °C. Un'altra parte è stata posta in stufa a 65 °C fino a essiccamento e, infine, una parte è stata liofilizzata.

2.2. Determinazione del contenuto in elementi minerali

Per la determinazione del contenuto in elementi minerali, veniva utilizzato il materiale secco per le analisi di fosforo, potassio, calcio e magnesio, mentre per le altre analisi è stato utilizzato il liofilizzato.

L'analisi del fosforo è stata determinata mediante metodo Olsen. I contenuti di potassio, calcio e magnesio sono stati determinati in assorbimento atomico mentre carbonio, azoto, idrogeno, ossigeno e zolfo sono stati determinati mediante analisi elementare

Tutti i risultati sono espressi in concentrazione percentuale.

2.3. Determinazione del contenuto in fibre

La determinazione delle fibre è stata eseguita sui campioni liofilizzati seguendo il metodo Van Soest (1963), utilizzando la strumentazione ANKOM (ANKOM 65 rpm agitation). Questo metodo è stato proposto nel 1960 da Van Soest e permette di calcolare le varie frazioni fibrose alimentari. Il metodo consiste in una serie di trattamenti idrolitici a caldo utilizzando detergenti tensioattivi a pH differenti in modo successivo, prima neutro, poi acido e dopo fortemente acido. Usando un pH neutro nessun componente della parete cellulare viene solubilizzato ad eccezione di alcune proteine incrostate alla parete, ma il loro valore è trascurabile. Il trattamento così effettuato permette di calcolare la fibra neutra detergera (NDF), la quale corrisponde alla frazione fibrosa presente nella

parete. Usando pH decisamente acidi (0-1), le emicellulose presenti nella parete vengono solubilizzate e la frazione residua viene identificata con il nome di fibra acida detersa (ADF). Quindi è possibile calcolare la quantità di emicellulosa sottraendo il valore dell'NDF a quello dell'ADF:

$$\text{NDF-ADF} = \text{emicellulosa.}$$

Utilizzando invece una soluzione di acido solforico al 72% si ottengono valori di pH negativi che permettono la solubilizzazione della cellulosa. Il residuo, contenente lignina e silice, viene incenerito permettendo di calcolare la lignina acida detersa (ADL). Quindi sottraendo al valore dell'ADF quello del ADL e della silice possiamo calcolare la quantità di cellulosa presente nella parete cellulare:

$$\text{ADF-ADL} = \text{cellulosa}$$

Fibra Neutro Detersa (NDF)

Il campione è stato tritato in particelle di 1-2 mm per prepararlo al processo di estrazione. In un bag sono stati inseriti 0.5 g di campione previamente tarati. Il bag è stato sigillato mediante un termo saldatore, quindi sottoposto alle varie fasi di estrazione. I campioni sono stati inseriti nell'estrattore, immersi nella soluzione detergente neutra (30 g di sodio dodecil solfato; 18.61 g di sale disodio tetraaceticoetilendiammina disidratato; 6.81 g borato di sodio; 4.56 g fosfato di sodio dibasico anidro; 10.0 mL di glicol trietilene; in 1 L di acqua distillata). L'estrazione è stata fatta tenendo i campioni a 100 °C per 75 minuti. Successivamente i campioni sono stati lavati con acqua distillata a 70-90 °C per 5 minuti per tre volte. I campioni sono stati trasferiti in acetone per 5 minuti, quindi sono stati asciugati in un essiccatore e trasferiti in stufa a 100 °C per 2-4 ore. Dopo raffreddamento in essiccatore i campioni sono stati pesati.

Fibra Acido Detersa (ADF)

Il campione è stato tritato in particelle di 1-2 mm per prepararlo al processo di estrazione. In un bag sono stati inseriti 0.5 g di campione previamente tarati. Il bag è stato sigillato mediante un termo saldatore, quindi sottoposto alle varie fasi di estrazione. I campioni sono stati inseriti nell'estrattore e immersi nella soluzione detergente acida (20 g di acetiltrimetilammoniobromide in 1 L di acido solforico 1 N). L'estrazione è stata fatta tenendo i campioni a 100 °C per 75 minuti. Successivamente i campioni sono stati lavati con acqua distillata a 70-90 °C per 5 minuti per tre volte. I campioni sono stati trasferiti in acetone per 5

minuti, quindi sono stati asciugati in un essiccatore e trasferiti in stufa a 100 °C per 2-4 ore. Dopo raffreddamento in essiccatore i campioni sono stati pesati.

Lignina Acido Detersa (ADL)

Dopo aver determinato l'ADF, i bag sono stati trattati con acido solforico al 72% per 3 ore. Successivamente i bag sono stati lavati abbondantemente con acqua distillata per eliminare completamente l'acido. I campioni sono stati trasferiti in acetone per eliminare l'acqua, i bag sono stati essiccati in stufa a 105 °C per 2-4 ore e pesati dopo raffreddamento in essiccatore. I bag sono stati successivamente inceneriti a 525 °C per 3 ore in un crogiuolo.

I risultati relativi alle fibre vengono espressi in percentuale di peso secco.

2.4. Determinazione del contenuto in proteine

Per la determinazione del contenuto in proteine totali veniva utilizzato il Protein Assay Kit II (Bio Rad, Monaco, Germania). In cuvette del volume di 1.5 mL, per la lettura nel visibile, venivano preparati 2 campioni per ogni estratto: 790 µL di H₂O distillata, 200 µL di reagente e 10 µL di estratto; il bianco conteneva 800 µL di H₂O distillata e 200 µL di reagente. Dopo un'energica agitazione le cuvette venivano lasciate incubare per 10 minuti a temperatura ambiente prima di eseguire la lettura allo spettrofotometro ad una $\lambda=595$ nm (lunghezza d'onda alla quale corrisponde il picco di assorbimento del composto che si forma tra il Blu di Comassie e le proteine). Per il calcolo del contenuto in proteine di ogni campione, veniva utilizzata una curva di taratura come riferimento, determinata utilizzando diverse concentrazioni note di albumina di siero bovino (BSA), ponendole in relazione con i diversi valori di assorbanza ottenuti con una lettura spettrofotometrica a $\lambda=595$ nm. La curva di taratura ottenuta:

$$y = 0,05019x - 0,07484$$

dove:

y = assorbanza a 595 nm

x = concentrazione delle proteine in mg mL⁻¹.

Il contenuto in proteine totali solubili era espresso in mg g⁻¹ peso fresco (PF).

2.5. Determinazione del contenuto in zuccheri

La determinazione del contenuto in zuccheri (saccarosio e glucosio) è stata eseguita sui campioni liofilizzati attraverso l'utilizzo di due kit: il kit Sucrose/D-Glucose Assay Kit e D-Glucose Assay Kit, prodotti e commercializzati dall'azienda Megazyme. La determinazione è stata effettuata seguendo le istruzioni previste dal produttore. I dati vengono espressi in g/100 g peso secco (PS).

2.6. Determinazione del contenuto in fenoli totali

Tre grammi di materiale vegetale liofilizzato venivano omogenati con 15 mL di una soluzione costituita da etanolo e acetone puri da HPLC in rapporto rispettivamente 70:30; l'omogenato ottenuto, posto in tubi falcon, veniva messo ad incubare per un'ora alla temperatura di 37 °C. Una volta terminata l'incubazione l'omogenato veniva agitato e filtrato e l'estratto così ottenuto veniva conservato a -20 °C.

Per la determinazione del contenuto in fenoli il protocollo eseguito è stato quello proposto da Dewanto et al. (2002): in cuvette del visibile venivano posti 5 µL di estratto con etanolo e acetone ai quali venivano aggiunti 120 µL di H₂O distillata ad ottenere 125 µL ai quali sono stati aggiunti 125 µL di reagente di Folin Ciocalteau. Il tutto è stato agitato e lasciato riposare per 6 minuti trascorsi i quali sono stati aggiunti 1.25 mL di NaHCO₃ al 7% ad ottenere un volume totale di 1.5 mL; il campione veniva quindi lasciato in incubazione a temperatura ambiente per 90 minuti. Il bianco veniva preparato nello stesso modo ma con l'unica differenza che i 125 µL iniziali erano costituiti esclusivamente da H₂O distillata. Al termine dell'incubazione si è proceduto alla determinazione spettrofotometrica della reazione colorimetrica che si sviluppa dall'interazione tra il reagente di Folin Ciocalteau e l'estratto alla lunghezza d'onda di 760 nm. Per il calcolo del contenuto in fenoli totali, è stata necessaria la determinazione di una curva di taratura ottenuta da concentrazioni note di acido gallico. L'equazione della curva è la seguente:

$$y = 0,01146x - 0,01515$$

dove:

y = assorbanza a 760 nm

x = µg di acido gallico

Il principio di questa metodica si basa sul fatto che il reagente di Folin Ciocalteu è formato da due complessi acidi fosfomolibdeno/fosfotungsteno. I composti fenolici in ambiente basico vengono ossidati dai metalli molibdeno e tungsteno presenti nei complessi, ed assumono la colorazione blu dovuta alla riduzione dei metalli. I valori finali della determinazione sono stati espressi in mg di acido gallico g⁻¹ di PF.

2.7. Analisi metabolomica (UHPLC-QTOF-MS Untargeted Profiling)

I metaboliti secondari nei campioni di aglio e aglione sono stati estratti mediante omogeneizzazione (Ultra-turrax; Ika T25, Staufen, Germania), secondo il metodo descritto da Borgognone et al. (2016). In particolare, 1 g di materiale vegetale è stato omogeneizzato in 10 mL di una soluzione acquosa contenente metanolo all'80% (acidificato con 0.1% di acido formico; v/v). Gli estratti sono stati centrifugati a 6,000 g per 15 minuti a 4 °C. Le soluzioni risultanti sono state filtrate utilizzando filtri per siringa di cellulosa (pori da 0.22 nm). Infine, il filtrato è stato raccolto in vials ambrati, poi conservati a -18 °C fino al momento delle analisi.

Ogni campione è stato analizzato in triplicato mediante cromatografia liquida ad altissima pressione (UHPLC) accoppiata con spettrometria di massa quadrupolo-tempo di volo (QTOF). Lo spettrometro di massa è stato impostato per funzionare in modalità SCAN, acquisendo ioni positivi da una sorgente di elettrospray JetStream (ESI +) nell'intervallo 100-1200 m/z. La separazione cromatografica è stata ottenuta in fase inversa usando una colonna Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (100 × 2.1 mm, 1.8 µm) e una miscela di acqua (fase A) e acetonitrile (fase B) come fase mobile (entrambe di grado LC-MS). Inoltre, in entrambe le fasi è stato aggiunto acido formico 0.1% (v/v) (da Sigma-Aldrich). Il gradiente è stato progettato dal 6% di acetonitrile al 94% di acetonitrile entro 30 minuti, la portata era di 0.22 mL min⁻¹ e il volume di iniezione era di 6 µL.

I dati grezzi sono stati quindi elaborati utilizzando il software Agilent Profinder B.07 e l'algoritmo "find-by-formula", sfruttando la combinazione sia di massa accurata monoisotopica che profilo isotopico. Un database personalizzato contenente sia polifenoli (scaricato da Phenol-Explorer 3.6; phenol-explorer.eu/) che composti caratteristici della matrice aglio è costruito e utilizzato come riferimento per l'annotazione, adottando una tolleranza di 5-ppm per

l'accuratezza di massa. L'annotazione dei metaboliti secondari è stata effettuata secondo un LIVELLO 2 di accuratezza (composti putativamente identificati), come stabilito dalla Metabolomics Standard Initiative (<http://cosmos-fp7.eu/msi.html>). Dopo l'annotazione, i composti fenolici sono stati suddivisi in diverse classi (secondo Phenol-Explorer) e quantificati usando soluzioni standard metanoliche preparate da un singolo composto di riferimento per ogni classe, come precedentemente riportato in Rocchetti et al. (2019).

Queste analisi sono state effettuate su materiale fresco e su materiale digerito in vitro (sfruttando il metodo ufficiale Infogest; Minekus et al., 2014), per simulare le condizioni reali a cui queste classi di metaboliti vanno incontro a seguito del processo digestivo, considerando fase salivare (2 minuti), gastrica (2 ore) e pancreatica (2 ore).

2.8. Elaborazione statistica dei dati

I dati relativi ai parametri nutrizionali e nutraceutici sono stati analizzati mediante Student's t-test ($P \leq 0,05$). Tutte le analisi statistiche sono state condotte utilizzando GraphPad (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

I dati di metabolomica sono stati elaborati utilizzando il software Agilent Mass Profiler Professional B.12.06. I composti sono stati filtrati per abbondanza (sono stati considerati solo quei composti con un'area > 5000), normalizzati al 75° percentile e allineati alla loro mediana. Nelle elaborazioni post-acquisizione è stato utilizzato anche un filtro di frequenza, considerando quei composti identificati nel 100% delle repliche in almeno un trattamento. L'analisi dei cluster gerarchici non supervisionata (HCA) è stata quindi effettuata per evidenziare le similarità tra i diversi campioni analizzati sulla base dei valori di 'fold-changes'. Successivamente, il set di dati metabolomici è stato esportato nel software SIMCA 13 (Umetrics, Malmo, Svezia), ed elaborato per l'analisi discriminante supervisionata OPLS-DA. La presenza di valori anomali è stata esclusa secondo T2 di Hotelling, mentre la convalida incrociata del modello è stata effettuata utilizzando CV-ANOVA ($p < 0,01$) e test di permutazione ($N = 100$). Per ogni modello OPLS-DA costruito, sono stati anche ispezionati i parametri della qualità della misura (R^2Y) e di predizione (Q^2Y). Inoltre, l'importanza delle variabili è stata valutata applicando il metodo di selezione delle variabili discriminanti VIP, considerando discriminanti quei composti che presentavano

un valore VIP > 1.3. Di questi markers discriminanti è stata valutata anche l'analisi Fold-Change (FC > 2), al fine di valutare quei metaboliti secondari significativamente diversi in aglio e aglione.

3. Risultati

3.1. Caratteristiche nutrizionali

3.1.1. Contenuto in elementi minerali, sostanza secca e fibre

I campioni di aglio mostravano un contenuto maggiore in N, P, K ed avevano una più elevata percentuale di sostanza secca rispetto ai campioni di aglione (**Tabella 1**). Al contrario, i campioni di aglione risultavano più abbondanti in C, H e S, quest'ultimo elemento presente ad una concentrazione maggiore del 40% rispetto a quella rilevata nell'aglio. I campioni di aglione erano, inoltre, caratterizzati da un maggior rapporto C/N e un più elevato valore di umidità rispetto ai campioni di aglio. Non si riscontravano differenze significative rispetto al contenuto in Ca, Mg e rapporto C/H tra i campioni delle due Alliaceae. È noto dalla letteratura che l'aglione è costitutivamente più ricco in aminoacidi solforati, i.e. cisteina e metionina, rispetto all'aglio sia nelle foglie che nel bulbo e questa potrebbe essere la ragione della maggiore concentrazione di zolfo rilevata nei bulbi di aglione (Najda et al., 2016). D'altra parte, lo zolfo rappresenta uno degli elementi maggiormente presenti nel corpo umano, dopo calcio e fosforo in quanto presente in pelle, muscoli ed ossa ma svolge un ruolo chiave anche in altri sistemi del corpo. Ad oggi non esiste il fabbisogno giornaliero di zolfo ma, sicuramente, il modo migliore per assumerlo è tramite l'alimentazione. Alimenti ricchi sono la carne ed il pesce, così come le uova, i legumi, la famiglia di aglio e cipolle (tra cui l'aglione), cavolo e asparagi.

Il contenuto in NDF e cellulosa risultava maggiore nei campioni di aglio, mentre non si osservavano differenze significative per le altre fibre (ADF e ADL) ed il contenuto in emicellulosa tra campioni di aglio e aglione (**Tabella 2**). I risultati relativi al contenuto in fibre sembrano, quindi, supportare una migliore digeribilità (correlata ad un più basso contenuto in fibre) dell'aglione rispetto all'aglio, come comunemente riscontrabile.

3.1.2. Contenuto in proteine, glucosio e saccarosio

I campioni di aglione mostravano un più basso contenuto in proteine totali rispetto all'aglio e che si aggira intorno a 3 mg g^{-1} PF (**Tabella 3**). Non si evidenziavano invece differenze significative per quanto concerne il contenuto

in saccarosio e glucosio (**Tabella 3**). Simili (o diversi) risultati erano stati osservati anche da Paoletti (2004).

3.2. Caratteristiche nutraceutiche

3.2.1. Contenuto in fenoli totali

I fenoli totali sono molecole importanti da un punto di vista nutraceutico e sono responsabili degli effetti sulla salute umana. La concentrazione di fenoli nel bulbo dell'aglione era significativamente superiore rispetto a quella rilevata nel bulbo di aglio (**Tabella 4**). Da sottolineare come entrambi i bulbi provenivano dalla stessa azienda che li coltiva nello stesso ambiente pedo-climatico per cui può essere eliminata l'influenza dell'ambiente di coltivazione sulla concentrazione di queste importanti molecole. La concentrazione registrata nei due prodotti era. Tra l'altro, molto più elevata di quanto riportato in letteratura da Najda et al. (2016) anche se gli autori riportano analisi effettuate su campioni coltivati in Polonia. Questo già sembra indicare che l'aglione della Valdichiana presenti una concentrazione in fenoli nettamente superiori alla stessa varietà coltivata in altre aree.

Tabella 1: Contenuto in N, C, H, S, P, K, Ca, Mg, rapporto C/N, rapporto C/H, umidità e sostanza secca percentuale (media \pm deviazione standard; n=5) in campioni di aglio e aglione provenienti dallo stesso sito di coltivazione. *** Medie significativamente diverse ($P \leq 0.05$; $P \leq 0.01$, e $P \leq 0.001$, rispettivamente) in base al test del t di Student; ns: medie non significativamente diverse ($P > 0.05$) in base al test del t di Student.

	N (%)	C (%)	H (%)	S (%)	C/N	C/H	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	Umidità (%)	Sostanza secca (%)
AGLIO	2.64 (0.261)	41.29 (0.258)	6.56 (0.020)	0.38 (0.015)	15.78 (1.635)	6.29 (0.058)	1.17 (0.037)	1.04 (0.109)	0.21 (0.013)	0.050 (0.004)	62.13 (0.568)	37.87 (0.569)
AGLIONE	1.88 (0.063)	42.38 (0.279)	6.68 (0.045)	0.65 (0.180)	22.53 (0.897)	6.34 (0.078)	0.59 (0.011)	0.76 (0.019)	0.23 (0.016)	0.06 (0.004)	67.23 (0.666)	32.77 (0.666)
Significatività	**	**	*	*	**	ns	***	*	ns	ns	***	***

Tabella 2: Contenuto in fibre neutro deterse (NDF), acido deterse (ADF), lignina acido detersa (ADL), emicellulosa e cellulosa (media \pm deviazione standard; n=5) in campioni di aglio e aglione provenienti dallo stesso sito di coltivazione. * ** *** Medie significativamente diverse ($P \leq 0.05$; $P \leq 0.01$, e $P \leq 0.001$, rispettivamente) in base al test del t di Student; ns: medie non significativamente diverse ($P > 0.05$) in base al test del t di Student.

	NDF (%) emicellulosa, cellulosa e lignina	ADF (%) cellulosa, lignina, cutina e silice	ADL (%) lignina	Emicellulosa (%)	Cellulosa (%)
AGLIO	9.98 (0.165)	9.09 (0.403)	3.91 (0.343)	0.48 (0.326)	2.06 (0.235)
AGLIONE	8.46 (0.301)	8.58 (1.095)	3.25 (0.307)	0.55 (0.121)	1.29 (0.038)
Significatività	**	ns	ns	ns	**

Tabella 3: Contenuto in proteine totali solubili, saccarosio e glucosio (media \pm deviazione standard; n=5) in campioni di aglio e aglione provenienti dallo stesso sito di coltivazione. *: Medie significativamente diverse ($P \leq 0.05$) in base al test del t di Student; ns: medie non significativamente diverse ($P > 0.05$) in base al test del t di Student. PF: peso fresco; PS: peso secco.

	Proteine (mg g⁻¹ PF)	Saccarosio (g/100 PS)	Glucosio (g/100 PS)
AGLIO	4.61 (0.793)	3.55 (0.525)	0.11 (0.043)
AGLIONE	2.86 (0.510)	3.36 (0.136)	0.11 (0.035)
Significatività	*	ns	ns

Tabella 4: Contenuto in fenoli totali (media \pm deviazione standard; n=5) in campioni di aglio e aglione provenienti dallo stesso sito di coltivazione. ***: Medie significativamente diverse ($P \leq 0.001$) in base al test del t di Student. PF: peso fresco.

	Contenuto in fenoli totali (mg acido gallico g⁻¹ PF)
AGLIO	7,52 (0,908)
AGLIONE	13,07 (0,535)
Significatività	***

3.2.2. Profilo metabolomico

L'analisi metabolomica fornisce le uniche impronte chimiche lasciate da specifici processi cellulari, nello specifico, lo studio dei loro percorsi metabolici. Il metaboloma, quindi, rappresenta l'insieme di tutti i metaboliti di un organismo biologico, che sono i prodotti finali della sua espressione genica e biochimica. L'analisi discriminante OPLS-DA ha permesso chiaramente di discriminare i campioni di aglio ed aglione in accordo al loro profilo chimico (**Figura 1**). Successivamente, il metodo di selezione delle variabili discriminanti VIP è stato

utilizzato per identificare quei composti che permettevano il raggruppamento osservato in **Figura 1**. L'analisi evidenzia quindi una netta separazione tra i profili metabolici dei due bulbi a confermare una distinta composizione metabolica.

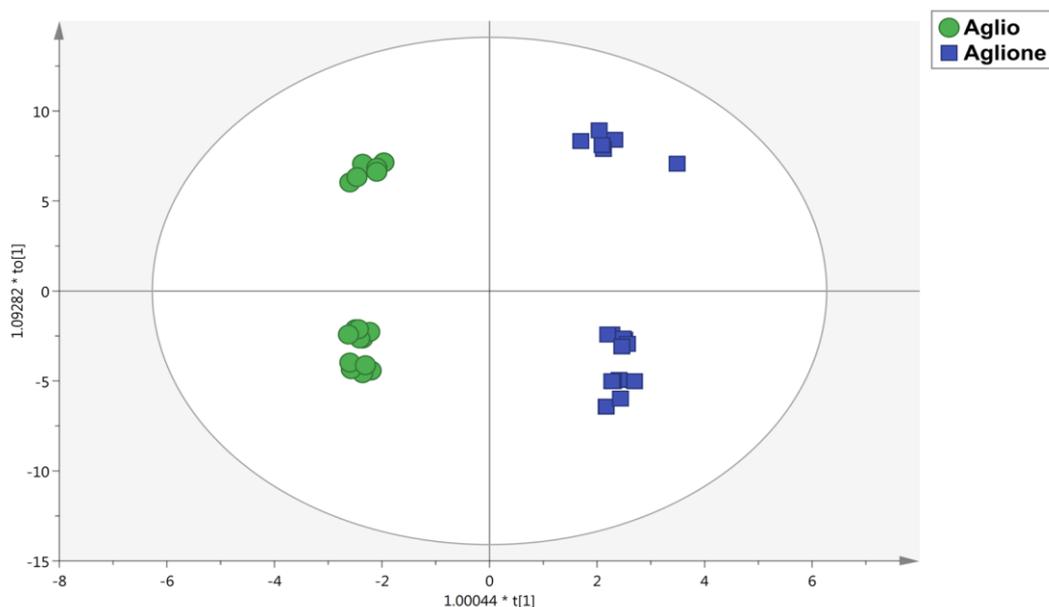


Figura 1: Analisi discriminante a proiezione ortogonale di strutture latenti (OPLS-DA) di metaboliti secondari di campioni di aglio e aglione derivanti dalla stessa azienda di coltivazione.

Infatti, come si evince dalla **Tabella 5**, nella quale il confronto viene fatto tra aglio e aglione ed i termini up and down indicano maggiore o minore contenuto nell'aglione rispetto all'aglio, 17 composti sono responsabili delle differenze tra le due bulbose. È importante notare che il numero limitato di composti discriminanti e da sottolineare come i composti solforati siano presenti soprattutto nell'aglio. Dall'idrolisi di questi composti solforati indotta dall'enzima allinasi, si forma allicina, molecola odorosa molto instabile, che è dotata di interessanti proprietà antimicrobiche e battericide, antiossidanti, immunostimolanti, antitumorali ed epatoprotettive, ma che, allo stesso tempo, è anche responsabile del tipico sgradevole odore pungente più pronunciato nell'aglio rispetto all'aglione. È chiaramente dovuto alla vicinanza chimica delle due matrici analizzate. Dall'analisi dei risultati i composti che sono

maggiormente presenti nell'aglio, rispetto all'aglio sono il cinnamoil-glucoside, il 5-nonadecilresorcinolo, il triptofano e l'esculina.

Tabella 5: Marcatori VIP discriminanti che permettono il confronto con i corrispondenti valori di Log Fold Change tra aglio ed aglione. L'ultima colonna (variazione) indica i composti maggiormente presenti nell'aglio rispetto all'aglio (down) o viceversa (up).

Var ID (primary)	M4.VIP (1+1+0)	2.446963+M4.VIP [1]cvSE	Log FC (Aglio vs aglione)	Variazione
Cinnamoil glucosio	1.11	0.15	-6.82	down
5-nonadecilresorcinolo	1.11	0.18	-3.82	down
N-gammaglutammil-S-allicisteina	1.11	0.17	25.01	up
N-gammaglutammil-S-trans-[1-propenil)cisteina	1.11	0.17	25.01	up
Acido rosmarinico	1.11	0.13	36.16	up
L-triptofano	1.10	0.22	-1.52	down
Colina	1.09	0.14	19.63	up
Eruboside B	1.09	0.17	3.24	up
Bisdimetossicurcumina	1.09	0.18	17.71	up
Esculina	1.09	0.15	-1.79	down
4-idrossibenzoato 4-O-glucoside	1.08	0.15	15.72	up
L-prolina	1.07	0.27	20.50	up
N-gamma-glutammil-S-propilcisteina	1.06	0.20	17.84	up
Floretina	1.04	0.44	18.79	up
N-gamma-L-glutammil-L-fenilalanina	1.03	0.44	18.79	up
Narirutina/naringina	1.01	0.34	17.66	up
Arginina	1.00	0.32	18.54	up

L'**acido cinnammico** (presente nella forma glicosilata) è una molecola che appartiene alla vasta classe dei fenoli e, di conseguenza, ai metaboliti secondari. Questo composto presenta un largo spettro di effetti terapeutici nel trattamento contro il cancro, il diabete e le malattie cardiovascolari oltre ad avere effetti epato-, neuro- e fotoprotettivi ed avere attività antiinfiammatoria e antimicrobica (El-Seedi et al., 2018). La sua attività biologica è legata essenzialmente alla sua elevata capacità antiossidante e la capacità di eliminare le specie radicaliche tossiche. Recentemente, si è trovato che l'acido cinnammico presenta anche attività farmacologica in quanto capace di bloccare l'attività dell'idrossimetilglutaril-CoA reductasi ed attivare la glucochinasi

contribuendo in tal modo a ridurre l'ipercolesterolemia e l'iperglicemia, rispettivamente (El-Seedi et al., 2018).

Anche il **5-nonadecilresorcinolo** è una sostanza fenolica, in particolare un alchilfenolo. Il **triptofano**, invece, è un amminoacido essenziale che deve essere inserito tramite l'alimentazione in quanto il nostro organismo non è in grado di produrlo. Infine, l'**esculina** che è il glucoside dell'esculetina (6-7 diidrossicumarina), una cumarina e, quindi, un derivato dell'acido cinnammico. Questa molecola possiede effetti anti-allergici e antiinfiammatori (Mabalirajan et al., 2009) ma è anche in grado di sopprimere le citochinine Th1, Th2 e Th17 ed inibisce l'attivazione del fattore nucleare κ (NF- κ B), ed altri fattori di trasduzione che conferiscono a questo composto la capacità di attenuare i processi infiammatori atopici della pelle (Mabalirajan et al., 2009). Dall'analisi appare anche evidente come i composti solforati sono maggiormente presenti nell'aglio rispetto all'aglio a conferma della maggiore delicatezza di questo ultimo prodotto.

I campioni sono stati sottoposti alla digestione *in vitro* (salivare, gastrica e pancreatico) ed i risultati ottenuti sono riportati in **Figura 2**. Come si può vedere, i campioni erano completamente discriminati al tempo iniziale e dopo fase gastrica, mentre le differenze iniziavano a ridursi con il procedere della digestione ed avvicinandosi alla fase pancreatico.

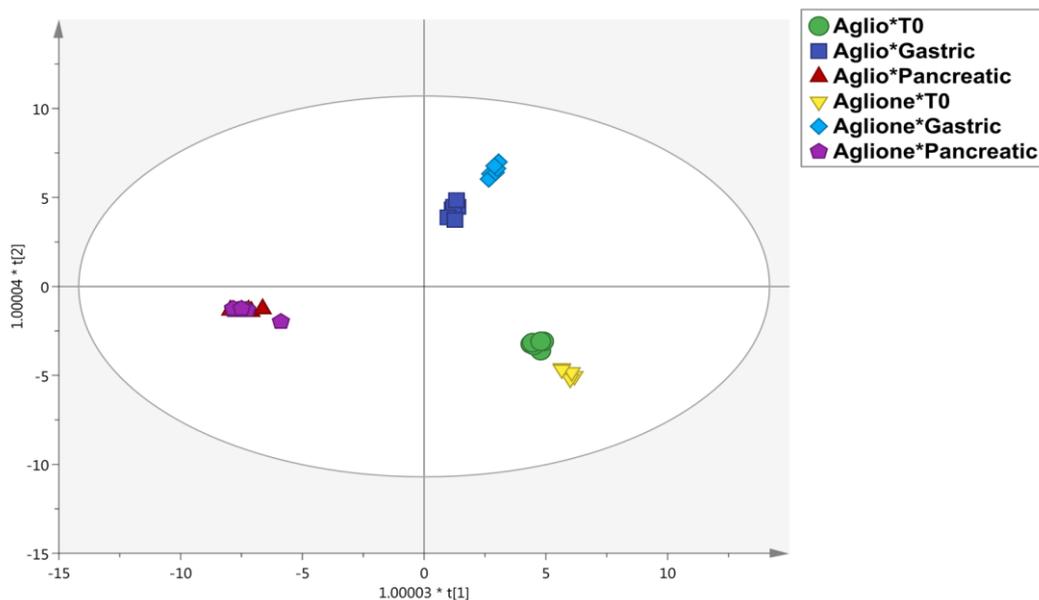


Figura 2: Analisi discriminante a proiezione ortogonale di strutture latenti (OPLS-DA) di metaboliti secondari nei campioni di aglio e aglione derivanti dalla stessa azienda di coltivazione in seguito a digestione salivare, gastrica e pancreatica.

Tale fenomeno è verosimilmente dovuto all'effetto "tempo di digestione", in grado di modificare il profilo iniziale dei metaboliti secondari, grazie anche all'azione enzimi digestivi e pH acido dell'ambiente (due fattori determinanti nel causare le modifiche osservate durante digestione). Nella **Tabella 6** vengono riportati in dettaglio i 18 composti, presenti in entrambe le bulbose, ma che si sono contraddistinti un discostamento nella loro regolazione contribuendo perciò alla separazione dei due campioni al termine della digestione.

Tabella 6: Marcatori VIP discriminanti che permettono il confronto con i corrispondenti valori di Log Fold Change tra aglio ed aglione. L'ultima colonna (variazione) indica i composti maggiormente presenti nell'aglione rispetto all'aglio (down) o viceversa (up). Le analisi si riferiscono al digestato.

Var ID (primary)	M4.VIP (1+1+0)	2.446963+M4.VIP [1]cvSE	Log (Aglio vs aglione)	FC vs	Variazione
Pterostilbene	1.07	0.76	-6.31		down
Cinnamoil glucosio	1.57	0.18	-5.55		down
Arginina	1.11	0.48	-0.12		down
Acido rosmarinico	1.46	0.34	-0.63		down
6-geraniInaringenina	1.15	0.74	-0.12		down
N-gamma-Lglutammil-L-metionina	1.66	0.57	-5.31		down
Eruboside B	1.47	0.32	-5.10		down
Esculina	1.42	0.34	-0.64		down
4-idrossibenzoato 4-O-	1.41	0.34	-0.64		down

glucoside				
Floretina	1.29	0.28	-5.89	down
(+)-catechina	1.22	0.72	-0.66	down
N-gamma glutammil-S-allicisteina	1.13	0.38	-0.64	down
L-gamma glutammil-S-allitio-L-cisteina	1.13	0.38	-0.64	down
Colina	1.49	0.30	0.08	up
L-istidina	1.41	0.54	5.58	up
L-prolina	1.33	0.53	0.21	up
Secoisolarilciresinolo di-O-glucoside	1.10	0.59	0.65	up
N-gamma-L-glutammil-L-fenilalanina	1.04	0.49	0.13	up

I diversi comportamenti di cui sopra, confermano globalmente le differenze tra le due matrici in esame, evidenziando il potenziale nutraceutico della matrice aglione, come possibile "veicolo" di composti ad attività antiossidante nei tratti prossimali dell'intestino. Infatti, come possiamo vedere dalla **Tabella 6**, gran parte dei metaboliti responsabili delle differenze tra le due bulbose prevalgono ora nei campioni digeriti di aglione (prodotti caratterizzati da **down** nella tabella). Tra questi alcuni appartengono alla enorme classe dei fenoli, tra cui lo pterostilbene, il cinnamoil glucosio, l'acido rosmarinico, la 6-geranilnaringenina, l'esculina, il 4-idrossibenzoato-4-O-glucoside, la floretina (di-idrocalcone) e la catechina. Altre, come l'eruboside, un glicoside steroideo o gli amminoacidi (arginina) e alcuni composti soflorati contraddistinguono il digestato di aglione.

La **geranilnaringenina** è un flavonoide che ha proprietà antibatteriche (Wang et al., 2001) e ancora poco nota è la sua attività anticancro (Venturelli et al., 2016). Anche la **catechina** è un flavonoide con azione antiossidante. Tra le azioni delle catechine sull'organismo, si può affermare che hanno un effetto nella prevenzione dell'artrite e sarebbero buone persino per contrastare il cancro (Zanwar et al., 2014). L'**acido rosmarinico**, fenolo tipico delle specie della famiglia delle Labiate, che presenta molteplici attività biologiche, tra cui: astringente, antiossidante, antiinfiammatorio, antimutageno, antibatterico e antivirale (e.g. Parnham e Kesselring, 1985). Lo pterostilbene è uno stilbenoide chimicamente legato al resveratrolo, che si trova in mirtilli e uva. Appartiene al gruppo delle fitoalessine, sostanze prodotte dalle piante per combattere le infezioni. Ha effetti positivi anti-ansietà ed è benefico in quanto antiossidante, antiinfiammatorio (Li et al., 2018)

L'**arginina** è un amminoacido essenziale sono nei bambini che non sono ancora in grado di sintetizzarla, mentre negli adulti è sintetizzata nel ciclo dell'urea. Il suo metabolismo nell'uomo porta ad un amminoacido non essenziale, la citrullina, e ossido nitrico, che agisce da vasodilatatore. L'arginina è anche il donatore del gruppo guanidinico all'amminoacido glicina per la sintesi endogena della creatina, composto intermedio del metabolismo energetico sintetizzato dal fegato a partire da arginina, S-adenosil metionina e glicina, ed è utilizzato nei muscoli dei mammiferi per rigenerare ATP durante i primi secondi della contrazione muscolare.

I dati ottenuti sono molto interessanti perché dimostrano che, in generale, il profilo digestivo tra i due prodotti è diverso, con l'aglione in grado di promuovere la bioaccessibilità di molti più polifenoli (con attività antiossidante e di inibizione di enzimi digestivi) con possibile ruolo nutraceutico. In definitiva, comparando i dati a seguito della digestione con quelli del prodotto fresco si osserva una ulteriore down-regolazione di 3 molecole nell'aglione, che sono, nello specifico: eruboside B, floretina e N-gamma-glutammiil-S-allitio-L-cisteina. Questo modifica la situazione osservata nel prodotto fresco in cui 13 molecole su 17 erano up-regolate nell'aglio mentre in questo caso, 11 molecole su 18 risultano down-regolate nell'aglione digerito (quindi maggiormente rappresentate).

5. Conclusioni

Le analisi condotte sui campioni di aglio e aglione analizzati nel presente progetto di ricerca hanno fatto emergere differenze sostanziali dal punto di vista metabolomico e nutraceutico tali da rappresentare un punto di forza per la promozione dell'aglione della Valdichiana, come di seguito dettagliato. In primis, i campioni di aglione mostrano un ridotto contenuto di fibre rispetto ai campioni di aglio, aspetto ricollegabile ad una maggior digeribilità di *A. ampeloprasum* var. *holmense*. Inoltre, il contenuto di fenoli totali è risultato essere circa il doppio nei campioni di aglione, lasciando presupporre un sensibile potenziale antiossidante attribuibile a questa classe di metaboliti secondari. Infine, lo screening metabolomico ha messo in luce la presenza di una serie di molecole ad azione antimicrobica, antitumorale e antiinfiammatoria maggiormente rappresentate nei campioni di aglione. Tutto ciò pone senza dubbio le basi scientifiche per una valorizzazione dell'aglione della Valdichiana come prodotto ad elevato valore nutraceutico, tale da giustificare la sua coltivazione e la volontà di divulgarne l'utilizzo anche in un contesto più ampio delle attuali aree di coltivazione e di consumo.

6. Bibliografia citata

- Borgognone, D.; Roupheal, Y.; Cardarelli, M.; Lucini, L.; Colla, G. Changes in biomass, mineral composition, and quality of cardoon in response to NO_3^- : Cl^- ratio and nitrate deprivation from the nutrient solution. *Front. Plant Sci.* 2016, 7, 978.
- Dewanto, V.; Adom, K.K.; Liu, R.H. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 3010-3014.
- El-Seedi, R.; Taher, E.A.; Sheikh, B.Y.; Anjum, S.; Saeed, A., AlAjmi, M.F.; Moustafa, M.S.; Al-Mousawi, S.M.; Farag, M.A.; Hegazy, M.-E. F.; Khalifa, S.A.M.; Göransson, U. Hydroxycinnamic acids: natural sources, biosynthesis, possible biological activities, and roles in Islamic medicine. *Studies in Natural Products Chemistry* 2018, 55, 269-292.
- Mabalirajan, U.; Dinda, A.K.; Sharma, S.K.; Ghosh, B. Esculetin restores mitochondrial dysfunction and reduces allergic asthma features in experimental murine model. *J. Immunol.* 2009, 183, 2059-2067.
- Parnham, M.J.; Kesselring, K. Rosmarinic acid. *Drugs of the Future*, 1985, 10, 756-757
- Rocchetti, G.; Bhumireddy, S.R.; Giuberti, G.; Mandal, R.; Lucini, L.; Wishart, D.S. Edible nuts deliver polyphenols and their transformation products to the large intestine: An *in vitro* fermentation model combining targeted/untargeted metabolomics. *Food Res. Int.* 2019, 116, 786-794.
- Van Soest, P.J. Use of detergents in the analyses of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, 1963, 46: 829-835.
- Venturelli, S.; Burkard, M.; Biendl, M.; Lauer, U.M.; Frank, J.; Busch, C. Prenylated chalcones and flavonoids for the prevention and treatment of cancer. *Nutrition*, 2016, 32(11–12), 1171–1178.
- Wang, Y.; Tan, W.; Li, W. Z.; Li, Y. A facile synthetic approach to prenylated flavanones: First total syntheses of (±)-bonannione A and (±)-sophoraflavanone A. *Journal of Natural Products*, 2001, 64(2), 196-199.

Zanwar, A.A.; Badole, S.L.; Shende, P.S.; Hegde, M.V.; Bodhankar, S.L.
Polyphenols in human health and disease. Antioxidant Role of Catechin in
Health and Disease 2014, 1, 267-271.

Li, Y.-R.; Li, S.; Lin, C.-C. Effect of resveratrol and pterostilbene on aging and
longevity. Biofactros, 2018, 44, 69-82.

