

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI
CAMPUS DI CESENA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE E TECNOLOGIE
ALIMENTARI

**PRIME PROVE PER LA MITIGAZIONE IN AMBITO
AZIENDALE SULL'ACCUMULO DI ACRILAMMIDE IN
DIVERSI FROLLINI.**

Tesi in

MODIFICAZIONI CHIMICHE E ANALISI DEGLI ALIMENTI

Relatrice: Dott.ssa Pasini Federica

Candidata: Ilaria Sarti

N° matricola: 975940

Anno Accademico 2021/2022

Sommario

ABSTRACT	5
Capitolo 1.....	6
1.1. Cos'è l'acrilammide	7
1.2. Meccanismo di reazione	8
1.3. Fonti di esposizione	9
1.4. Legislazione Europea: Reg. UE 2017/2158	12
1.5. Nuove proposte in ambito legislativo	14
Capitolo 2.....	16
2.1. Fattori genetici e agronomici	17
2.1.1. Componente minerale del terreno	17
2.1.2. Stress biotico e abiotico	18
2.1.3. Possibili strategie di mitigazione	19
2.2. Formulazione di prodotto	20
2.2.1. Tipologia di farina	20
2.2.2. Tipologia di zucchero	22
2.2.3. Dosaggio di bicarbonato di ammonio (NH₄HCO₃)	24
2.2.4. Riduzione del pH	26
2.2.5. Ossidazione lipidica	27
2.2.6. Effetto del tipo di grasso	28
2.2.7. Aggiunta di asparaginasi	29
2.2.8. Aggiunta di altri ingredienti	30
2.3. Parametri di processo	32
2.3.1. Tempo e temperatura di cottura	32
2.3.2. Tipologia di forno	33
Capitolo 3.....	35
3.1. Materiali	36
3.2. Metodi	37
3.2.1. Analisi acrilammide	38
3.2.2. Analisi statistica	38
Capitolo 4.....	40
4.1. Analisi del contenuto di acrilammide	41
4.1.1. Frollini 100% integrali	41
4.1.2. Frollini chia, quinoa, arancia e zenzero	43
4.2. Conclusioni	47
4.2.1. Sviluppi futuri	49

Bibliografia.....	50
Sitografia.....	53

ABSTRACT

L'obiettivo principale di questa tesi è stato lo studio dei fattori che a livello genetico, di formulazione e di processo possono influenzare lo sviluppo di acrilammide nei frollini. L'acrilammide è una sostanza che appartiene alla categoria dei “probabili cancerogeni” per la salute dell'uomo, per cui è necessario cercare di ridurre il contenuto negli alimenti. A livello legislativo, la Commissione Europea ha redatto un regolamento (Reg. UE 2017/2158) nel quale vengono indicate le principali norme e accortezze da seguire a livello aziendale per ridurre la sua presenza negli alimenti.

Tramite l'attività di tirocinio svolta presso l'azienda Deco Industrie S. C. R. L. con sede a San Michele (RA) è stato possibile osservare concretamente a livello industriale i problemi legati all'accumulo di acrilammide per alcuni alimenti prodotti. In particolare, l'attenzione dell'azienda durante il periodo di mia permanenza presso la sede è stata rivolta a tre tipi di frollini, considerati i più critici, per i quali è stata monitorata la concentrazione di acrilammide nel tempo, andando a modificare la formulazione della ricetta.

Ovviamente questo studio di tesi riporta un primo approccio al problema e rappresenta quindi il punto di partenza per studi futuri più approfonditi con lo scopo di raggiungere una standardizzazione del prodotto con livelli sempre più bassi di acrilammide.

Capitolo 1

L'acrilammide

1.1. Cos'è l'acrilammide

L'acrilammide è un contaminante di processo che si origina durante la reazione di Maillard, ovvero un processo di imbrunimento non enzimatico che coinvolge amminoacidi e zuccheri riducenti, ad elevate temperature (superiori a 120°C) e in condizioni di bassa attività dell'acqua. Tale sostanza è responsabile dell'imbrunimento degli alimenti, conferendo il classico aroma di "cotto". A seconda del tipo di prodotto considerato, questo tipo di reazione può essere desiderata o meno.

L'acrilammide, o 2,3-propenamida secondo la nomenclatura IUPAC, è un composto a basso peso molecolare, di soli dieci atomi, altamente solubile in acqua. Dal punto di vista organico, quindi, si tratta di un'ammina, ovvero un derivato degli acidi carbossilici che presenta un gruppo amminico terminale (NH₂) al posto dell'ossidrile (OH).

L'acrilammide si forma prevalentemente negli alimenti ricchi di carboidrati cotti al forno o fritti, costituiti da materie prime che contengono i suoi precursori, come i cereali, le patate e i chicchi di caffè. (Reg. UE 2017/2158).

Questa molecola è stata scoperta per la prima volta negli alimenti nel 2002, ma all'epoca non era stato raccolto un numero sufficiente di dati per permettere al Comitato Scientifico dell'Alimentazione Umana (SCF) di determinare il rischio reale derivante dall'esposizione all'acrilammide tramite il suo consumo alimentare. A partire da questo momento, quindi, l'allora Comitato Scientifico, nel frattempo disciolto a favore di una nuova agenzia, l'European Food Safety Authority (EFSA), ha condotto una serie di studi al fine di valutare l'effettiva cancerogenicità e genotossicità di questa molecola, riscontrata negli animali da esperimento. L'allarme era stato dato precedentemente dal Comitato congiunto di esperti FAO/OMS, incaricati di valutare il rischio di acrilammide sugli additivi alimentari, arrivando alla conclusione che questa molecola può destare preoccupazioni per la salute umana e che, pertanto, occorre assumere misure opportune per ridurre la sua esposizione. Nel 2005, EFSA pubblica una dichiarazione a riguardo, nella quale si dichiara concorde con le raccomandazioni espresse dal Comitato congiunto FAO/OMS. A seguito di una raccomandazione della Commissione europea del 2007, gli Stati membri sono stati invitati a monitorare i livelli di acrilammide per un periodo di tre anni e a presentare all'EFSA i dati ottenuti. Nel 2010 la Commissione ha raccomandato loro di proseguire il monitoraggio con cadenza annuale, e, dal 2011 ha poi consigliato l'esecuzione di indagini nei casi in cui gli alimenti presentino livelli di acrilammide superiori ai valori indicativi ammessi. Nel 2013, quindi, l'EFSA completa in via provvisoria una valutazione integrale dei rischi e l'anno successivo pubblica un'infografica nella

quale illustra come e in quali alimenti si forma l'acrilammide, inserendo alcuni suggerimenti per ridurre l'esposizione alimentare a tale sostanza. Solo nel 2015 viene pubblicata la prima valutazione completa dei rischi, nella quale gli esperti concludono che tale sostanza potenzialmente aumenta il rischio di sviluppare il cancro nei consumatori di tutte le fasce d'età.

1.2. Meccanismo di reazione

L'acrilammide (*Figura 1*) è un prodotto della reazione di Maillard, che si forma a partire da un amminoacido non proteico specifico, l'asparagina. Questo amminoacido, reagendo con gli zuccheri riducenti naturalmente presenti nelle materie prime o aggiunti in fase di formulazione, porta alla produzione di questa molecola.

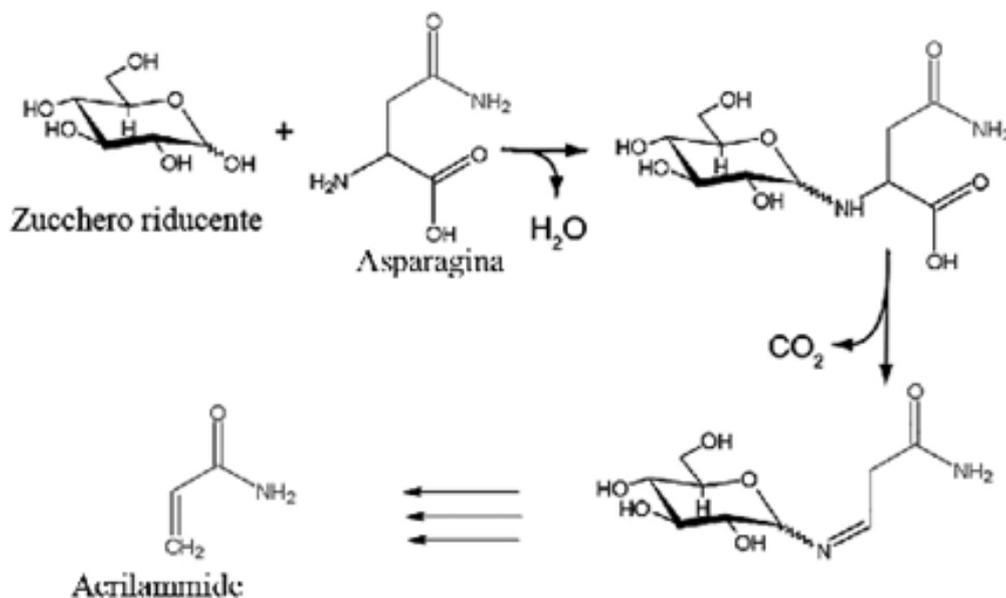


Figura 1. Schema sintetico della generazione di acrilammide. (Bangaresi et al., 2008).

Secondo lo studio condotto dall'Institute of Food Science and Nutrition di Zurigo (Amrein et al., 2006), la formazione di acrilammide sarebbe favorita dalla frammentazione degli zuccheri, che porta alla creazione di molecole come gliceraldeide, gliosale e metilgliosale (*Figura 2*). In particolare, il gliosale, è risultato essere il più reattivo e, se confrontato con l'utilizzo di due esosi (glucosio e fruttosio) a parità di condizioni, ha dimostrato portare allo sviluppo di acrilammide pari a 250 e 350 volte in più rispetto ai sistemi modello.

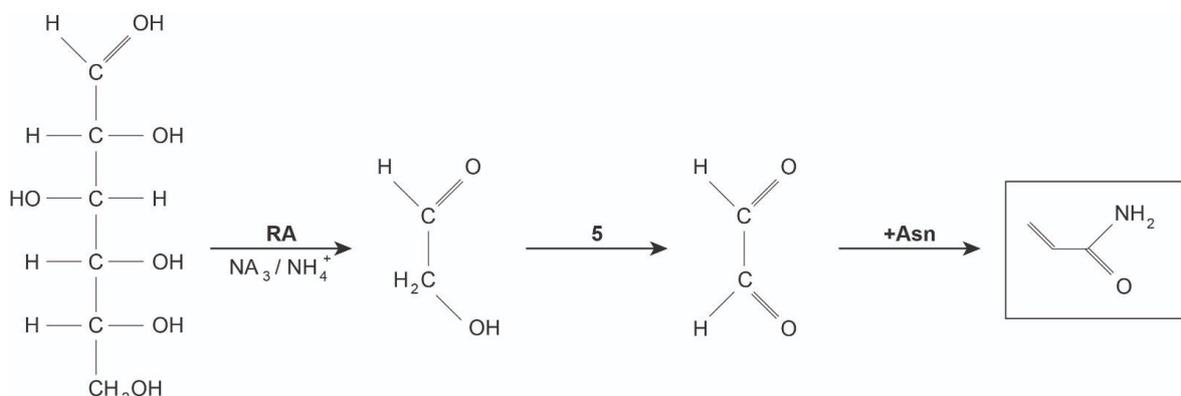


Figura 2. Formazione di acrilammide per frammentazione zuccheri. (Amrein et al., 2006).

È stato inoltre dimostrato che l'ossidazione lipidica può favorire anch'essa la formazione di acrilammide, questo perchè vengono generate molecole come il 2-ottale, 2,4-decadienale, benzaldeide e 4,5-epossi-2-decenale, in grado di innescare la reazione a partire da asparagina anche in assenza di zuccheri riducenti. (Hidalgo et al., 2010; Hidalgo et al., 2009; Zamora e Hidalgo, 2008). Nella figura seguente (Figura 3) vengono rappresentati tutti i possibili meccanismi di formazione di acrilammide.

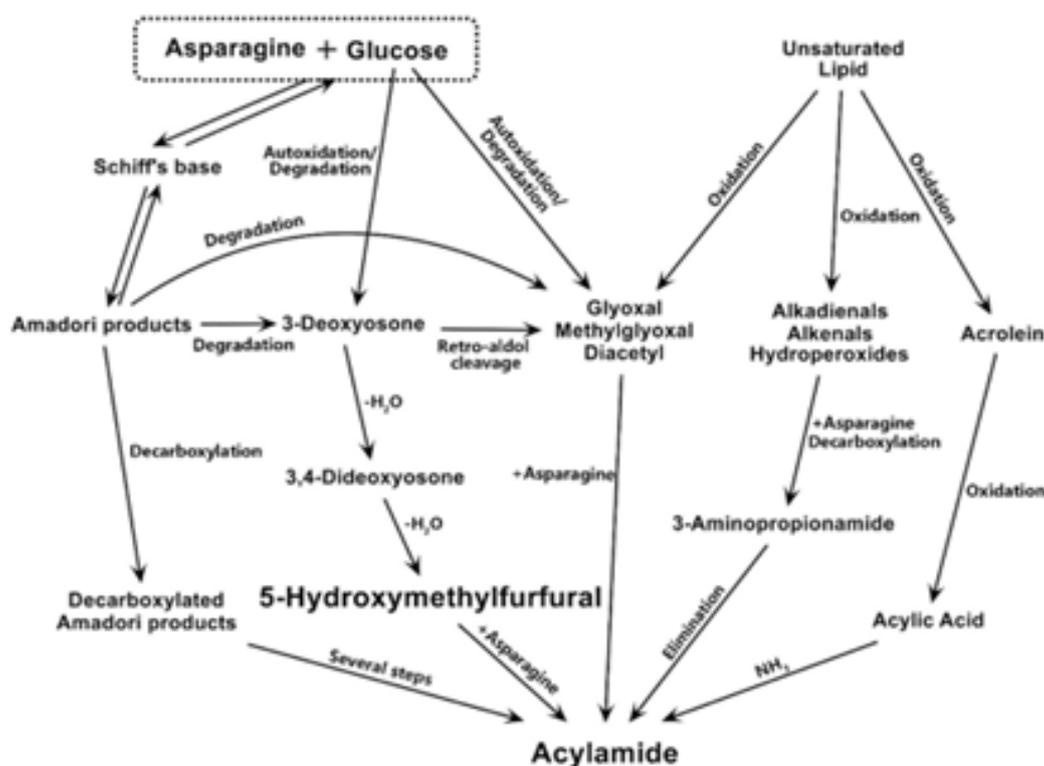


Figura 3. Schema riassuntivo della formazione di acrilammide. (Wang et al., 2019).

1.3. Fonti di esposizione

L'acrilammide è stata riscontrata in tantissimi alimenti di consumo quotidiano, per questo motivo le preoccupazioni riguardo la sua ingestione sono rivolte a tutti i consumatori. I bambini, in virtù del loro peso corporeo, sono considerati i soggetti più a rischio. (Reg. UE 2017/2158).

L'acrilammide, una volta ingerita, viene assorbita dall'intestino e metabolizzata sotto forma di glicidammide. Secondo studi condotti su animali da laboratorio, l'assunzione per via orale di questa molecola ha comportato una maggiore probabilità di sviluppare mutazioni genetiche del DNA e favorire perciò la comparsa del cancro. Alcuni studi suggeriscono inoltre che sia una sostanza neurotossica, in grado quindi di comportare disturbi neurologici, ma in entrambi i casi questi effetti

non sono stati confermati sugli esseri umani, poiché le ricerche danno risultati discordanti. Questi esperimenti, infatti, sono stati condotti utilizzando dosi molto elevate del composto, fino a 10.000 volte quelle assunte tramite una normale alimentazione. (IARC).

Per questo motivo, ad oggi, non è possibile stabilire una dose giornaliera tollerabile (DGT). Sono stati presi in considerazione anche i possibili effetti nocivi sul sistema nervoso, sullo sviluppo prenatale e postnatale e sul sistema riproduttivo maschile. Questi effetti non sono stati ritenuti motivo di preoccupazione, sulla base dei livelli di esposizione alimentare correnti. I livelli attuali di esposizione destano quindi preoccupazione in relazione ai suoi effetti cancerogeni. (EFSA).

A tal proposito, l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC), classifica l'acrilammide come una molecola "probabilmente cancerogena per l'uomo", inserendola nella categoria 2A.

Non potendo stabilire un DGT, gli esperti dell'EFSA hanno stimato l'intervallo di dosaggio entro il quale è probabile che l'acrilammide causi una lieve ma misurabile incidenza di tumori (effetti neoplastici) o di altri potenziali effetti avversi (neurologici, sullo sviluppo pre e postnatale e sul sistema riproduttivo maschile). Il limite inferiore di questo intervallo viene detto limite inferiore dell'intervallo di confidenza relativo alla dose di riferimento (BMDL10).

- Per i tumori gli esperti hanno scelto un BMDL10 di 0,17 mg/kg pc/giorno.
- Per altri effetti, i mutamenti neurologici più pertinenti al caso sono stati osservati con un BMDL10 di 0,43 mg/kg pc/giorno.

Confrontando il BMDL10 all'esposizione umana all'acrilammide, gli scienziati sono in grado di indicare un "livello di allarme per la salute" noto come "margine di esposizione" (MOE). Per sostanze genotossiche e cancerogene un MOE di 10 000 o più è di lieve preoccupazione per la salute pubblica. I MOE per gli effetti dell'acrilammide correlati al cancro variano da 425 per gli adulti medi consumatori fino ai 50 per i bambini piccoli che ne facciano un consumo elevato. Tali intervalli indicano un allarme per la salute pubblica. Per sostanze non genotossiche un MOE di 100 o più è di solito un indicatore di assenza di allarme per la salute pubblica. I MOE per gli effetti neurologici vanno da 1-075 per l'adulto medio consumatore a 126 per i bambini piccoli che ne facciano un consumo elevato.

Gli esperti dell'EFSA hanno concluso che, per questi effetti, gli attuali livelli di esposizione alimentare non danno adito a timori per la salute, anche se per i bambini e soprattutto i bambini piccoli forti consumatori il MOE è vicino ai valori che potrebbero costituire un allarme per quanto riguarda tali effetti.

I principali alimenti contenenti acrilammide sono le patate e i loro derivati, i cereali e il caffè. Questa molecola non si trova però solo nel cibo, ma due fonti importanti di esposizione sono il fumo del tabacco, e quindi le sigarette, e gli usi industriali di tale sostanza.

Per quanto riguarda il cibo, a seconda delle varie fasce d'età, possiamo affermare che i principali alimenti che contribuiscono all'esposizione dell'acrilammide sono:

- **Adulti:** prodotti a base di patate fritte (49%), caffè (34%), pane morbido (23%), biscotti, cracker e altri prodotti a base di patate.
- **Bambini:** prodotti a base di patate fritte (51%), pane morbido, cereali da colazione e biscotti (25%), dolci e pasticceria (15%), alimenti trasformati a base di cereali (14%) e patatine e snack (11%).
- **Neonati:** alimenti per bambini diversi da quelli trasformati a base di cereali" (60%), "altri prodotti a base di patate"(48%) e "alimenti trasformati per bambini a base di cereali" (soprattutto fette biscottate e biscotti) (30%).

Nel parere scientifico emanato dall'EFSA nel 2015 è inclusa una panoramica dei dati e della letteratura scientifica che sintetizza come la scelta degli ingredienti, il metodo di conservazione e la temperatura alla quale il cibo è cucinato possano influire molto sulla quantità finale di acrilammide nei diversi alimenti. Vengono infatti evidenziati alcuni suggerimenti e indicazioni come di seguito riportati:

1. Scelta degli ingredienti:

- I sucedanei del caffè a base di cicoria generalmente contenevano in media sei volte più acrilammide (3mg/kg) dei sucedanei a base di cereali (0,5 mg/kg).
- I prodotti fritti a base di pasta di patate (comprese patatine e snack) contengono in genere il 20% in meno di acrilammide (338µg/kg) di quelli ottenuti da patate fresche (392µg/kg).
- Le patate coltivate in terreno povero di zolfo accumulano di solito meno asparagina, riducendo la formazione di acrilamide durante la cottura.

2. Metodo di conservazione:

- La conservazione delle patate a una temperatura inferiore agli 8° C di solito ne aumenta i livelli di zucchero, con conseguente maggiore accumulo di acrilammide al termine della cottura.

- Mettere in ammollo le fette di patate in acqua o in una soluzione di acido citrico può ridurre i livelli di acrilammide nelle patatine rispettivamente fino al 40% o al 75%.

3. *Trasformazione (temperatura e durata):*

- Test effettuati da produttori e organizzazioni dei consumatori indicano che di solito le friggitrici ad aria calda producono oltre il 30-40% di acrilammide in più rispetto alle normali friggitrici a olio.
- La temperatura di solito aumenta i livelli di acrilammide nelle patate fritte più del tempo di cottura; la frittura sopra i 175 ° C può portare a un notevole aumento dei livelli.

4. *Cucina casalinga:*

- La preferenza del consumatore per le patatine fritte e arrosto croccanti e dorate così come in generale di altri prodotti fritti a base di patate può aumentare l'esposizione alimentare media del 64% (per i forti consumatori anche dell'80%).
- A parità di temperatura, tostare il pane per cinque minuti invece di tre può aumentare il contenuto di acrilammide da 31µg/kg fino a 118µg/kg, a seconda del tipo di pane. Il consumo di pane ben abbrustolito, tuttavia, aumenta l'esposizione alimentare media complessiva solo del 2,4%.

1.4. Legislazione Europea: Reg. UE 2017/2158

Sulla base di queste nuove direttive, il 20 novembre 2017, la Commissione Europea emana un Regolamento (Reg. UE 2017/2158) che istituisce le misure di attuazione e i livelli di riferimento per la riduzione della presenza di acrilammide negli alimenti. A norma dell'articolo 4 del regolamento (CE) n. 852/2004, gli operatori del settore alimentare hanno l'obbligo di seguire le procedure necessarie a raggiungere gli obiettivi fissati da tale regolamento. I livelli di riferimento sono solo degli indicatori, l'alimento può quindi essere commercializzato anche se supera i valori previsti per legge, ma l'addetto del settore alimentare deve comunque essere in grado di dimostrare alle Autorità, in caso di controllo, di aver fatto il possibile per ridurre la formazione di acrilammide in tali prodotti.

Nell'*Articolo 1* viene definito il campo di applicazione in cui è necessario monitorare il contenuto di acrilammide:

- patate fritte tagliate a bastoncino, altri prodotti tagliati fritti e patatine (chips), attenuti a partire da patate fresche;

- patatine, snack, cracker e altri prodotti a base di patate ottenuti a partire da pasta di patate;
- pane;
- cereali per la prima colazione (escluso il porridge);
- prodotti da forno fini: biscotti, gallette, fette biscottate, barrette ai cereali, scones, coni, cialde, crumpets e pane con spezie (panpepato), nonché cracker e sostituti del pane.
- caffè: torrefatto e solubile;
- sucedanei del caffè;
- alimenti per la prima infanzia e alimenti a base di cereali destinati ai lattanti e ai bambini nella prima infanzia, quali definiti nel regolamento (UE) n. 609/2013 del Parlamento europeo e del Consiglio.

Nell'*Allegato I dell'Articolo 2* vengono riportate le misure di attuazione suddivise secondo le sopracitate categorie alimentari. Per quanto riguarda i prodotti da forno fini, le raccomandazioni sono suddivise in tre categorie: agronomia, ricetta e progettazione del prodotto, e lavorazione.

A livello agronomico si consiglia una buona concimazione, soprattutto riferita al tenore di zolfo nel terreno e di seguire buone pratiche fitosanitarie al fine di evitare infezioni fungine.

A livello di formulazione si consigliano le seguenti misure:

- ridurre o sostituire il bicarbonato di ammonio come agente lievitante;
- sostituire il fruttosio o altri ingredienti che lo contengono;
- utilizzare l'asparaginasi;
- sostituire parzialmente la farina di frumento con altre farine di cereali;
- fare una valutazione del rischio circa l'aggiunta di altri ingredienti precedentemente sottoposti a trattamenti termici spinti (es. tostatura);
- verificare che i fornitori di tali ingredienti seguono le opportune misure di attuazione;
- garantire che una modifica dei prodotti acquistati dai fornitori non determini un aumento del tenore di acrilammide;

- valutare la possibilità di aggiungere acidi organici al fine di ridurre il pH del prodotto, senza comportare cambiamenti organolettici.

Infine, a livello di processo, gli OSA devono tenere in considerazione:

- i parametri di temperatura e tempo di applicazione del calore, che influiscono in modo significativo sulla formazione di questa molecola;
- il possibile aumento di umidità nel prodotto finale, in relazione alla shelf-life e alla sicurezza alimentare;
- il fatto che un prodotto di piccole dimensioni potenzialmente presenta un tenore di acrilammide più elevato a causa dell’impatto del calore.

Nell’*Allegato IV* vengono tabulati i livelli di riferimento delle varie categorie commerciali. Per i prodotti da forno fini, il valore è posto a 350 µg/kg, mentre se riferiti ai lattanti e bambini nella prima infanzia, il valore viene abbassato a 150 µg/kg.

1.5. Nuove proposte in ambito legislativo

Il 22 dicembre 2021, l’Unione Italiana Food, associazione di rappresentanza delle categorie merceologiche alimentari, autrice di articoli e linee guida circa le novità in ambito alimentare, ha inviato alle aziende associate un’analisi sui livelli di acrilammide nei prodotti a base di cereali (*Tabella 1*) nel periodo 2015-2019.

PRODOTTI ALIMENTARI	LIVELLI DI RIFERIMENTO (µg/kg)	NUMERO DI CAMPIONI	MEDIA (µg/kg)	VALORE MIN	VALORE MAX
Biscotti e cialde	350	99	267	< 15	960
Biscotti e cialde integrali	350	44	341	30	590

Tabella 1. *Analisi dati 2015-2019 sui livelli di acrilammide in prodotti a base di cereali, in particolare biscotti e cialde. Fonte: Unione Italiana Food.*

Questa informativa voleva comunicare alle aziende l’intenzione, da parte della Commissione Europea, di proporre una revisione dei livelli di riferimento e introdurre dei livelli massimi di acrilammide negli alimenti. In particolare, per la sezione biscotti e cialde la proposta sarebbe quella di ridurre gli attuali valori di riferimento a 100 µg/kg e porre un limite massimo pari a 125 µg/kg, facendo rientrare i biscotti, di fatto, in una sottocategoria più estesa, comprendente

anche prodotti di uso corrente il cui marketing è rivolto ai bambini. A tal proposito, l'Unione Italiana Food è già intervenuta sul Ministero della Salute per sottolineare la grande preoccupazione per tutta la produzione italiana di biscotti, che come vediamo in tabella (*Tabella 1*) presenta una media ben al di sopra dei valori di riferimento e massimi proposti. (Acrilammide - Targeted Stakeholder Consultation su livelli di riferimento e introduzione di livelli massimi. 22 dicembre 2021. Prot. 2410).

Capitolo 2

Strategie di mitigazione

Il seguente capitolo prende in considerazione i fattori genetici, di formulazione e di processo che possono influenzare lo sviluppo di acrilammide nella matrice biscotto.

2.1. Fattori genetici e agronomici

L'asparagina è stato il primo amminoacido ad essere scoperto, nel 1806 dai due chimici francesi Vauquelin e Robiquet, che iniziarono a studiare i caratteristici cristalli cubici osservati nella linfa degli asparagi, da cui prenderà il nome questa molecola.

L'accumulo di asparagina all'interno delle piante è fortemente influenzato da fattori genetici e agronomici, in particolare:

- componente minerale del terreno
- stress abiotico
- attacco da parte di patogeni.

Come vediamo in *Figura 4*, il numero di atomi di carbonio che compongono la molecola sono 4, contro i 2 di azoto. Questo rapporto, C:N 4:2, fa sì che l'asparagina sia un amminoacido molto efficiente per lo stoccaggio e il trasporto di azoto negli organismi viventi, in particolare nelle leguminose. (Lea et al., 2007).

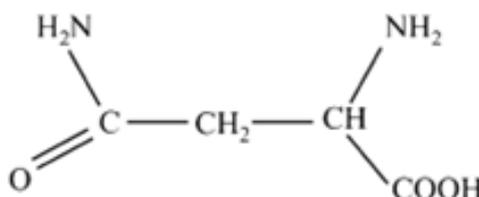


Figura 4. *Struttura chimica dell'asparagina. (Lea et al.,2007).*

2.1.1. Componente minerale del terreno

La disponibilità di minerali ha una notevole influenza sull'accumulo di asparagina libera nei chicchi dei cereali, in particolare in presenza di un'abbondante scorta di azoto e carenza di altri minerali quali zolfo, potassio, fosforo e magnesio. È quindi evidente una correlazione positiva tra concentrazione di azoto nel terreno e asparagina nelle piante. Nello specifico, nel grano, è soprattutto la carenza di zolfo che fa aumentare in maniera elevata la presenza di asparagina nell'endosperma della cariosside, quando, al contrario, in condizioni normali, si accumula principalmente nel germe. (Lea et al., 2007). Da questo si capisce che le farine integrali, essendo

costituite non solo dall'endosperma, ma anche da germe e crusca, sono generalmente più propense ad accumulare asparagina rispetto alle farine più raffinate. In quest'ultime, però, la sua maggiore concentrazione è fortemente influenzata dalla solfuro deficienza. (Gao et al., 2016).

Numerosi studi condotti su diversi tipi di vegetali hanno dimostrato che la carenza di alcuni minerali comporta una sintesi proteica non regolare. In risposta alla mancanza di zolfo, il metabolismo vegetale mette in pratica tre processi principali:

- ridotta biosintesi di cisteina, glutatione (GSH) e S-adenosilmetionina (SAM)
- accumulo di glutammina, asparagina e ureidi
- disturbi nella rimozione dell'ossigeno da parte del sistema GSH-ascorbato.

Come vediamo, quindi, quest'alterazione porta ad un'anormale sintesi proteica e ad un incremento di asparagina sul totale degli amminoacidi presenti. (Nikiforova et al., 2006).

2.1.2. Stress biotico e abiotico

Anche fattori di stress a cui la pianta può essere sottoposta possono determinare un diverso accumulo di asparagina al suo interno.

Alcuni studi condotti negli anni '80 hanno dimostrato che nelle piante esposte a metalli pesanti come cadmio, piombo e zinco, si accumulano amminoacidi specifici come prolina e istidina, che possono avere una funzione benefica. Allo stesso modo, è stato visto che l'asparagina è in grado di formare dei complessi intracellulari con lo zinco, diminuendone la sua tossicità. (Sharma & Dietz, 2006).

Altri stress, causati da un'eccessiva salinità o siccità del terreno sembrerebbero aumentare la produzione di prolina, in quanto questo amminoacido è in grado di contribuire al mantenimento della pressione osmotica delle cellule, fondamentale per la loro sopravvivenza. Tuttavia, sembrerebbe che anche l'asparagina si accumuli contemporaneamente ad essa, sebbene in misura diversa. Dallo studio di Colmer et al. (1995), infatti, le piantine trattate con 200 mM di NaCl hanno visto un incremento di asparagina nelle foglie più giovani e di prolina in quelle più vecchie. Al contrario, nello studio condotto da Garthwaite et al. (2005), in cui l'orzo veniva trattato con 450 mM di NaCl, si è vista una concentrazione quadruplicata del contenuto di prolina rispetto all'asparagina, indipendentemente dall'età delle foglie.

Sembrerebbe inoltre, come dimostrato da Perez-Garcia et al. (2008), che anche l'attacco da parte di patogeni, come *Pseudomonas syringae* su foglie di pomodoro, abbia comportato un aumento di 20 volte il contenuto di asparagina nelle piantine infette.

2.1.3. Possibili strategie di mitigazione

L'asparagina si origina per ammidazione dell'aspartato da parte della glutammina, che cede il suo gruppo amminico (Figura 5). La reazione è catalizzata dall'asparagina sintasi, in presenza di ATP.

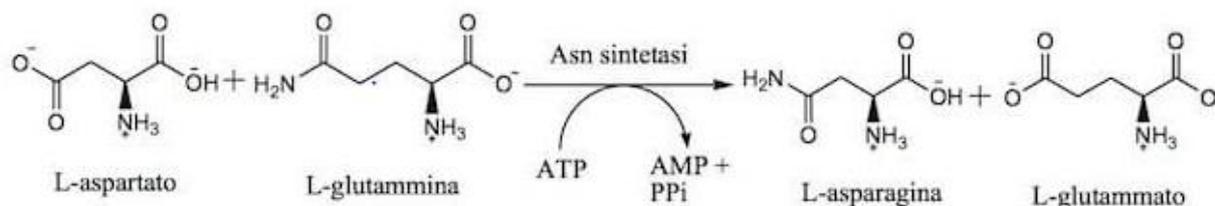


Figura 5. Formazione dell'asparagina.

I geni responsabili della sintesi di questo enzima sono stati riscontrati per la prima volta nel frumento (*Triticum aestivum*) e chiamati TaASN1 e TaASN2. Come visto in precedenza, la produzione di asparagina è influenzata da stress salino e osmotico, ed è stato dimostrato che l'espressione del gene TaASN1 è sovraregolata da questi due fattori, oltre che dal trattamento con acido abscissico (ABA). (Gao et al., 2016).

I geni TaASN2 sono quelli maggiormente espressi per la sintesi dell'asparagina sintasi e la loro espressione nell'embrione sembrerebbe essere un fattore chiave per determinare la concentrazione di asparagina libera nel chicco di grano. Per questo motivo, la delezione, ovvero una mutazione cromosomica che determina l'assenza di un tratto di cromosoma in maniera irreversibile, del gene in questione, potrebbe portare allo sviluppo di varietà di grani con minore concentrazione di asparagina libera (Oddy et al., 2021).

L'utilizzo di farine OGM potrebbe quindi rappresentare una possibile soluzione per quanto riguarda la mitigazione dell'asparagina e, conseguentemente, dell'acrilammide. Ad oggi, sono stati effettuati studi a riguardo, che prendono in considerazione il gene dell'asparagina sintasi nelle patate. Queste varietà, a basso contenuto di asparagina, chiamate Innate® e Innate® Generation 2, sono già commercializzate negli Stati Uniti e in Canada dalla Simplot Company. Dalle analisi condotte fino ad ora, sembrerebbe che procedendo in questa direzione si riesca a ridurre notevolmente la formazione di acrilammide, arrivando anche al 90% in meno rispetto alle patate convenzionali. (Raffan et al., 2019).

2.2. Formulazione di prodotto

Nello sviluppo di un nuovo prodotto, sia per quanto riguarda la formulazione che la stabilizzazione dei parametri di processo, è necessario considerare alcuni aspetti di base che possono contribuire in senso positivo o negativo allo sviluppo di acrilammide.

In primo luogo, bisogna tenere conto delle dimensioni del prodotto, in quanto un elevato rapporto superficie (S)/volume (V) determina una maggior superficie di esposizione del prodotto e, se confrontato con un prodotto analogo avente un rapporto S/V più basso, a parità di temperatura e impostazioni del forno, il calore avrà un effetto più incidente.

Un altro aspetto da considerare è la quantità d'acqua presente nell'impasto. L'acqua, infatti, favorisce la mobilità dei reagenti e, di conseguenza, asparagina e zuccheri riducenti avranno una probabilità maggiore di incontrarsi e reagire all'interno del sistema. D'altro canto, però, favorisce anche la mobilità dell'asparaginasi che, come vedremo nei prossimi capitoli, svolge un ruolo fondamentale per ridurre il livello di acrilammide nel prodotto. L'esperimento di Hanne et al. (2009) mette in evidenza quest'aspetto. In tale studio sono stati confrontati impasti diversi di biscotti allo zenzero, rispettivamente contenenti il 15%, 13% e 11% di acqua, a parità di altre condizioni. Nel primo caso, il contenuto di acrilammide si è ridotto del 34% rispetto alla ricetta standard; un contenuto del 13% di acqua ha comportato una riduzione del 19%; mentre nell'ultimo caso l'enzima non ha avuto alcun effetto. Infine, è stata testata anche un'ultima prova, con il 19% di acqua, che ha comportato una riduzione del 90% la formazione di acrilammide.

Infine, anche l'aggiunta di altri ingredienti che hanno subito dei trattamenti termici spinti in precedenza, può determinare in maniera significativa l'ammontare di acrilammide nel prodotto. Tra questi ingredienti ricordiamo ad esempio mandorle o altra frutta secca tostata, semi tostati e cacao.

Tra i biscotti presi in considerazione in questo studio, infatti, vedremo frollini contenenti fiocchi d'avena e frollini con semi di chia e quinoa.

2.2.1. Tipologia di farina

Come già anticipato nel capitolo *2.1.1.-Componente minerale del terreno*, le diverse tipologie di farina possono sviluppare una maggior o minor concentrazione di acrilammide a seconda del contenuto di asparagina al loro interno. Risulta inoltre importante anche la loro composizione in zuccheri.

Il frumento è il cereale più coltivato e consumato in Italia. Appartiene al genere *Triticum*, al quale appartengono diverse specie che si differenziano per il numero di cromosomi. A livello compositivo, partendo dall'esterno verso l'interno, nel chicco si distinguono i seguenti componenti:

1. Pericarpo, perisperma e strato aleuronico: particolarmente ricchi in proteine, sali minerali, vitamine e fibra. Insieme, costituiscono la crusca;
2. Endosperma: parte intermedia ricca di amido e proteine;
3. Germe: costituente ricco in glucidi solubili (saccarosio e raffinosa principalmente), proteine, vitamine, lipidi ed enzimi.

Il rapporto crusca/sfarinato determina il grado di raffinazione della farina e, di conseguenza, anche la percentuale di proteine, sali minerali, fibra e vitamine che otterremo in seguito alla macinazione. Per quanto riguarda la farina integrale, definita dal DPR n°187/2001, come “*il prodotto ottenuto direttamente dalla macinazione del grano tenero liberato dalle sostanze estranee e dalle impurità*”, ritroviamo quindi al suo interno l'intera cariosside, comprendente tutti e tre i costituenti principali del chicco di grano.

Dallo studio condotto da Hamlet et al. (2008), che mette in relazione la quantità di amminoacidi liberi, zuccheri e acrilammide nelle farine integrali rispetto alla farina bianca raffinata, è emerso che quest'ultima conteneva una quantità molto bassa di asparagina (141 mg/Kg), contro il germe (1506 mg/Kg) e la crusca (911 mg/Kg) macinati. Tuttavia, però, c'è da ricordare che il germe rappresenta una minima parte del totale della cariosside, per cui si può affermare che sia la crusca a dare il contributo principale al contenuto complessivo di asparagina nella farina integrale.

Ampliando il discorso, se confrontiamo non più solo farina integrale e raffinata, entrambe di grano tenero, e prendiamo in considerazione anche altre origini botaniche, possiamo vedere come la formazione di acrilammide sia influenzata dalla diversa concentrazione di asparagina e di zuccheri. Diversi studi condotti da Žilić et al. (2020), infatti, ci hanno permesso di mettere in ordine decrescente le diverse tipologie di farina in base al loro contenuto di asparagina: riso > segale > avena senza scafo > mais dentato > orzo senza scafo > grano duro > grano tenero.

Anche il contenuto di zuccheri varia molto, in particolare mais e riso contengono rispettivamente la più alta (53%) e la più bassa (31%) percentuale di disaccaridi sul totale degli zuccheri. Il più alto contenuto di zuccheri totali e riducenti è da attribuire invece alla segale (2,28% e 2,02% rispettivamente), mentre il più basso alle varietà di grano tenero (0,34%). In assoluto, il contenuto di monosaccaridi inferiore è stato riscontrato nell'orzo senza scafo. (Žilić et al., 2017).

2.2.2. Tipologia di zucchero

Come visto in precedenza, la reazione di Maillard è alla base della formazione di acrilammide. Essendo una reazione chimica, il tasso di produzione di questa molecola sarà fortemente influenzato dalla concentrazione dei due reagenti: l'asparagina e gli zuccheri riducenti.

Uno zucchero si definisce riducente se presenta l'estremità aldeidica o chetonica libera, che gli consente di reagire e ridurre un'altra molecola, ossidandosi a sua volta. Ne sono un esempio i monosaccaridi e alcuni disaccaridi come lattosio e maltosio. Quando uno zucchero riducente reagisce con un amminogruppo forma un composto ibrido zucchero-amminoacido, detto glicosammina, grazie all'eliminazione di una molecola d'acqua. Questo prodotto è però instabile e perde facilmente una molecola di CO_2 , diventando così una immina secondaria, meglio conosciuta come la base di Schiff (*Figura 6*).

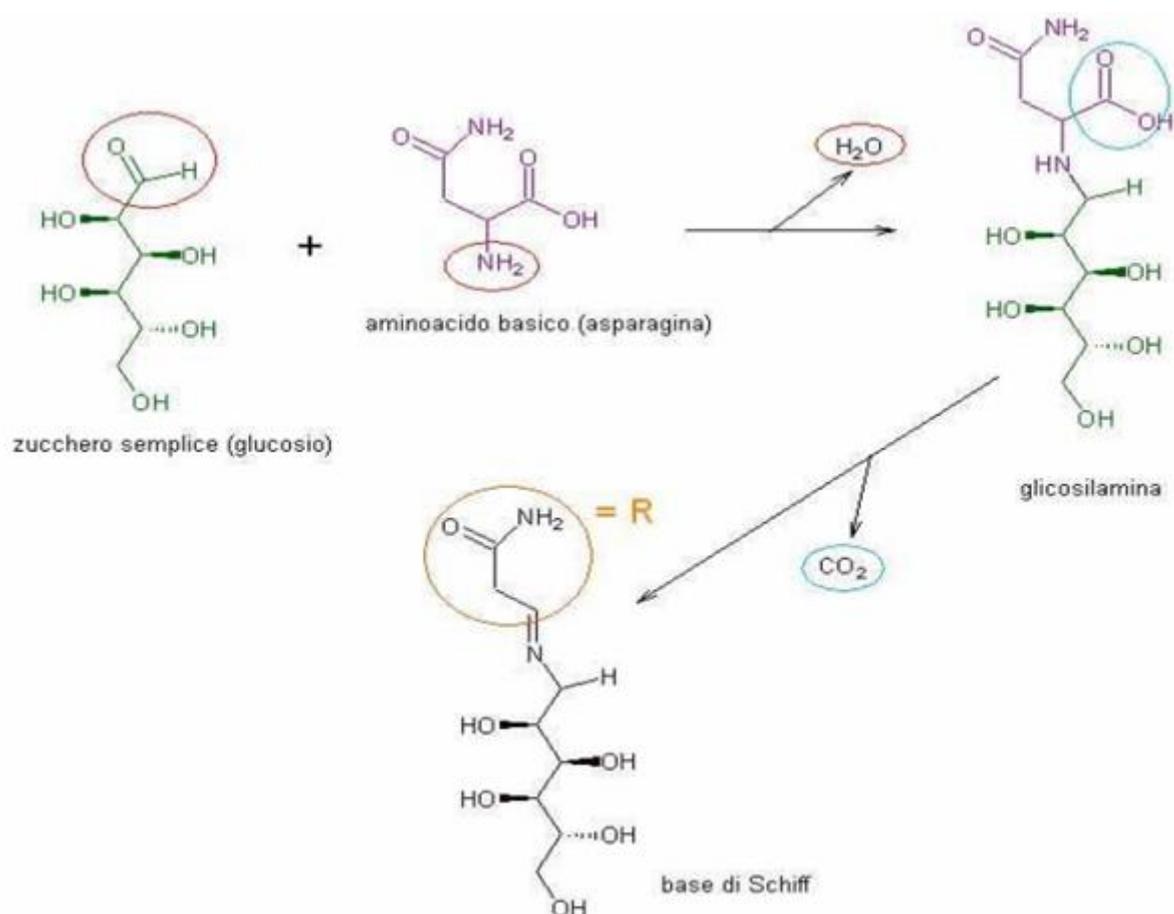


Figura 6. *Formazione base di Schiff.*

Quest'ultima, in seguito allo spostamento del doppio legame, tramite tautomeria cheto-enolica, può dar vita al composto di Amadori (nel caso si parta da un aldoso) o al composto di Heyns (nel caso si parta da un chetoso). (*Figura 7*).

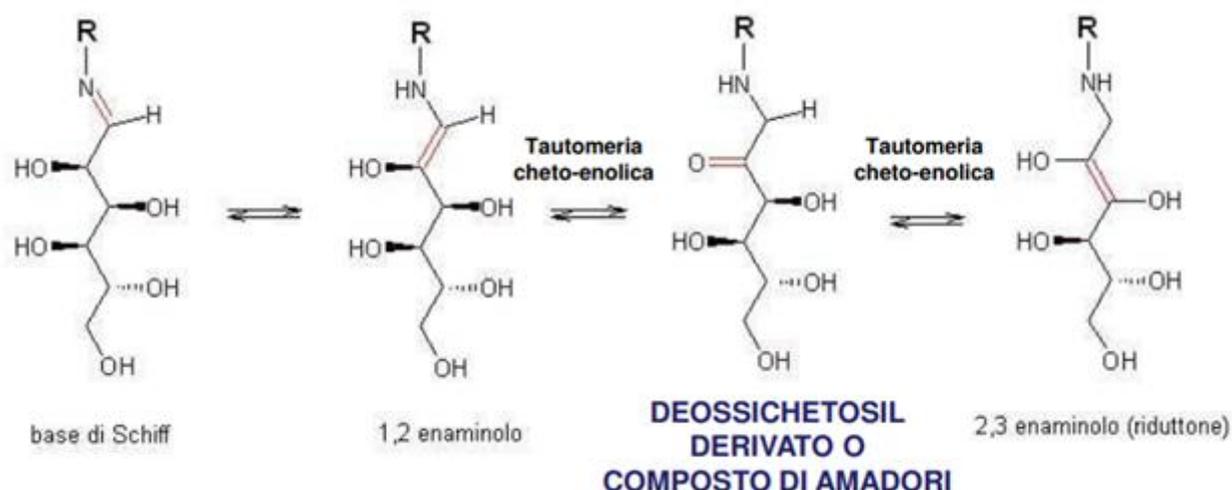


Figura 7. *Formazione composto di Amadori.*

Questi prodotti si disidratano e frammentano, formando composti α -dicarbonilici, che non presentano più il gruppo amminico all'estremità della molecola. Si tratta di composti estremamente reattivi, che possono seguire diverse vie di trasformazione e cioè:

- ciclizzare;
- scindersi a formare composti carbonilici o dicarbonilici a basso peso molecolare;
- reagire con altri composti: reazione di Strecker;
- condensare a melanoidine.

Sicuramente la via più frequente e nota è quella della reazione di Strecker, dove i composti α -dicarbonilici reagiscono nuovamente con una molecola di asparagina.

È importante sottolineare che nonostante sia necessaria la presenza di zuccheri riducenti affinché avvenga la reazione di Maillard, non tutti gli zuccheri hanno la stessa capacità di formare acrilammide. Nello studio condotto da Wang et al. (2014), infatti, viene messa a confronto la produzione di questa molecola target da parte di quattro diversi monosaccaridi (glucosio, fruttosio, xilitolo e galattosio) e due disaccaridi (lattosio e maltosio) con tre amminoacidi diversi. L'esperimento ha dimostrato che i monosaccaridi sono molto più reattivi dei disaccaridi, e la loro capacità di formare acrilammide, a parità di condizioni, ha dato i seguenti risultati: Glucosio (0,1103 $\mu\text{g/mL}$) > Fruttosio (0,0963 $\mu\text{g/mL}$) > Xylosio (0,0459 $\mu\text{g/mL}$) > Galattosio (0,0449 $\mu\text{g/mL}$) > Maltosio (0,03751 $\mu\text{g/mL}$) > Lattosio (0,0175 $\mu\text{g/mL}$).

D'altra parte, però, anche gli amminoacidi non sono tutti uguali. Nello stesso studio, è stata confrontata la capacità di formare acrilammide da parte di asparagina, glicina e acido glutammico, con glucosio, dando i seguenti risultati: Asparagina (0,1154 µg/mL) > Glicina (0,0282 µg/mL) > Acido glutammico (0,0101 µg/mL).

Risultati diversi sono invece stati ottenuti dallo studio di Robert et al. (2004), nel quale sono stati confrontati i valori di acrilammide ottenuti da miscele binarie asparagina-zuccheri riducenti, in condizioni di bassa umidità. Contrariamente a quanto ci si poteva aspettare, confrontando un chetoso (es. fruttosio) con un aldoso (es. glucosio), il primo è risultato produrre molta più acrilammide rispetto all'aldoso, nonostante il gruppo chetonico sia meno reattivo. Questo comportamento anomalo non è riconducibile alla reattività dei due gruppi, bensì al fatto che il fruttosio ha una temperatura di fusione più bassa rispetto al glucosio, per cui inizia a formare acrilammide già a 123-127°C, contro i 146-152°C del glucosio.

L'utilizzo di uno zucchero non riducente come il saccarosio, invece, non favorisce la reazione di Maillard, e di conseguenza avremo anche un colore più chiaro del prodotto finito, senza avere differenze significative per quanto riguarda l'aspetto organolettico. Lo studio condotto da Graf et al. (2006) ha evidenziato una notevole riduzione del contenuto di acrilammide nei biscotti, fino al 70%, sostituendo lo zucchero invertito con il saccarosio. Il saccarosio, infatti, deve essere idrolizzato nei suoi due componenti principali, ovvero glucosio e fruttosio, prima di produrre acrilammide.

2.2.3. Dosaggio di bicarbonato di ammonio (NH₄HCO₃)

I principali agenti lievitanti utilizzati dall'industria dolciaria sono il bicarbonato di sodio (NaHCO₃) e il bicarbonato di ammonio (NH₄HCO₃). Entrambi rilasciano CO₂ quando esposti al calore, favorendo la lievitazione del prodotto.

Diversi studi (Amrein et al., 2006; Schouten et al., 2022) hanno evidenziato che l'utilizzo dell'ammonio favorisce in modo significativo la formazione di acrilammide, in quanto determina la frammentazione degli zuccheri presenti nel sistema. Frammentandosi in molecole più piccole, infatti, gli zuccheri risultano essere molto più reattivi, e, come anticipato in precedenza (*1.2. Meccanismo di reazione*), il gliosale risulta essere la molecola target per eccellenza.

La differenza principale per la formazione di acrilammide tra i due agenti lievitanti sta nel fatto che il gruppo amminico (NH₃) del bicarbonato di ammonio si comporta da nucleofilo, attaccando il gruppo carbonilico degli zuccheri. L'immina così formata favorisce la generazione dei glucosoni

che, in seguito a retro-aldolazione, vengono convertiti in frammenti molto reattivi come gliosale e metilgliosale.

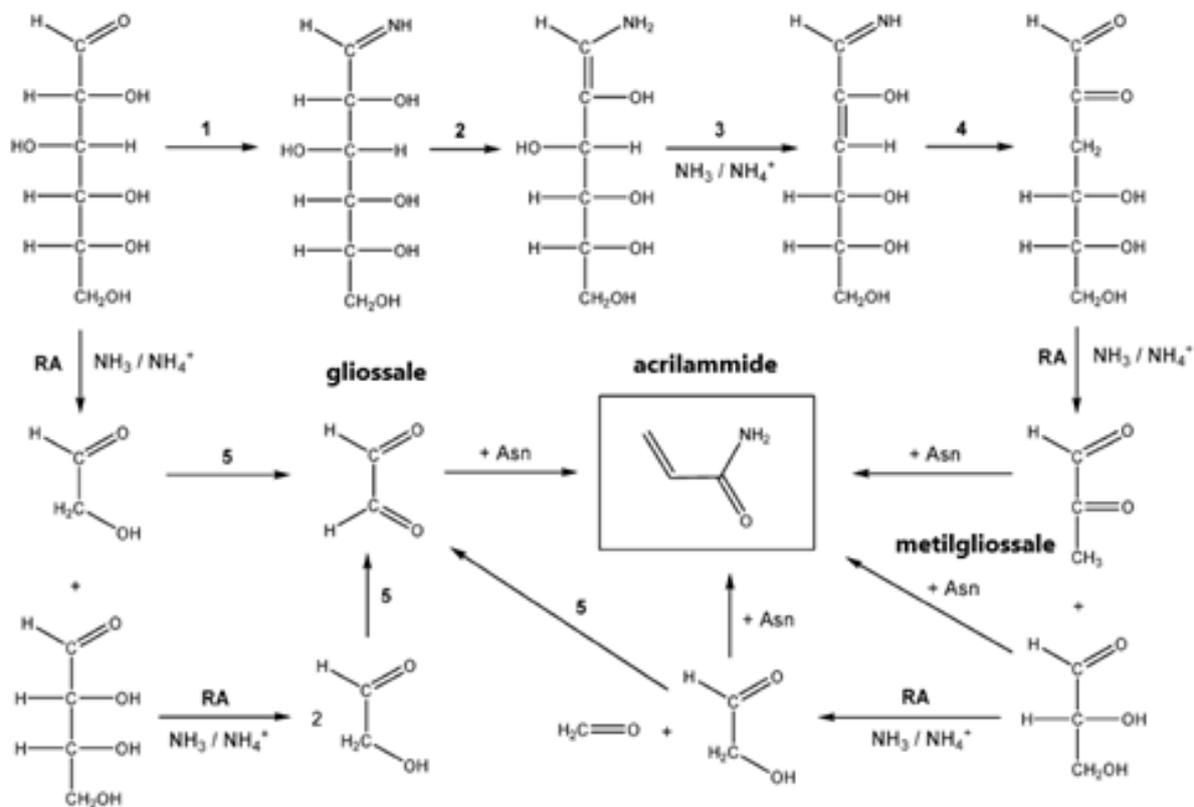


Figura 8. Formazione dei frammenti di zucchero a partire da glucosio. 1- formazione immina; 2- tautomeria immina-enammina; 3- disidratazione; 4- idrolisi; 5- ossidazione; RA- retro-aldolazione). (Amrein et al., 2006).

Al contrario, l'utilizzo di NaHCO_3 bypassa questo problema, con conseguenti valori più bassi di acrilammide. La sostituzione del bicarbonato di ammonio con il sodio ha dimostrato di ridurre il contenuto di acrilammide fino al 60%. La combinazione NaHCO_3 -acido tartarico è riuscita a raggiungere livelli di mitigazione anche del 90%. (Figura 9). (Amrein et al., 2007).

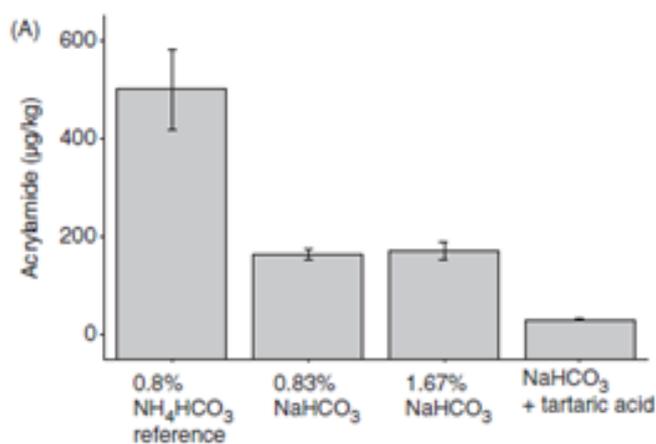


Figura 9. Livello di formazione di acrilammide in biscotti pan di zenzero con l'utilizzo di diversi agenti lievitanti. (Amrein et al., 2007).

2.2.4. Riduzione del pH

L'aggiunta di acidi organici, come citrico e tartarico, è una pratica comune nei prodotti da forno, non solo poiché favoriscono la lievitazione in combinazione con il bicarbonato, innescando una reazione acido-base con rilascio di CO₂, ma anche perché permettono di ridurre il pH del prodotto finale.

Numerosi studi in letteratura hanno dimostrato che l'abbassamento del pH è favorevole per quanto riguarda la riduzione dello sviluppo di acrilammide. L'acidità degli acidi grassi sembrerebbe interferire con la Maillard, riducendo la velocità di reazione e il grado di imbrunimento. Nel lavoro di Wang et al. (2019), sono stati indagati gli effetti di tre tipi di acidi grassi (FFAs: oleico, linoleico e linolenico) e due trigliceridi (TGs: trioleina e trilinoleina) sulla formazione di acrilammide in sistemi modello, dopo l'esposizione a condizioni simulate di frittura. Come controllo è stato usato un sistema contenente solo asparagina e glucosio. Inizialmente, sono stati analizzati solo campioni con fase acquosa tamponata e non. Il sistema non tamponato (acqua distillata pura) aveva un pH di 4,6, mentre quello bufferizzato (soluzione di acetato di sodio), pari a 6. I dati ottenuti sono risultati concordi con altri studi precedenti, secondo cui i livelli di acrilammide sono sempre più elevati nei sistemi tamponati, ciò significa che il pH è un fattore determinante. Successivamente, sono stati aggiunti alle due soluzioni anche gli acidi organici. L'addizione di FFAs ha ridotto la formazione di acrilammide nel sistema non tamponato, mentre l'ha aumentata nella soluzione di acetato. In entrambi i casi, in accordo con altri studi, non è stata dimostrata alcuna correlazione tra il livello di acrilammide e il grado di insaturazione e/o la concentrazione degli acidi grassi. Tuttavia, sono state notate delle differenze tra FFA e TG, per cui sembrerebbe che il tipo di lipide possa influenzare la formazione di acrilammide. In particolare, gli acidi grassi hanno portato ad un minor sviluppo se confrontati con i rispettivi trigliceridi (ad esempio acido linolenico e trilinoleina).

Lo studio appena descritto è stato condotto utilizzando sistemi modello con fasi acquose, ma l'aggiunta di acidi organici è stata presa in considerazione anche su scala industriale. Amrein e collaboratori (2004) hanno dimostrato che l'aggiunta di 0,5 e 1,0 g di acido citrico/100g di impasto di biscotti pan di zenzero, hanno ridotto il pH di partenza, pari a 6,9, a valori di 5,6 e 5,0, con conseguente riduzione della concentrazione di acrilammide di un fattore pari a 4 e 40, rispettivamente. Questo evento può essere spiegato dal fatto che il gruppo amminico dell'asparagina, in condizioni di acidità, si protona, e, non agendo più da nucleofilo, ostacola di fatto la formazione della glicosilammina.

Inoltre, sembrerebbe che la produzione di 3-deossiglucosone (3-DG), un composto α -dicarbonilico estremamente reattivo, sia favorita dall'acidità del sistema apportata dagli acidi grassi, che promuove l'enolizzazione degli zuccheri (Wang et al., 2019). 3-DG e acrilammide sono negativamente correlati tra loro. Metilgliossale (MGO), gliossale (GO) e diacetile (DA) sono invece positivamente correlati con l'acrilammide, per cui bassi livelli di questa molecola sono dovuti alla riduzione dei suoi precursori. Tuttavia, questi composti hanno corta catena e sono volatili, per cui possono facilmente evaporare e contribuire alla riduzione dei composti α -dicarbonilici nel sistema finale, in seguito a frittura.

2.2.5. Ossidazione lipidica

È stato osservato inoltre che l'ossidazione lipidica può favorire la conversione dell'asparagina in acrilammide. Come riportato nello schema in *Figura 3*, la degradazione dei lipidi può dare origine a composti quali gliossale, metilgliossale e diacetile; alcadienali, alchenali e idroperossidi; acroleina. Questi composti, in seguito a ulteriori reazioni o reagendo direttamente con l'asparagina, portano alla produzione di acrilammide. L'acido acrilico ottenuto dalla degradazione dell'acroleina, è in grado di reagire con l'ammoniaca e formare acrilammide tramite amminodeidrossilazione (Yaylayan et al., 2005). Anche l'acido aspartico può rilasciare acido acrilico, senza il coinvolgimento degli zuccheri o di una qualsiasi fonte carbonilica, a seguito di decarbossilazione e deaminazione. Tuttavia, la presenza di acido acrilico negli alimenti è limitata, a causa della ridotta presenza di ammoniaca libera e della necessità di temperature molto elevate per far sì che questa reazione avvenga. Anche altri amminoacidi possono generare acrilammide, come ad esempio la cisteina, che può essere convertita in acido lattico e poi piruvico, che, in presenza di ammoniaca, genera lattamide e acrilammide.

L'ossidazione lipidica sembrerebbe promuovere anche la formazione di un'altra molecola, l'idrossimetilfurfurale (HFM). Si tratta di un contaminante di processo potenzialmente cancerogeno (gruppo 2B per l'IARC). Wang e collaboratori (2019) hanno inizialmente indagato la correlazione tra lo sviluppo di questa molecola e la presenza di lipidi insaturi in sistemi modello tamponati e non, e successivamente la sua relazione con l'acrilammide.

Sono stati quindi confrontati tre acidi grassi a diverso grado di insaturazione (acido oleico, linoleico e linolenico) con il controllo, contenente solo asparagina e glucosio. Come mostrato in *Figura 10*, sembrerebbe che la formazione di HFM aumenti con il grado di insaturazione dell'acido grasso. Tuttavia, il meccanismo di reazione di produzione di questa molecola, in seguito a ossidazione, non è ancora del tutto chiaro.

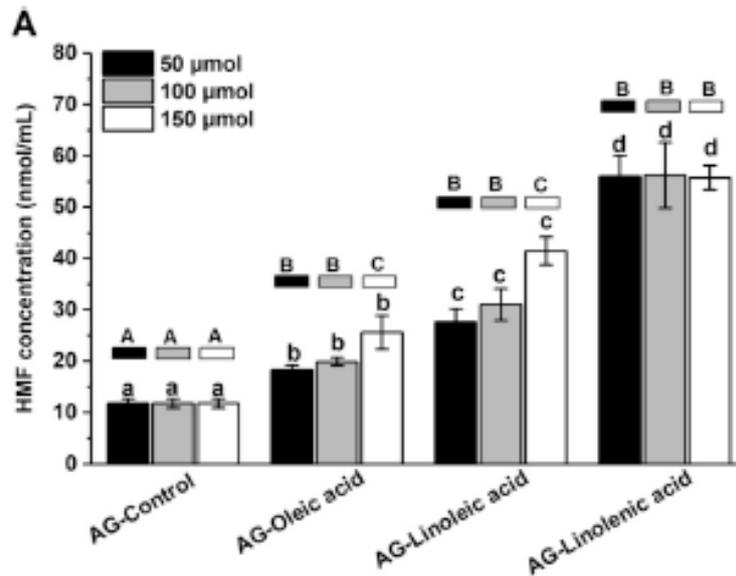


Figura 10. Relazione tra concentrazione di HFM e acidi grassi a diversi livelli di insaturazione. (Wang et al., 2019).

Per quanto riguarda invece lo sviluppo di acrilammide in presenza di HFM, i due composti sono negativamente correlati tra loro: all'aumentare di HFM, diminuisce il livello di acrilammide. L'HFM, infatti, può essere convertito in acrilammide reagendo lui stesso con l'asparagina, ma la presenza di lipidi insaturi sembrerebbe bloccare questa conversione nei sistemi non tamponati. Successivamente, sono state ricercate altre correlazioni tra i precursori dell'acrilammide (MGO e DA) e HFM. Anche in questo caso risultano negativamente correlati tra loro. MGO si può formare tramite retro-aldolazione del 3-DG, ma l'aggiunta di lipidi insaturi al sistema sembrerebbe innescare la conversione del 3-DG in HFM, piuttosto che in MGO.

2.2.6. Effetto del tipo di grasso

Al contrario dell'acqua, la presenza di grassi in un sistema ostacola l'interazione tra le varie molecole, poiché i lipidi si interpongono tra di esse, riducendo la probabilità di incontrarsi e reagire. Lo studio riportato da Anese et al. (2011) prende in considerazione quest'aspetto, confrontando il contenuto di acrilammide in campioni di biscotti, ognuno contenente il 20% di acqua e con valori di margarina crescente (0%, 8% e 15%). Il maggior contenuto di acrilammide è stato trovato nei biscotti senza grassi, mentre la presenza di margarina ha ridotto significativamente la presenza di acrilammide (dal 41% al 28%). Non sono state invece trovate differenze significative tra i campioni contenenti l'8% e il 15% di margarina. Questi dati sembrano indicare che durante la cottura, la presenza di margarina fusa (temperatura di transizione di fase a 62°C) ostacola l'interazione tra i precursori nella fase acquosa, portando a livelli di acrilammide inferiori a quelli di un biscotto formulato senza grasso. È stato anche testato l'accumulo di acrilammide sostituendo i grassi con

una soluzione di idrogel, e si è visto che anche in questo caso si ha un incremento significativo del contenuto di acrilammide, con valori comparabili alla formulazione senza grassi.

Anche il tipo di grasso utilizzato è da prendere in considerazione, perché non tutti hanno uguale probabilità di formare acrilammide. Negoită et al. (2016), ha riportato uno studio in cui è stato valutato l'accumulo di acrilammide in biscotti con stessa formulazione e uguale quantità di grasso, ma di differente tipologia. I risultati ottenuti hanno mostrato livelli di acrilammide diversi e in particolare: margarina < burro < strutto < olio di semi di girasole < olio di palma. Sembrerebbe quindi che grassi contenenti un'elevata percentuale di lipidi (come lardo, olio di girasole e di palma - pari al 100%) apportino più acrilammide se confrontati con grassi contenenti una percentuale più bassa (margarina e burro). Questi ultimi, infatti, contengono anche una certa quantità d'acqua, ma bisogna ricordare che a livello industriale si utilizza burro anidro, privato quindi dell'acqua, con un contenuto lipidico pari al 99.7%. Questa scelta è dettata dal fatto che il burro classico presenta, per legge, l'82% di materia grassa e la restante parte di acqua, con conseguente riduzione della shelf-life ad un massimo di 3 mesi a temperatura di refrigerazione (0-4°C). Al contrario, il burro anidro, viene stoccato in celle a 10°C fino a 10 mesi.

2.2.7. Aggiunta di asparaginasi

L'asparaginasi è un enzima in grado di catalizzare la reazione di idrolisi nei confronti dell'asparagina, liberando acido aspartico e ammoniaca. Questo enzima può essere prodotto da animali e piante, ma quella utilizzata a livello industriale viene estratta principalmente da muffe quali *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*. La prima viene chiamata commercialmente Acrylaway®, mentre la seconda PreventASe™. L'azione e l'efficacia di questi due enzimi dipende da diversi fattori come concentrazione, tempo e temperatura di incubazione prima della cottura, attività dell'acqua e pH dell'impasto (Tabella 2).

Caratteristica	<i>A. oryzae</i>	<i>A. niger</i>
Nome commerciale	Acrylaway®	PreventASe™
pH optimum	6 – 7 (5 - 8)	4 -5 (9)
T optimum	60°C	50°C

Tabella 2. Caratteristiche di asparaginasi prodotte da *Aspergillus oryzae* e *A. niger*.

Nello studio di Amrein et al. (2004), l'utilizzo di asparaginasi ha portato alla riduzione del 55% di acrilammide rispetto alla ricetta standard, senza enzima. Tuttavia, analizzando il contenuto di

asparagina nell'impasto previa cottura, essa risulta ancora presente, nonostante buona parte (circa il 75%) sia stata idrolizzata dall'enzima. Come detto prima, infatti, l'efficacia di questa è fortemente influenzata da numerosi parametri di processo, in particolare dall'attività dell'acqua, che definisce il livello di mobilità dell'acqua negli alimenti, e, di conseguenza, anche dell'enzima. Non sono state evidenziate differenze significative tra le due ricette in termini di colore e gusto.

Anche il tempo di riposo prima della cottura dell'impasto è fondamentale per lasciare il tempo necessario all'enzima di agire. Quest'aspetto viene messo in evidenza dallo studio di Hendriksen et al. (2009), che confronta il contenuto di acrilammide finale in campioni formulati con l'aggiunta di livelli crescenti di asparaginasi, misurata in ASNU¹/kg di farina, con il controllo, che non prevede l'aggiunta dell'enzima. Gli impasti vengono lasciati riposare per 15 e 30 minuti prima della cottura. La soluzione migliore è stata realizzata con il contenuto massimo di asparaginasi e il tempo più lungo, arrivando ad un livello finale di 58 µg/kg (Figura 11). Il valore raggiunto dal controllo corrispondente è pari a 460 µg/kg.

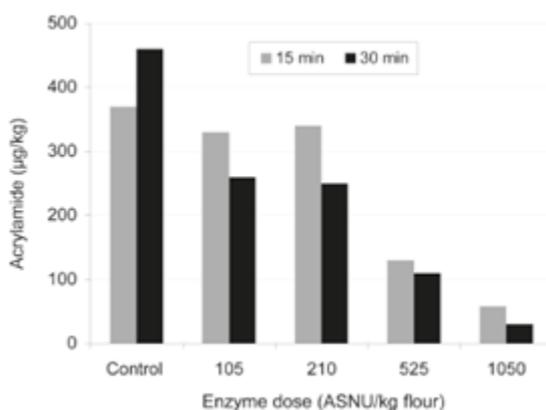


Figura 11. Livelli di acrilammide rilevati in campioni di biscotti in funzione del tempo di riposo (a 40°C) e della dose di asparaginasi aggiunta. (Hendriksen et al., 2009).

2.2.8. Aggiunta di altri ingredienti

Un'altra strategia che è risultata efficace per quanto riguarda la riduzione di acrilammide è l'aggiunta di aminoacidi all'impasto, in grado di competere con l'asparagina nella reazione di Maillard. Amrein et al. (2004), ha dimostrato che l'aggiunta di quantità moderate (2000 mg/kg - 0.2%) di L-glutamina, L-lisina o glicina non hanno avuto effetti significativi sulla riduzione del contenuto di acrilammide, ma hanno migliorato solo la doratura. Probabilmente questo è dovuto al fatto che un numero più elevato di gruppi α-amminici ha reagito nella Maillard, producendo più melanoidine. Aumentando invece la dose, fino all'1% (10000 mg/kg), la glicina ha ridotto di un

¹ ASNU: Asparaginase Activity Units. Fa riferimento alla quantità di enzima che produce 1µmol di ammonio per minuto a 37°C e pH 7.0.

terzo il livello di acrilammide, rendendo il prodotto ancora più dorato e abbassando leggermente il pH. Anche la cisteina è risultata in grado di abbassare il contenuto di acrilammide, ma i campioni ottenuti avevano un sapore e un odore sgradevole, a causa della liberazione dello zolfo in essa contenuto.

Lo studio di Wang et al. (2014), citato in precedenza nella sezione 2.2.2 - *Tipologia di zucchero*, ha dimostrato anch'esso che l'aggiunta di altri amminoacidi al sistema modello asparagina - glucosio, è in grado di ridurre la formazione di acrilammide. La riduzione maggiore (circa il 65%) è stata raggiunta aggiungendo cisteina, seguita dall'acido glutammico (50%) e infine dalla glicina (30%).

Anche l'aggiunta di antiossidanti, come i semi di cumino nero e di finocchio, ha dato risultati soddisfacenti. I campioni addizionati con il 2%, 4% e 6% di cumino, una volta cotti al forno, hanno mostrato una riduzione del contenuto di acrilammide rispettivamente del 17%, 31% e 53%, mentre se cotti al microonde la riduzione è risultata ancora maggiore (rispettivamente 23%, 58% e 68%). Questa differenza è dovuta probabilmente al fatto che nel microonde non si raggiungono temperature così alte da produrre elevate quantità di acrilammide. I composti antiossidanti sono in grado di ridurre in parte la reazione di Maillard agendo in tre modi differenti: intrappolando i composti carbonilici; riducendo la degradazione degli zuccheri; agendo come scavenger dei radicali. (AL-Ansi et al., 2019).

Un ingrediente comune nei prodotti da forno, e in particolare nei biscotti è il sale, aggiunto soprattutto perchè in grado di esaltare i sapori. È stato dimostrato che anche il sale può avere un effetto positivo per quanto riguarda la riduzione di acrilammide. Dallo studio condotto da Gökmen e collaboratori (2007), sembrerebbe infatti che l'aggiunta di cationi favorisca la frammentazione degli zuccheri, mentre riduca la decomposizione dell'asparagina durante la cottura dell'impasto. È stato dimostrato che fornendo calore (150°C per 20 minuti) ad una miscela equimolare di asparagina e glucosio, con quantità equimolari di cationi mono-, bi- e tri-valenti come K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{3+} , ha comportato una riduzione del 97% del tasso di produzione di acrilammide. La presenza di cationi, infatti, sembrerebbe ostacolare la formazione della base di Schiff, una delle prime molecole che si formano durante la reazione di Maillard. Questa teoria vale anche per il sodio: aumentando la concentrazione di questo ione da 0 a 5 μmol , la formazione di acrilammide si è ridotta del 59%. (Gökmen et al., 2007). In ogni caso, bisogna sempre tenere in considerazione l'aspetto salutistico e sensoriale del sale (NaCl), per cui non è detto che si riesca ad arrivare a concentrazioni così elevate da ridurre in modo significativo il contenuto di acrilammide, senza avere effetti indesiderati.

2.3. Parametri di processo

2.3.1. Tempo e temperatura di cottura

Tempo e temperatura sono due parametri che contribuiscono in maniera dipendente l'uno dall'altro alla cottura di un prodotto, per questo motivo non è possibile considerarli separatamente. Questi parametri influenzano qualsiasi tipo di processo termico, e quindi anche la reazione di Maillard. Dallo studio condotto da Bråthen e collaboratori (2005) si è potuto notare che con il prolungarsi del tempo di cottura di sistemi amidacei addizionati di asparagina e glucosio, si registra una graduale riduzione dell'asparagina, a favore dell'aumento dell'acrilammide. Tuttavia, molti autori hanno riportato una parziale degradazione dell'acrilammide a temperature elevate e per prolungati tempi di riscaldamento (Bråthen & Knutsen, 2005; Gökmen & Şenyuva, 2006), come risultato della reazione della molecola stessa con altri composti o legato alla sua polimerizzazione (Hidalgo, Delgado e Zamora, 2011). (Figura 12).

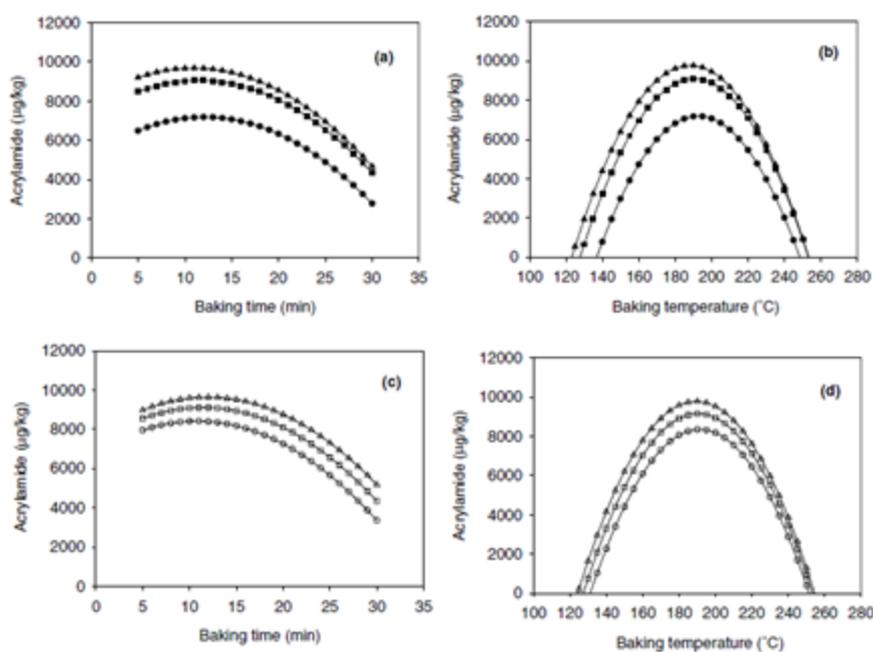


Figura 12. Valori di acrilammide in sistemi amidacei addizionati di asparagina e glucosio ottenuti in funzione del tempo e della temperatura di cottura a diverse concentrazioni di asparagina (a; b) e glucosio (c; d). (Bråthen et al., 2005).

Sembrerebbe quindi che superati certi tempi e temperature, l'acrilammide precedentemente formata, inizi a degradarsi reagendo con altri composti, quali, ad esempio, gli amminoacidi. Come già visto nella sezione 2.2.7 - *Aggiunta di altri ingredienti*, l'amminoacido cisteina risulta essere quello più efficiente perché presenta due gruppi nucleofili, quello amminico e quello sulfidrilico, in grado di reagire, che si trovano per di più molto vicini tra loro. (Hidalgo et al., 2011).

In realtà, sebbene la reazione di Maillard inizi a temperature attorno ai 120°C, sono state trovate tracce di acrilammide anche negli impasti crudi. Sembra che la presenza di ammoniaca permetta la formazione di questa molecola anche a temperature inferiori a 100°C e, in vari sistemi modello contenenti carbonato di ammonio e fruttosio, è stata trovata già a temperature intorno ai 60°C. In ogni caso, la quantità di acrilammide aumenta in maniera abbastanza lineare all'aumentare della temperatura, fino a raggiungere un massimo, per poi diminuire (Amrein et al., 2004).

2.3.2. Tipologia di forno

La tipologia di forno utilizzato nella cottura dei biscotti è un fattore di processo importante da considerare, poiché essi presentano funzionalità e caratteristiche differenti. In generale, bisogna considerare:

1. set di temperature delle camere e aspirazione del vapore: temperature troppo alte e aspirazioni del vapore aperte nelle prime zone del forno potrebbero favorire una maggiore produzione di acrilammide a causa della formazione precoce di "crosta" che tende ad imbrunire precocemente. In un ciclo di cottura ideale la colorazione del frollino deve iniziare a metà del forno;
2. tempo di cottura: tempi di cottura troppo rapidi potrebbero favorire una maggiore produzione di acrilammide, in quanto si rischia di imbrunire precocemente il prodotto;
3. tipologia di trasporto del prodotto: la banda (classico nastro trasportatore liscio) e la rete forata, nel settore bakery, sono le due tipologie di nastro trasportatore più comuni. I biscotti cotti su banda tendono ad imbrunire più facilmente rispetto agli stessi cotti su rete forata perché la parte di prodotto a contatto con la banda tende a ricevere anche calore per conduzione, portando potenzialmente ad una maggior formazione di acrilammide;
4. set parzializzatori: i parzializzatori sono dispositivi collegati al forno che regolano la portata di calore da esso emessa. La superficie superiore del forno è detta "cielo" ed è generalmente più calda, mentre quella inferiore è detta "platea" e presenta zone più fredde. Per questo motivo, risulta importante regolare il flusso in entrambe le zone, che sarà necessariamente diverso. Un'errata regolazione dei parzializzatori, a parità di temperatura, potrebbe portare ad eccessivo imbrunimento e, di conseguenza, ad un potenziale maggior sviluppo di acrilammide.

Anche la modalità di cottura nel forno è un fattore importante da considerare. Schouten e collaboratori (2022) hanno confrontato lo sviluppo di acrilammide in campioni di biscotti cotti in

modalità ventilata e statica per 18, 20, 22, 24 e 26 minuti. Come possiamo notare in *Figura 13*, nell'impasto crudo non sono state rilevate tracce di acrilammide, ma all'aumentare del tempo di cottura sono aumentati i livelli in modo proporzionale, fino ad arrivare ad un massimo di 275 µg/ kg dopo 26 minuti, per entrambi i campioni.

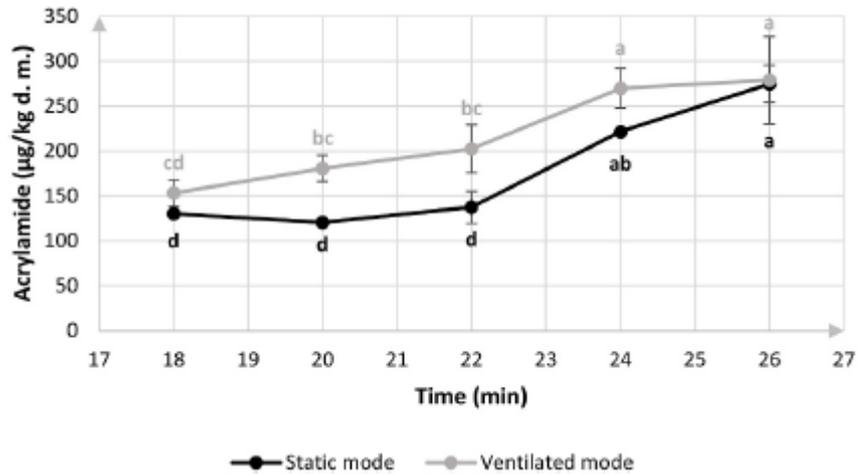


Figura 13. Valori di acrilammide ottenuti in campioni cotti in modalità statica e ventilata (a 175°C) in funzione del tempo. Lettere differenti stanno ad indicare differenze significative tra i campioni con $p < 0.05$. (Schouten et al., 2022).

La modalità ventilata ha registrato in generale valori di acrilammide sempre più alti poiché, in questo caso, il calore viene distribuito più velocemente e in maniera più uniforme durante la cottura, favorendo così una maggiore disidratazione del prodotto e accelerando le reazioni responsabili della formazione di acrilammide.

Capitolo 3

Materiali e metodi

3.1. Materiali

I biscotti utilizzati per l'analisi del tenore di acrilammide sono stati prodotti da Deco Industrie S. C. R. L. In particolare, sono state selezionate tre tipologie di prodotto, che, data la loro composizione, sono risultate le più critiche per l'accumulo di questa sostanza. Nel corso degli anni l'azienda ha modificato la ricetta al fine di cercare di ridurre il contenuto di acrilammide di questi frollini e rientrare così nei limiti suggeriti dal Regolamento 2017/2158. I dati riportati di seguito sono frutto di studi preliminari, basati su ricerche bibliografiche circa le strategie di mitigazione e sulle raccomandazioni a riguardo della Commissione Europea.

In particolare, i tre frollini oggetto di studio presentano i seguenti ingredienti:

- Frollini 100% integrali: farina integrale di grano tenero 69%, olio di semi di girasole, zucchero, zucchero di canna 7%, miele 2%, latte fresco pastorizzato, uova fresche, estratto di malto d'orzo, agenti lievitanti: carbonato acido di sodio, carbonato acido di ammonio; sale, aromi, proteine del latte.
- Frollini integrali con semi di chia, quinoa, arancia e zenzero: farina integrale di grano tenero 61%, zucchero, olio di semi di girasole, semi di chia (*Salvia hispanica*), quinoa caramellata (quinoa perlata soffiata 1,9%, zucchero), pasta di arance 2% (scorze d'arancia, sciroppo di glucosio-fruttosio, zucchero, correttore di acidità: acido citrico), miele 2%, agenti lievitanti: carbonato acido di ammonio, carbonato acido di sodio, zenzero 0,6%, sale, aromi naturali.
- Frollini con orzo e avena: farina di frumento, zucchero di canna 19,2%, fiocchi d'orzo 18,2%, olio di semi di girasole, farina d'orzo 7,1%, agenti lievitanti: carbonato acido di ammonio, carbonato acido di sodio, tartrato monopotassico, farina d'avena 1,3%, sale iodato, aromi naturali.

Il periodo di analisi per cui sono stati valutati i campioni comprende gli anni 2018-2022 per i frollini orzo e avena e gli anni 2019-2022 per i frollini integrali e i frollini chia, quinoa, arancia e zenzero.

Per questo studio preliminare si è focalizzata l'attenzione alla produzione di acrilammide modificando alcuni ingredienti facenti parte della formulazione dei frollini; in particolare, come segue:

- Frollini 100% integrali: mantenendo costanti l'aggiunta di asparaginasasi (0.042%) è stata modificata l'aggiunta di cremor tartaro, con valori di 0%, 0.42% e 0.45%.
- Frollini chia, quinoa, arancia e zenzero: è stato valutato il contenuto di acrilammide modificando la percentuale di asparaginasasi aggiunta (0.13% e 0.14%) senza l'aggiunta di cremor tartaro. È stata inoltre valutata la quantità di acrilammide sviluppata mantenendo fisso il contenuto di asparaginasasi (0.14%) e modificando il contenuto di cremor tartaro (0% e 0.15%).
- Frollini orzo e avena: mantenendo fissa l'asparaginasasi (a 0.09%) è stato valutato il contenuto di acrilammide modificando il contenuto di cremor tartaro (0.34% e 0.51%).

3.2. Metodi

La preparazione dei frollini si articola in quattro passaggi principali:

- *Creazione dell'impasto*: gli ingredienti vengono aggiunti all'interno di una macchina impastatrice che, grazie ad un sistema di pale, crea un impasto omogeneo;
- *Formatura dei biscotti*: tutti e tre i frollini presi in considerazione appartengono alla categoria dei biscotti "stampati". L'impasto viene trasferito dall'impastatrice ad un nastro trasportatore, che viene pressato e stampato da un rullo che gli conferisce la forma.
- *Cottura*: i frollini crudi procedendo sul nastro trasportatore, entrano in un forno a tunnel per la cottura. All'interno del forno possiamo distinguere diverse zone, nelle quali sia la distribuzione del calore che la temperatura raggiunta possono essere differenti.

In particolare, la cottura dei frollini 100% integrali avviene in forno ciclotometrico con trasmissione del calore principalmente per irraggiamento e la sua erogazione proviene per il 50% dal cielo e 50% dalla platea. Il trasporto avviene su rete forata. Le temperature raggiunte all'interno del forno stesso sono così mediamente suddivise:

- Zona 1: 220°C
- Zona 2: 230°C
- Zona 3: 195°C
- Zona 4: 190°C.

Al contrario, i frollini chia, quinoa, arancia e zenzero e i frollini orzo e avena vengono cotti su banda in acciaio, in un forno che prevede trasmissione per irraggiamento da zona 1 a zona

3, mentre per convezione forzata nella zona 4. Di seguito sono riportate le temperature medie delle quattro zone:

- Zona 1: 180°C
- Zona 2: 200°C
- Zona 3: 205°C
- Zona 4: 142°C.

In questo caso, la distribuzione del calore è per il 100% da cielo per evitare una colorazione eccessiva del prodotto nella parte a contatto con la banda, che trasferirebbe calore per conduzione, con conseguente aumento dello sviluppo di acrilammide.

Il tempo di cottura di tutti e tre questi frollini è dettato principalmente dal grado di imbrunimento che subiscono in questa fase. In generale, i frollini 100% integrali vengono cotti per circa 7 minuti, mentre i frollini chia, quinoa, arancia e zenzero e i frollini orzo e avena per circa 8 minuti e 30 secondi.

- *Confezionamento*: il prodotto finito viene trasportato ad un punto di raccolta dove è presente una macchina pesatrice. Questa, distribuisce i biscotti nei sacchetti fino a raggiungere il peso indicato sulla confezione. Una volta riempita, la confezione viene saldata e raggiunge una macchina che inserisce i sacchetti nei cartoni, che verranno poi consegnati al cliente.

Per ogni analisi sono stati prelevati due sacchetti appartenenti allo stesso lotto, prima che questi fossero inseriti nella confezione finale in cartone. I sacchetti sono stati prelevati in maniera casuale.

3.2.1. Analisi acrilammide

Per quanto riguarda l'analisi dell'acrilammide, i campioni utilizzati sono gli stessi sottoposti alle analisi chimico-fisico. I sacchetti campionati sono stati chiusi tramite l'utilizzo di una saldatrice e successivamente inviati al laboratorio di competenza per la valutazione del contenuto di acrilammide. Il metodo analitico utilizzato dal laboratorio accreditato Agriparadigma è l'analisi LC-ESI-MS/MS, identificato come UNI-EN-16618.

3.2.2. Analisi statistica

I valori di acrilammide registrati in seguito ad analisi cromatografica sono stati espressi in $\mu\text{g}/\text{kg}$ di prodotto, riportati come media \pm DS. I dati ottenuti sono stati inoltre elaborati attraverso l'analisi

della varianza (ANOVA). La significatività tra medie ($p \leq 0,05$) è stata determinata utilizzando il test di Tukey.

Capitolo 4

Risultati e discussione

4.1. Analisi del contenuto di acrilammide

Essendo questo studio solo un approccio preliminare alla valutazione dei parametri da modificare per cercare di mitigare l'accumulo di acrilammide nei biscotti oggetto di studio, di seguito saranno riportati i dati relativi alla concentrazione dell'acrilammide al variare di uno degli ingredienti di formulazione. Nello specifico è stata valutata la concentrazione di tale molecola al variare della quantità di cremore tartaro e/o asparaginasi. Il cremor tartaro è un sale di potassio dell'acido tartarico, molto utilizzato nel settore bakery sia come agente lievitante, in combinazione con il bicarbonato di sodio, sia come correttore di acidità. Inoltre, esso, è in grado di abbassare leggermente il pH dell'impasto, che, come abbiamo visto in precedenza nel capitolo 2.2.4 - *Riduzione del pH*, rallenta la reazione di Maillard. La riduzione del pH rispetto alla neutralità è favorevole anche per l'attività dell'asparaginasi, facendolo avvicinare così al range ottimale di azione per l'enzima (*Tabella 2*).

Durante il corso di queste analisi non è stato possibile verificare contemporaneamente anche la variabilità dei parametri di processo, intesi come temperature o tempi di cottura più elevati, tempo di riposo dell'impasto e/o distribuzione del calore all'interno della camera che saranno sicuramente oggetto di studio e di approfondimento successivo.

4.1.1. Frollini 100% integrali

Per quanto riguarda i frollini 100% integrali, come riportato nel capitolo 3.1 *Materiale*, sono costituiti da farina integrale, che, come abbiamo visto nel capitolo 2.2.1 - *Tipologia di farina*, contiene un quantitativo maggiore di asparagina. Contengono inoltre miele, che anch'esso è uno zucchero riducente, costituito da glucosio e fruttosio. Nello specifico sono stati analizzati 114 campioni, così distribuiti:

- 51 campioni con 0,042% di asparaginasi e 0% di cremor tartaro (**C**);
- 15 campioni con 0,042% di asparaginasi e 0,42% di cremor tartaro (**C42**);
- 48 campioni con 0,042% di asparaginasi e 0,45% di cremor tartaro (**C45**).

Nella tabella sottostante (*Tabella 2*) sono riportati i valori di acrilammide in $\mu\text{g}/\text{kg}$ di prodotto, registrati tramite analisi HPLC-ESI-MS/MS per le tre diverse formulazioni.

C	C42	C45
---	-----	-----

570	180	469	
510	330	278	
530	336	351	
510	264	243	
280	310	290	
310	314	287	
280	376	618	
610	455	399	
520	260	429	
310	370	358	
250	350	348	
590	370	418	
410	334	288	
510	323	470	
520	347	287	
560	336	301	
410		336	
520		312	
650		300	
470		225	
400		217	
500		211	
580		224	
400		216	
510		227	
480		252	
364		225	
469		270	
463		232	
356		270	
346		220	
504		240	
632		260	
590		205	
469		230	
448		290	
743		250	
874		280	
534		160	
446		170	
546		160	
383		180	
642		180	
468		160	
580		220	
456		310	
405		290	
427		200	
541		170	
427			
468			
256			
MEDIA	454	328	365
DEV. ST.	126	60,1	98,2

Tabella 2. Valori di acrilammide rilevati nei frollini 100% integrali con diversa percentuale di cremor tartaro, espressi come $\mu\text{g}/\text{kg}$ di prodotto.

Trasferendo i seguenti dati in un grafico, otteniamo la seguente rappresentazione (Figura 17).

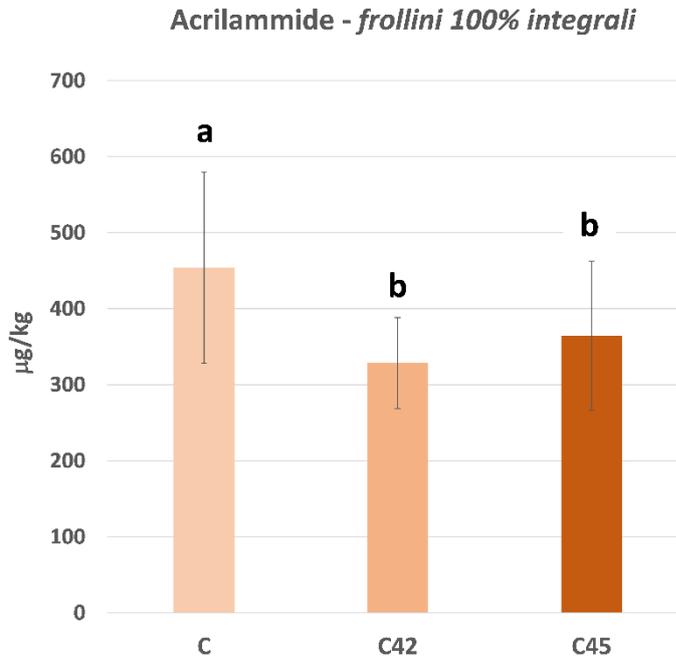


Figura 17. Grafico dei valori medi di acrilammide dei frollini 100% integrali ottenuti con diversa percentuale di cremor tartaro (0%, 0,42% e 0,45%), espressi in µg/kg di prodotto. I valori nel grafico con lettere diverse sono significativamente diversi ($p \leq 0,05$).

Osservando il grafico in Figura 17 è ben evidente come l'aggiunta del cremor tartaro all'impasto abbia avuto un effetto positivo sulla formazione di acrilammide, il cui contenuto si abbassa significativamente ($p \leq 0,05$) rispetto al controllo (C). Dall'altro lato, non sono state registrate differenze significative tra i campioni C42 e C45 in quanto la media dei valori di acrilammide registrati non si presentano tra loro significativamente differenti.

I valori di cremor tartaro aggiunti all'impasto (0,42% e 0,45%) sono il risultato di varie prove a livello aziendale, per cui la percentuale è stata aumentata fino a raggiungere risultati soddisfacenti. In questo caso, i frollini 100% integrali richiedono un maggior contenuto di cremor tartaro rispetto alle altre due tipologie di frollini poiché hanno un rapporto superficie/volume (S/V) più basso, per cui, in seguito a cottura, la superficie che risulterà imbrunita rispetto al totale sarà maggiore. Ciò comporta di conseguenza anche un possibile maggior sviluppo di acrilammide.

4.1.2. Frollini chia, quinoa, arancia e zenzero

Per quanto riguarda i frollini con chia, quinoa, arancia e zenzero, sono costituiti anch'essi da farina integrale, contengono miele e semi precedentemente tostati, che hanno già subito trattamenti termici spinti. Questi biscotti rientrano nella categoria dei biscotti "salutistici", quindi, presentano un contenuto in grassi pari a circa il 15% inferiore rispetto alla media dei classici frollini. Inoltre, i frollini chia, quinoa, arancia e zenzero sono fonte di omega-3 (contengono quindi almeno 0,3g di acido α -linolenico per 100g e 100 kcal di prodotto), grassi insaturi importanti da un punto di vista

nutrizionale ma sicuramente più sensibili all'ossidazione. In questo caso i campioni analizzati sono stati 35 e sono così distribuiti:

- 10 campioni con 0% di cremor tartaro e 0,13% di asparaginasasi (**A13**);
- 12 campioni con 0% di cremor tartaro e 0,14% di asparaginasasi (**A14**);
- 13 campioni con 0,15% di cremor tartaro e 0,14% di asparaginasasi (**C15A14**).

Nella valutazione e studio dell'andamento dell'acrilammide in questa tipologia di biscotti ci si è prima focalizzati sul confronto di campioni ottenuti senza l'impiego del cremor tartaro ma con due diverse concentrazioni di asparaginasasi (A13 e A14). Nella tabella sottostante (*Tabella 3*) sono riportati i singoli valori di acrilammide ottenuti in seguito ad analisi cromatografica ed espressi in $\mu\text{g}/\text{kg}$ di prodotto.

	A13	A14
	450	360
	520	310
	330	360
	320	450
	420	460
	430	400
	400	471
	400	268
	350	416
	340	307
	400	562
		390
		411
MEDIA	396	397
DEV. ST.	59,5	79,1

Tabella 3. Valori di acrilammide rilevati nei frollini con chia, quinoa, arancia e zenzero con diversa percentuale di asparaginasasi espressi in $\mu\text{g}/\text{kg}$ di prodotto.

Nel grafico sottostante (*Figura 18*) sono riportati i seguenti dati in forma grafica e sottoposti ad analisi statistica.

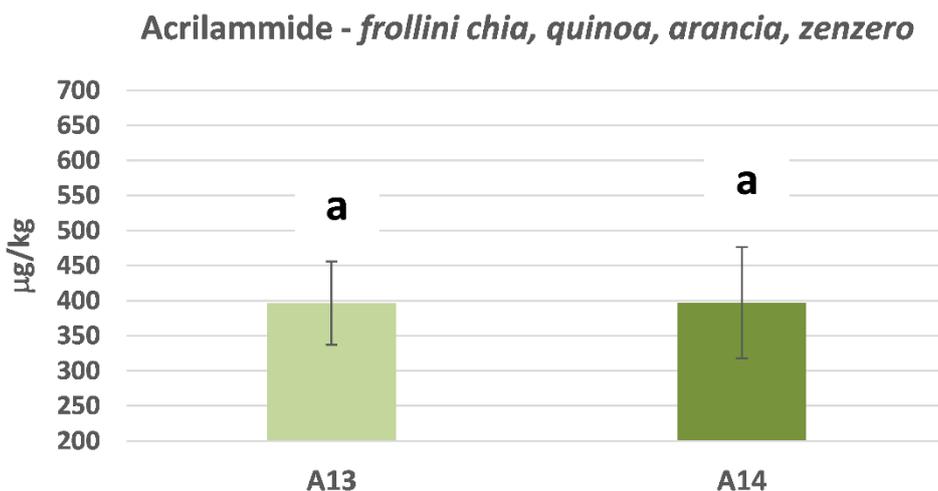


Figura 18. Grafico valori di acrilammide con diversa percentuale di asparaginasasi (0,13% e 0,14%), espressi in $\mu\text{g}/\text{kg}$ di prodotto. I valori nel grafico con lettere diverse sono significativamente diversi ($p \leq 0.05$).

Dal grafico è possibile notare facilmente come aumentando il contenuto di asparaginasasi dello 0.01% non siano state trovate differenze tra i due campioni.

Lo stesso tipo di frollino è stato poi formulato tenendo ferma la concentrazione di asparaginasasi a 0,14% e aggiungendo invece del cremor tartaro per una percentuale pari a 0,15%. Nella tabella sottostante (Tabella 4) sono riportati i valori di acrilammide ottenuti per le singole analisi condotte ed espressi come $\mu\text{g}/\text{kg}$ di prodotto.

	A14	C15A14
	360	273
	310	215
	360	170
	450	290
	460	325
	400	306
	471	290
	268	301
	416	300
	307	170
	562	290
	390	330
	411	310
		290
MEDIA	397	275
DEV. ST.	79,1	52,3

Tabella 4. Valori di acrilammide rilevati nei frollini con chia, quinoa, arancia e zenzero con diversa percentuale di cremor tartaro (0% e 0,15%), espressi come $\mu\text{g}/\text{kg}$ di prodotto.

I valori medi sono stati riportati anche nel grafico sottostante (Figura 19).

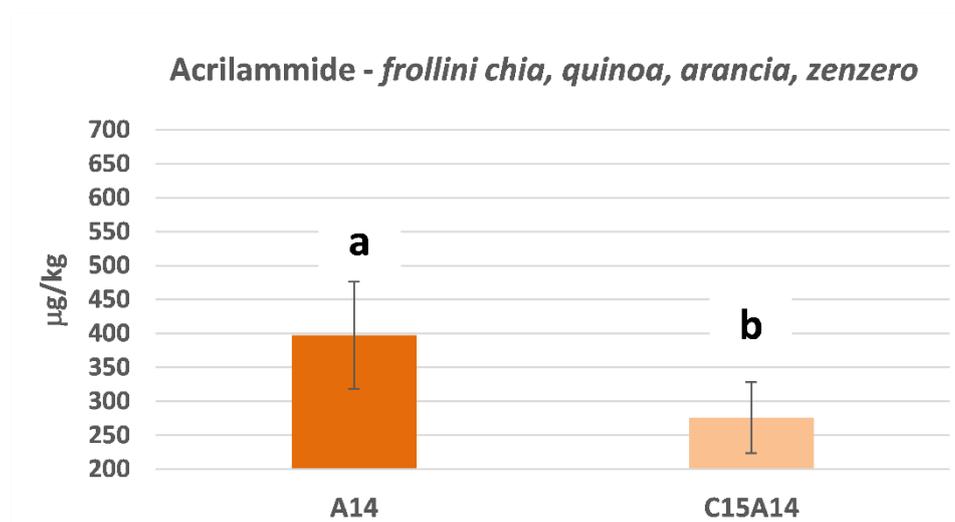


Figura 19. Grafico valori medi di acrilammide dei frollini con chia, quinoa, arancia e zenzero ottenuti con diversa percentuale di cremor tartaro (0% e 15%), espressi come $\mu\text{g}/\text{kg}$ di prodotto. I valori nel grafico con lettere diverse sono significativamente diversi ($p \leq 0,05$).

Anche nel caso dei frollini formulati con chia, quinoa, arancia e zenzero possiamo notare una riduzione significativa ($p \leq 0,05$) del contenuto in acrilammide nei biscotti formulati con lo 0,14% di cremor tartaro (C15A14) rispetto a quelli formulati senza tale ingrediente (A14).

4.1.3. Frollini orzo e avena

Infine, sono stati selezionati e analizzati anche frollini prodotti con farina d'orzo e di avena poiché contengono fiocchi d'orzo precedentemente tostiti. Orzo e avena presentano un quantitativo maggiore di asparagina rispetto alla farina di frumento (Žilić et al. 2020). Anche questi biscotti rientrano nella categoria dei biscotti considerati salutistici poiché contengono circa il 15% di grassi in meno rispetto ai classici frollini. Per questi frollini sono stati analizzati 34 campioni, così distribuiti:

- 20 campioni con 0,09% di asparaginasi e 0,34% di cremore (**C34**);
- 14 campioni con 0,09% di asparaginasi e 0,51% di cremore (**C51**).

Nella tabella sottostante (Tabella 5) sono riportati i valori di acrilammide ottenuti.

	C34	C51
	345	283
	315	219
	405	359
	316	190
	450	260
	390	270
	230	231
	240	265
	240	219
	250	286
	290	260
	250	260
	250	330
	260	210
	270	
	270	
	270	
	333	
	286	
	314	
	246	
MEDIA	296	260
DEV. ST.	60,1	46,1

Tabella 5. Valori di acrilammide rilevati nei frollini di orzo e avena con diversa percentuale di cremor tartaro (0,34% e 0,51%), espressi come $\mu\text{g}/\text{kg}$ di prodotto.

Nel grafico sottostante (Figura 20) sono riportati i valori medi con annessa elaborazione statistica per una migliore visione dei dati e loro discussione.

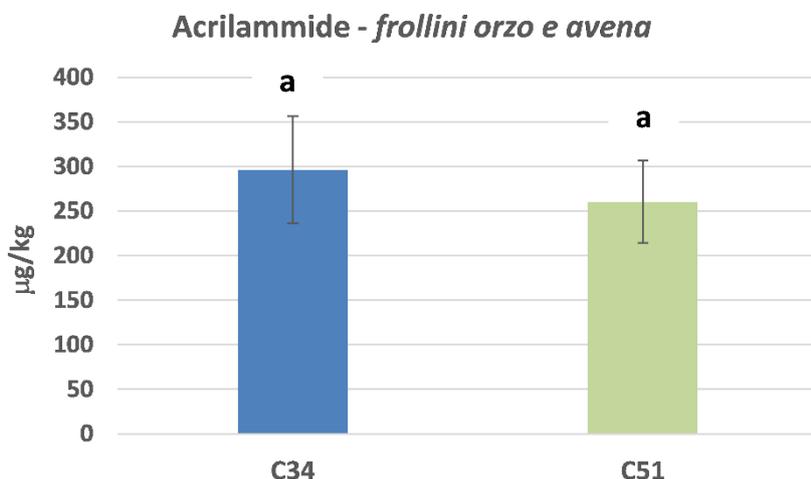


Figura 20. Grafico dei valori medi di acrilammide dei frollini di orzo e avena ottenuti con diversa percentuale di cremor tartaro (0% e 0,15%), espressi in $\mu\text{g}/\text{kg}$ di prodotto. I valori nel grafico con lettere diverse sono significativamente diversi ($p \leq 0,05$).

Nel caso dei frollini di orzo e avena, l'aggiunta di cremor tartaro sembrerebbe non aver influito in maniera significativa ($p \leq 0,05$) sull'accumulo di acrilammide, nonostante le percentuali aggiunte fossero tra loro più elevate e differenti rispetto allo studio dei frollini precedenti.

È importante tenere presente che nei vari frollini sopra analizzati la scelta delle quantità e delle combinazioni degli ingredienti aggiunti al fine di ridurre il contenuto di acrilammide è dettato dalla composizione della singola ricetta e dalle caratteristiche che si vogliono ottenere nella tipologia di biscotto selezionato, ma soprattutto anche dal costo degli ingredienti stessi. L'asparaginasi, infatti, risulta essere l'ingrediente più costoso, per cui l'azienda ha dovuto tener conto anche di quest'aspetto e trovare il giusto compromesso tra costi e ricavi.

4.2. Conclusioni

L'acrilammide è una molecola che da sempre ha attirato l'attenzione delle Autorità a causa della sua probabile cancerogenicità. Inoltre, vista la recente proposta da parte della Comunità Europea di revisionare i limiti suggeriti per legge riguardo la sua presenza negli alimenti, è necessario un maggior monitoraggio da parte delle aziende.

Come abbiamo visto nei capitoli precedenti, diversi fattori concorrono allo sviluppo di questa molecola, partendo dal tipo di materie prime utilizzate, per poi passare alla formulazione del prodotto e infine ai parametri di processo. E' importante che ci sia una combinazione ottimale di questi tre fattori per avere una mitigazione sufficiente dell'accumulo di questa molecola, in modo da agire secondo la cosiddetta "teoria degli ostacoli", che sta alla base della produzione di qualsiasi alimento sicuro.

A livello agronomico sarebbe utile una maggior attenzione alla componente mineraria del terreno e agli stress biotici e abiotici a cui le piante sono sottoposte, così come una maggior integrazione delle biotecnologie. L'esempio che abbiamo visto per le patate OGM potrebbe essere applicato anche sul grano, al fine di ottenere farine a basso contenuto di asparagina. Purtroppo questi studi sono ancora agli inizi e al momento non ci sono prospettive per la coltivazione e commercializzazione di queste o altre varietà OGM in Europa.

A livello di formulazione bisognerebbe tenere in considerazione contemporaneamente i fattori che concorrono allo sviluppo di acrilammide, anche se molto spesso risulta difficile. Come abbiamo visto dalle prove sperimentali, due dei tre frollini presi in considerazione nel caso studio di questa tesi sono considerati "salutistici", quindi con minori quantità di grassi rispetto ai frollini tradizionali. Come spiegato nel capitolo 2.2.6. – *Effetto del tipo di grasso*, la presenza di lipidi ostacola l'interazione tra le molecole e, di conseguenza, i due reagenti per la formazione di acrilammide avranno minori probabilità di incontrarsi. Riducendo il contenuto di grassi questa probabilità aumenta, ma, spesso, le spinte da parte del marketing e del consumatore portano le aziende a dover raggiungere dei compromessi.

Dai risultati ottenuti nella parte sperimentale di questo lavoro di tesi, il fattore più rilevante per la riduzione del contenuto di acrilammide in due dei tre frollini presi in considerazione sembrerebbe essere il cremor tartaro. La sua azione principale è quella di abbassare il pH dell'impasto, con conseguente rallentamento della reazione di Maillard e permettendo di avvicinare il valore di pH al range ottimale di azione dell'asparaginasi.

A livello di processo è necessario un maggior controllo in linea ma questo passaggio risulta spesso difficile, soprattutto il monitoraggio del tempo di riposo dell'impasto che è soggetto alle esigenze degli impianti e degli operatori aziendali.

4.2.1 Sviluppi futuri

Come già premesso, i dati ottenuti per l'elaborazione di questa tesi sono dati preliminari, è perciò necessario mettere a punto un vero e proprio piano sperimentale che analizzi in maniera più approfondita l'effetto dei vari parametri che entrano in gioco nella mitigazione dell'acrilammide in prodotti da forno come i biscotti. Sarà quindi importante valutare la variazione dei fattori quali le modalità di aggiunta e di gestione dell'impasto, l'umidità, il tempo di sosta, la formulazione oltre alla temperatura di cottura, incisivi per la qualità finale del prodotto sia da un punto di vista sensoriale che nutrizionale.

Un'attenzione particolare va rivolta soprattutto all'impiego dell'asparaginasi che negli ultimi anni risulta essere una delle strategie più compromettenti per ridurre l'acrilammide nel prodotto finito ma che spesso presenta delle criticità e limitazioni legate soprattutto al raggiungimento delle condizioni ottimali di azione dell'enzima nei diversi substrati in cui è stata aggiunta.

Sarebbe inoltre opportuno ricercare se ci sono delle differenze riguardo il tipo di asparaginasi utilizzata. Tutti e tre i frollini analizzati prevedono l'aggiunta prevalentemente di Acrylaway® ma, in futuro, sarebbe interessante studiare se ci siano o meno delle differenze con PreventASe™.

Bibliografia

AL-Ansi Waleed; Amer Ali Mahdi; Qais Ali Al-Maqtari; Mingcong Fan; Li Wang; Yan Li; Haifeng Qian; Hui Zhang. *Evaluating the role of microwave-baking and fennel (Foeniculum vulgare L.) / nigella (Nigella sativa L.) on acrylamide growth and antioxidants potential in biscuits.* Journal of Food Measurement and Characterization, 2019.

Amrein Thomas M.; Barbara Schönbacher; Felix Escher; Renato Amadò. *Acrylamide in gingerbread: critical factors for formation and possible ways for reduction.* J. Agric. Food. Chem. 2004, 52, 4282-4288.

Amrein Thomas M.; Luca Andres; Giuseppe G. G. Manzardo; and Renato Amadò. *Investigation on the promoting effect of ammonium hydrogencarbonate on the formation of acrylamide in model system.* J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 10253-10261.

Amrein Thomas M.; Luca Andres, Felix Escher; and Renato Amadò. *Occurrence of acrylamide in selected foods and mitigation options.* Food additives and contaminants, Supplement 1, 2007; 24(S1): 13-25.

Anese Monica; Barbara Quarta; Lucie Peloux; Sonia Calligaris. *Effect of formulation on the capacity of l-asparaginase to minimize acrylamide formation in short dough biscuits.* Food Research International 44 (2011) 2837-2842.

Bangaresi Paolo, Bruno Parisi, Anna Moschella, Pierdomenico Perata, Paolo Ranalli. *Potato tuber cold sweetening: new developments in an 'old' field.* Italus Hortus 15 (4), 2008: 10-20.

Bråthen Erland; Svein Halvor Knutsen. *Effect of temperature and time on the formation of acrylamide in starch-based and cereal model systems, flat breads and bread.* Food Chemistry 92 (2005) 693–700.

Colmer T.D., Epstein E., Dvorak J. (1995) *Differential solute regulation in leaf blades of various ages in salt-sensitive wheat and a salt-tolerant wheat Lophopyrum elongatum (Host) A. Lo" ve amphiploid.* Plant Physiology, 108, 1715–1724.

Curtis Tanya Y.; Stephen J. Powers; Ruiyun Wang; Nigel G. Halford. *Effects of variety, year of cultivation and sulphur supply on the accumulation of free asparagine in the grain of commercial wheat varieties.* Food Chemistry 239 (2018) 304-313.

Gao Runhong; Tanya Y. Curtis; Stephen J. Powers; Hongwei Xu; Jianhua Huang; Nigel G. Halford. *Food safety: structure and expression of the asparagine synthetase gene family of wheat.* Journal of Cereal Science 68 (2016) 122-131.

Garthwaite Alaina J., Roland von Bothmer and Timothy D. Colmer. *Salt tolerance in wild Hordeum species is associated with restricted entry of Na⁺ and Cl⁻ into the shoots.* Journal of Experimental Botany, 56, 2365–2378.

Graf Maya; Thomas M. Amrein; Stephan Graf; Réka Szalay; Felix Escher; Renato Amadò. *Reducing the acrylamide content of a semi-finished biscuit on industrial scale.* LWT 39 (2006) 724-728.

Gökmen Vural; Hamide Z. Şenyuva. *Effects of some cations on the formation of acrylamide and furfurals in glucose–asparagine model system*. Eur Food Res Technol (2007) 225: 815-820.

Hamlet Colin G.; Peter A. Sadd; David A. Gray. *Generation of monochloropropanediols (MCPDs) in model dough system*. J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 2059-2066.

Hamlet Colin G.; Peter A. Sadd; Li Liang. *Correlations between the amounts of free asparagine and saccharides present in commercial cereal flours in the United Kingdom and the generation of acrylamide during cooking*. J. Agric. Food Chem. 2008, 56, 6145-6153.

Hendriksen Hanne V.; Beate A. Kornbrust; Peter R. Østergaard; Mary A. Stringer. *Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae**. J. Agric. Food Chem. 2009, 57, 4168-4176.

Hidalgo Francisco J., Rosa M. Delgado, Rosario Zamora. *Positive interaction between amino and sulfhydryl groups for acrylamide removal*. Food Research International 44 (2011) 1083-1087.

Lea P. J., L. Sodek, M. A. J. Parry, P.R. Shewry, N. G. Halford. *Asparagine in plants*. Annals of Applied Biology ISSN 0003-4746, 2007.

Negoită, M.; Iorga, E.; Mihai, A. L.; Spadaro, G. *Investigations regarding the Influence of Certain Types of Fat Content on Acrylamide Level in Biscuits*. J. Hyg. Eng. Des. 2016, 15, 31–41.

Nguyen Ha T.; H.J. (Ine) Van der Fels-Klerx; Ruud J.B. Peters; Martinus A.J.S. Van Boekel. *Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation during baking of biscuits: Part I: Effects of sugar type*. Food Chemistry 192 (2016) 575-585.

Nikiforova V. J., M. Bielecka, B. Gakiere, S. Kruger, J. Ronder, S. Kempa, R. Morcuende, W-R. Scheible, H. Hesse, R. Hoefgen. *Effect of sulfur availability on the integrity of amino acid biosynthesis in plants*. Amino Acid (2006) 30: 173-183.

Oddy Joseph; Rocío Alarcón-Reverte; Mark Wilkinson; Karl Ravet; Sarah Raffan; Andrea Minter; Andrew Mead; J. Stephen Elmore; Isabel Moreira de Almeida; Nicholas C. Cryer; Nigel G. Halford; Stephen Pearce. *Reduced free asparagine in wheat grain resulting from a natural deletion of TaASN-B2: investing and exploiting diversity in the asparagine synthetase gene family to improve wheat quality*. BMC Plant Biology (2021) 21:302.

Perez-Garcia A., S. Pereira, J. Pissarra, A. Garcia Gutierrez, F. M. Cazorla, R. Salema, A. de Vicente, F. M. Canovas. *Cytosolic localization in tomato mesophyll cells of a novel glutamine synthetase induced in response to bacterial infection or phosphinothricin treatment*. Planta (1998) 206: 426-434.

Raffan Sarah; Nigel G. Halford. *Acrylamide in food: Progress in and prospects for genetic and agronomic solutions*. Annals of Applied Biology - Wiley.

Robert F, Vuataz G, Pollien P, Saucy F, Alonso MI, Bauwens I, Blank I. 2004. *Acrylamide formation from asparagine under low-moisture Maillard reaction conditions. Physical and chemical aspects in crystalline model systems*. J. Agric. Food Chem. 52:6837–6842.

Schouten Maria Alessia; Silvia Tappi; Pietro Rocculi; Santina Romani. *Mitigation strategies to reduce acrylamide in cookies: effect of formulation*. Food Reviews International (6/02/2022), 1-41.

Schouten Maria Alessia, Silvia Tappi, Virginia Glicerina, Pietro Rocculi, Simone Angeloni, Manuela Cortese, Giovanni Caprioli, Sauro Vittori, Santina Romani. *Formation of acrylamide in biscuits during baking under different heat transfer conditions*. LWT - Food Science and Technology 153 (2022).

Sharma Shanti S., Dietz Karl-Josef. *The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress*. Journal of Experimental Botany, Vol. 57, No. 4, pp. 711–726, 2006.

Suman Michele; Silvia Generotti; Martina Cirlini; Chiara Dall'Asta. *Acrylamide reduction strategy in combination with Deoxynivalenol mitigation in industrial biscuits production*. Toxins 2019, 11, 499.

Van Der Fels-Klerx H.J.; Capuano E.; Nguyen H.T.; Ataç Mogol B.; Kocadağlı T.; Göncüoğlu Taş N.; Hamzaloğlu A.; Van Boekel M.A.J.S.; Gökmen V. *Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation during baking of biscuits: NaCl and temperature–time profile effects and kinetics*. Food Research International 57 (2014) 210-217.

Wang Xiao, Xu Liheng. *Influence Factors on the Formation of Acrylamide in the Amino Acid/Sugar Chemical Model System*. Journal of Food and Nutrition Research, 2014, Vol. 2, No. 7, 344-348.

Wang Yuting; Hu Huiyu; McClements David Julian; Nie Shaoping; Shen Mingyue; Li Chang; Huang Yousheang; Zhong Yadong; Chen Jie; Zeng Maomao; Xie Mingyong. *pH and lipid unsaturation impact the formation of acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural in model system at frying temperature*. Food Research International 123 (2019) 403-413.

Yaylayan, V. A.; Stadler, R. H. *Acrylamide Formation in Food: A Mechanistic Perspective*. J. AOAC Int. 2005, 88 (1), 262–267.

Žilić Slađana, Dejan Dodig, Zorica Basić, Jelena Vančetović, Primož Titan, Nenad Đurić & Nataša Tolimir. *Free asparagine and sugars profile of cereal species: the potential of cereals for acrylamide formation in foods*. Food Additives & Contaminants: Part A, 34:5, 705-713, 2017.

Žilić Slađana; Işıl Gürsul Aktağd; Dejan Dodiga; Milomir Filipovića; Vural Gökmen. *Acrylamide formation in biscuits made of different wholegrain flours depending on their free asparagine content and baking conditions*. Food Research International 132 (2020) 109109.

Sitografia

<https://www.iarc.who.int/>

<https://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/acrylamide>

[https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX%3A32017R2158#:~:text=Regolamento%20\(UE\)%202017%2F2158,rilevante%20ai%20fini%20del%20SEE.%20](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX%3A32017R2158#:~:text=Regolamento%20(UE)%202017%2F2158,rilevante%20ai%20fini%20del%20SEE.%20)

<https://www.politicheagricole.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/2772>