

**Relazione finale del programma di ricerca commissionato da Agroservice SpA all'ISA-CNR avente per titolo: “Analisi dell’Indice Glicemico, Tossicità e Digeribilità della Varietà di Frumento Monococco Hammurabi”.**

**Responsabile scientifico Dr. Giuseppe Mazzarella**

### Introduzione.

Negli ultimi anni l’interesse verso i cosiddetti frumenti “antichi” è aumentato quasi esponenzialmente. I frumenti appartengono alla famiglia delle Poacee (Graminacee fino a pochi anni fa) e al genere *Triticum* e il loro centro di origine primaria è la zona della Mezzaluna fertile, da dove si sono diffusi a tutto il bacino del Mediterraneo e ai continenti confinanti, grazie alle migrazioni umane. Nella Mezzaluna si rileva il più ampio livello di diversità genetica all’interno del genere, che va dalle specie selvatiche a quelle coltivate, dalle forme vestite a quelle nude, passando attraverso diversi livelli di ploidia. Relativamente a questo ultimo carattere, nel genere *Triticum* si riscontrano diversi livelli di cui le 3 forme più importanti sono: diploide (genoma AA), tetraploide (genoma AABB) ed esaploide (genoma AABBDD). Ai diploidi appartiene il farro monococco (*Triticum monococcum* subspecie *monococcum*), il farro piccolo, il capostipite di tutto il genere *Triticum*, praticamente scomparso dalla coltivazione per secoli, è ritornato recentemente in auge per merito dei suoi pregi nutrizionali (glutine più digeribile, alto contenuto di grassi, fosforo, potassio, piridossina e betacarotene). I tetraploidi includono i frumenti “duri” o “turgidi” mentre negli esaploidi sono compresi i frumenti teneri e il farro spelta (*Triticum aestivum* subspecie diverse). Il monococco ha origini molto antiche (infatti è stato il primo frumento comparso circa 12 mila anni fa), mentre il frumento tenero ha origini più “moderne” (si stima la sua origine a soli – si fa per dire – 8000 anni fa). Pertanto, l’unico vero “grano antico” è il *Triticum monococcum*.

In letteratura sono presenti diversi lavori inerenti il grado di tossicità dei grani antichi nei confronti dei soggetti che presentano disordini collegati al glutine, in particolare pazienti celiaci e soggetti con sensibilità al glutine non-

celiaca (NCGS, dall'inglese Non-Celiac Gluten Sensitivity). Il nostro gruppo ha fornito importanti evidenze sul grado di tossicità di due varietà di grano ancestrale, Monlis e ID331, appartenenti alla specie *Triticum Monococcum*. In particolare abbiamo dimostrato che la grande maggioranza dei peptidi immunotossici del glutine sia del Monlis che dell'ID331, vengono degradati durante la simulazione della digestione gastro-duodenale in vitro, mentre i peptidi immunotossici del glutine dei grani moderni (*T. aestivum*) resistono alla digestione intestinale (1,2). Inoltre, abbiamo anche trovato che gli inibitori dell'amilasi/tripsina (ATIs) del grano Monococco, una famiglia di proteine non glutiniche resistenti alla proteasi che attivano l'immunità innata, sono sostanzialmente diverse da quelle dell'ATI del grano moderno, mostrando una maggiore digeribilità, che si traduce nell'incapacità di attivare l'immunità innata (3).

Nel complesso, questi risultati suggeriscono che il grano monococco presenta una tossicità inferiore per i soggetti con disturbi correlati al glutine e/o grano (NCWS, dall'inglese Non-Celiac Wheat Sensitivity).

Ad oggi non è stato riportato nulla sugli effetti del grano Monococco sullo sviluppo del diabete. Al contrario, gli effetti diabetogeni del grano proveniente da cultivar moderni sono stati precedentemente verificati nei topi diabetici non obesi (NOD).

L'obiettivo principale del presente studio è stato quello di valutare, in topi NOD, l'effetto diabetogenico di una dieta a base di grano Hammurabi, un antico grano diploide appartenente alla specie di *T. monococcum*, riscoperto di recente. Inoltre, utilizzando una simulazione della digestione umana gastrico-duodenale in vitro, abbiamo valutato l'azione degli enzimi digestivi proteasi ed amilasi rispettivamente sulla componente proteica (glutine) e amilacea della pasta Hammurabi. Pertanto, il presente studio è stato suddiviso in due work package:

1. Analisi dell'indice glicemico nei topi NOD nutriti con una dieta contenente grano Hammurabi;
2. Analisi della digeribilità della componente proteica e amilacea della pasta Hammurabi.

**WP 1. Analisi dell'indice glicemico nei topi NOD nutriti con una dieta  
contenente grano Hammurabi**

Background

Gli effetti diabetogeni del grano sono stati precedentemente verificati nei topi NOD (4-6). In particolare, il nostro gruppo ha evidenziato che topi NOD nutriti con una dieta contenente grano mostravano una maggiore incidenza di diabete associata a segni di enteropatia intestinale e livelli più elevati di citochine pro-infiammatorie nella mucosa (6). Studi meccanicistici sia in vivo che in vitro hanno definitivamente dimostrato un effetto diretto del glutine sul sistema immunitario e sulle cellule  $\beta$  del pancreas (7,8). Va sottolineato che tutti gli studi sopra menzionati sono stati eseguiti utilizzando grano proveniente da cultivar moderni. Si suppone che l'impiego di grano "moderno", per le migliorate caratteristiche agronomiche e tecnologiche, possa essere una causa dell'aumentata incidenza di celiachia e di malattie autoimmuni glutine-correlate (9). In particolare, il gruppo di Gorelick in uno studio recente su topi diabetici NOD ha evidenziato che le fonti moderne di grano sono più diabetogene rispetto a quelle ancestrali poliploidi (10). Il grano coltivato attualmente consiste essenzialmente di cinque specie: due esaploidi (genoma AABBDD), il grano tenero (*Triticum aestivum*) e la spelta (*Triticum spelta*); due tetraploidi (genoma AABB), il grano duro (*Triticum durum*) ed il farro (*Triticum dicoccum*), e una diploide (genoma AA), il grano monococco (*Triticum monococcum*). Si è inizialmente ipotizzato che il genoma di *T. monococcum* rappresentasse l'antenato del genoma A dei grani poliploidi; dati più recenti indicano invece che la fonte del genoma A dei grani duro e tenero è il *T. urartu*. Il genoma di *T. monococcum* è infatti ora denominato Am. In particolare, nello studio di Gorelick et al. (10) sono state testate cinque diete isocaloriche ed isoproteiche: (1) non diabetogena, senza apporto di frumento; (2) diabetogena, contenente *T. aestivum*; (3) a base di una varietà locale ancestrale di *T. aestivum*; (4) a base di una varietà locale ancestrale di *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* (farro selvatico); (5) a base di una varietà locale ancestrale di *T. turgidum* spp. *dicoccum* (farro coltivato). I risultati della sperimentazione hanno indicato che gli animali



## Consiglio Nazionale delle Ricerche Istituto di Scienze dell'Alimentazione

allevati con le diete 1, 3, 4 e 5 non sviluppano segni di diabete di tipo 1 (T1D) nell'arco dei 72 giorni della sperimentazione, al contrario dei topi allevati con la dieta 2. Questi risultati indicano chiaramente che diete basate su varietà ancestrali poliploidi di grano, compresa la varietà ancestrale di *T. aestivum*, risultano meno diabetogene dei moderni e convenzionali cultivar di frumento tenero. È inoltre interessante osservare che l'assenza di T1D risulta correlata a livelli sierici ridotti della citochina infiammatoria IFN- $\gamma$  ed a livelli aumentati di IL-10, una citochina anti-infiammatoria. Pochi sono finora i dati presenti in letteratura sugli effetti diabetogeni del grano monococco, un altro grano ancestrale. Nei suini, l'aumento di insulina e della glicemia post-prandiale dopo un pasto con grano monococco è caratterizzato da un livello assoluto più basso con un andamento bifasico rispetto ai profili ottenuti dopo un pasto con pane di frumento (11). Le proprietà di *T. monococcum* non sono state ancora studiate nei topi NOD. Nel presente progetto abbiamo focalizzato lo studio su un particolare cultivar di *T. monococcum*, il grano Hammurabi, disponibile commercialmente, per stimare gli effetti che fonti ancestrali di grano introdotte con la dieta hanno sull'insorgenza del T1D nel topo NOD. La nostra ipotesi è che il grano antico Hammurabi, in modo simile ai grani ancestrali testati nello studio di Gorelick et al, possieda un ridotto contenuto di molecole associate ad induzione di T1D, e quindi possa ridurre l'incidenza del T1D nel modello murino.

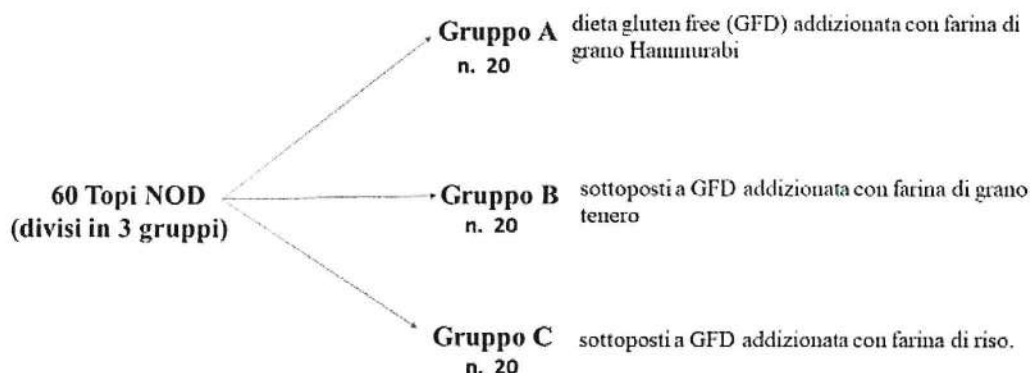
### Risultati

Sviluppo del protocollo di studio in vivo (Fig. 1). Topi NOD femmine di 12 settimane sono stati suddivisi in tre gruppi: Gruppo A, sottoposti a dieta gluten free (GFD) addizionata con farina di grano Hammurabi; Gruppo B, sottoposti a GFD addizionata con farina di grano tenero; Gruppo C, sottoposti a GFD addizionata con farina di riso.



Consiglio Nazionale delle Ricerche  
Istituto di Scienze dell'Alimentazione

Fig.1



Il contenuto proteico derivante da farina di cereale è stato mantenuto costante nelle tre diete (3,5%). In tabella 1 sono rappresentate le composizioni delle tre diete.

Tabella 1

	A (Hammurabi)	B (grano tenero)	C (riso)
Composizione*	Farina Hammurabi, latte scremato in polvere, fecola di patata, farina di estrazione di soia tostata, olio di soia, fosfato bicalcico, carbonato di calcio, bicarbonato di sodio, ossido di magnesio, cloruro di sodio	Farina di grano tenero, latte scremato in polvere, fecola di patata, farina di estrazione di soia tostata, olio di soia, fosfato bicalcico, carbonato di calcio, bicarbonato di sodio, ossido di magnesio, cloruro di sodio	Farina di riso, latte scremato in polvere, fecola di patata, farina di estrazione di soia tostata, olio di soia, fosfato bicalcico, carbonato di calcio, bicarbonato di sodio, ossido di magnesio, cloruro di sodio
Additivi x Kg	vit A 16000UI, vit D3 1400 UI, Fe 200mg, Mn 60 mg, Zn 75 mg, Cu 13 mg, I mg 1, sepolite 250 mg	vit A 16000UI, vit D3 1400 UI, Fe 200mg, Mn 60 mg, Zn 75 mg, Cu 13 mg, I mg 1, sepolite 250 mg	vit A 16000UI, vit D3 1400 UI, Fe 200mg, Mn 60 mg, Zn 75 mg, Cu 13 mg, I mg 1, sepolite 250 mg
	Composizione analitica (%)		
Proteina	18,5	18,5	18,0
Oli e grassi	4,0	4,0	4,0
Fibra	4,5	4,5	3,5
Ceneri	7,0	7,0	7,0

\*: le percentuali di farina di cereale, latte scremato in polvere e farina di soia sono adattate nelle tre diete al fine di ottenere un identico contenuto di proteine da cereale (3,5% proteine totali).

Durante i giorni di trattamento è stata monitorata la comparsa della patologia diabetica analizzando la glicemia a digiuno.

#### Andamento glicemico.

I topi sono stati monitorati per l'insorgenza di diabete attraverso la misurazione della glicemia con Glucometer One-Touch (Ortho Clinic Diagnostic, Milano, Italia) a intervalli settimanali, a partire dalla 12<sup>a</sup> settimana. Una concentrazione glicemica non a digiuno superiore a 250 mg/dL (13,8 mM) o, preferibilmente un aumento cronico superiore a 300 mg/dL (16,7 mM), è stata considerata appropriata per etichettare il topo come diabetico (12).

In Fig.2 è rappresentato l'andamento glicemico nei tre gruppi.

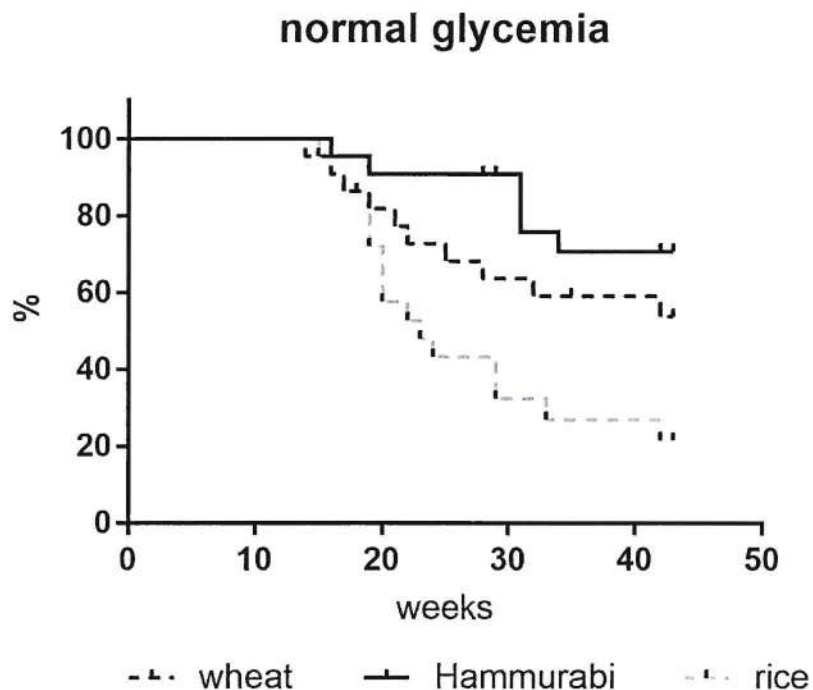


Fig. 2 Percentuale di topi con normale glicemia ai vari tempi del regime dietetico

I risultati dimostrano in maniera statisticamente significativa che la dieta a base di grano Hammurabi ritarda l'insorgenza del diabete in maniera significativa non solo nei riguardi della dieta a base di riso ma anche nei riguardi della dieta a base di grano tenero. Le differenze tra le tre curve risultano altamente significative (Log-rank Mantel-Cox test:  $P= 0.002$ ).

L'analisi *end point* dello sviluppo di iperglicemia è riportata in Fig.2

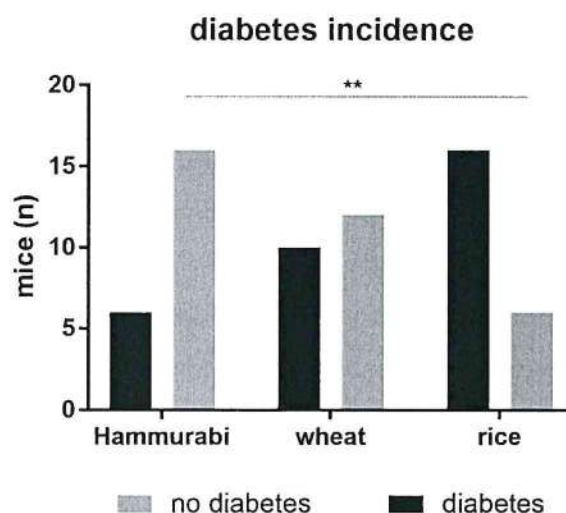


Figura 2. Numero di topi diabetici e non al termine del trattamento dietetico.

Il numero di topi che non sviluppano il diabete nel gruppo a dieta Hammurabi risulta essere 70,7%, contro il 53,7% del gruppo a dieta con grano ed il 21,6% del gruppo a dieta con riso. La differenza ottenuta con il gruppo a dieta Hammurabi rispetto al gruppo a dieta con riso è altamente significativa, mentre non c'è differenza statistica tra i due gruppi controllo e tra il gruppo Hammurabi ed il gruppo a dieta con grano.



## Consiglio Nazionale delle Ricerche Istituto di Scienze dell'Alimentazione

Questi risultati dimostrano in modo inequivocabile che, a parità di contenuto proteico totale e specifico di proteine di cereali, la farina da grano monococco Hammurabi ritarda l'insorgenza del diabete nel modello murino di diabete autoimmune.

### **WP 2. Analisi della digeribilità della pasta Hammurabi**

Nel corso del progetto è stata esaminata la digeribilità della pasta Hammurabi. Nello specifico è stata valutata l'azione degli enzimi digestivi proteasi ed amilasi rispettivamente sulla componente proteica (glutine) e amilacea della pasta. È stato applicando un processo di digestione statico *in vitro* che simula le fasi del tratto digestivo: orale (masticazione), gastrica, duodenale ed intestinale (13). I succhi digestivi sono stati riprodotti con concentrazioni e valori di *pH* simili a quelli fisiologici, così come tempi di incubazione dei singoli stadi. Gli enzimi digestivi della fase orale (amilasi), gastrica (lipasi, pepsina) e duodenale (enzimi pancreatici) sono tutti di origine suina reperibili in commercio. La fase intestinale è stata invece simulata mediante gli enzimi della parete intestinale di maiale (Brush Border Membrane Enzymes, BBM) estratti e purificati in laboratorio da un tratto di duodeno (14). La pasta Hammurabi è stata sottoposta a digestione *in vitro* immediatamente dopo un comune processo di cottura (15). I prodotti della digestione sono stati estratti e caratterizzati mediante tecniche proteomiche ed immunochimiche per la componente proteica e tecniche di spettrofotometria per la componente amilacea. Campione di pasta di grano duro di semola raffinata ed uno di semola integrale sono stati analizzati in confronto.

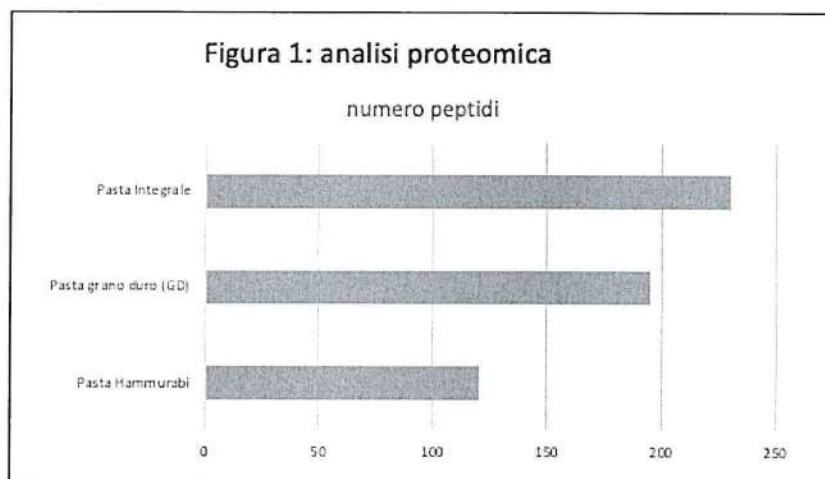
#### Metodi:

L'analisi della pasta Hammurabi è stata effettuata in confronto a un campione di pasta (semola 100%) e a uno di pasta integrale. I tempi di cottura sono stati effettuati come riportati in etichetta. Immediatamente dopo cottura la pasta è stata sottoposta a digestione orale, gastrica e duodenale, effettuata in accordo a

*Brodkorb et al 2019 (13)*, mentre la fase intestinale secondo la procedura di *Mamone et al 2015 (15)*. Dopo digestione, la frazione proteica/peptidica e la componente amilacea sono state estratte ed analizzate singolarmente. L'analisi proteomica mediante spettrometria di massa LC-MS/MS è stata eseguita in accordo a *Mazzarella et al 2015 (2)*. Le analisi del glucosio rilasciato nel corso della digestione e dell'amido residuo dopo digestione sono state valutate via spettrofotometria con i kit delle R-Biopharm.

### Risultati

L'analisi della frazione proteica era rivolta a caratterizzare la presenza di peptidi immunogenici per soggetti celiaci, rilasciati durante il processo di idrolisi. L'analisi mediante spettrometria di massa ha permesso di identificare 120 peptidi stabili alla digestione della pasta Hammurabi, rispetto a 195 peptidi e 230 peptidi rispettivamente della pasta semola della pasta integrale (Figura 1). Sebbene un minore numero di peptidi sia stata caratterizzato, molti dei peptidi della pasta Hammurabi contenevano sequenze immunogeniche, dunque tossiche per i celiaci. Questi dati confermavano una migliore digeribilità proteica della varietà Hammurabi, come precedentemente dimostrato per altre varietà di grano monococco (*Mazzarella et al 2015*).



Successivamente è stata effettuata una analisi immunochimica sulla pasta, dopo digestione in vitro. L'analisi è stata condotta mediante saggio ELISA utilizzando un anticorpo monoclonale R5 che riconosce in maniera specifica il pentapeptide QQFPF (16). Il test è stato condotto sui campioni proteina/peptidi estratti dalla pasta digerita. La pasta Hammurabi presentava un valore di glutine residuo di circa il 30% più basso rispetto invece al campione di pasta di semola e pasta integrale. Questo saggio confermava una maggiore digeribilità della frazione gluteninica, sebbene il quantitativo residuo di glutine risultava ancora essere ben al di sopra dei valori consentiti per essere consumata da celiaci

Lo studio della componente amilacea dopo digestione ha permesso di valutare l'amido resistenza dei campioni di pasta. Come mostrato in Figura 2, la pasta integrale e la pasta di semola mostravano un picco di rilascio di glucosio a 20 min. Al contrario la pasta Hammurabi mostrava un basso e graduale rilascio di glucosio nel tempo. Dopo 2 ore di digestione gastrointestinale (Figura 2 e Figura 3) la percentuale di amido resistente era maggiore nella pasta Hammurabi rispetto a quella di semola e integrale. Questi risultati mostravano la minore digeribilità della amido nella pasta Hammurabi con conseguente tasso di assorbimento più lento e dunque con un aumento più lento e più basso della glicemia.



Figura 2: Amido idrolizzato nella GID

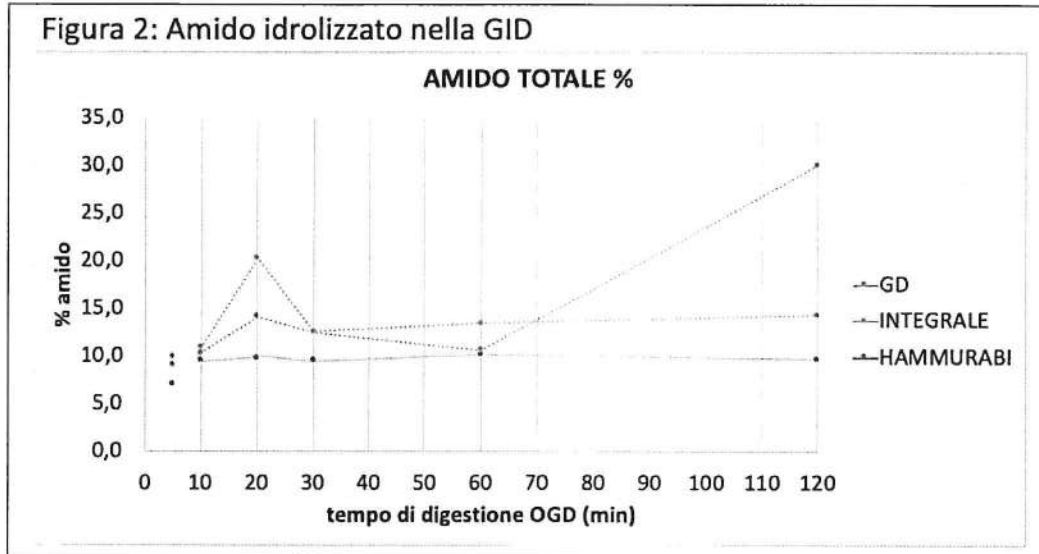
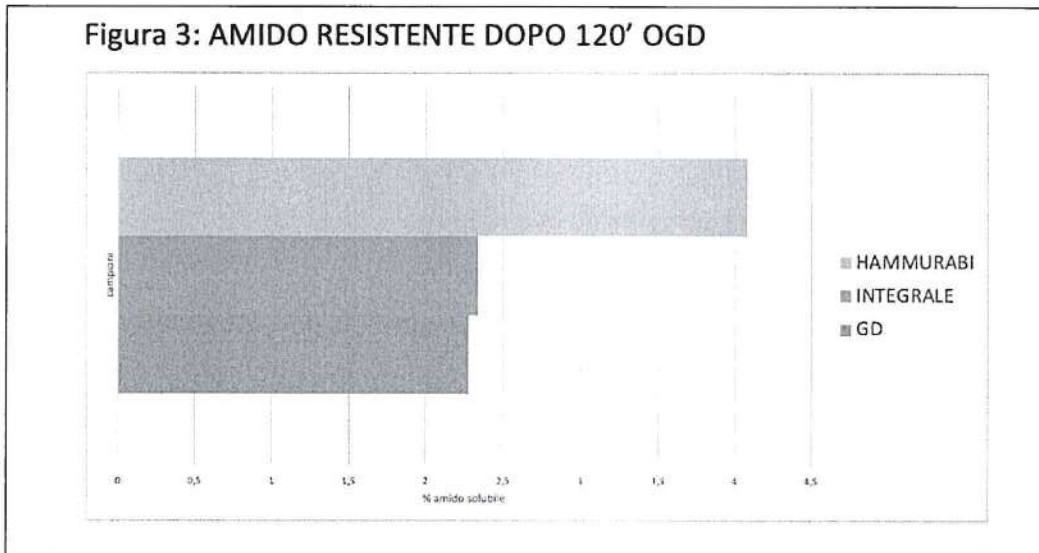


Figura 3: AMIDO RESISTENTE DOPO 120' OGD



I risultati di questo studio, dimostrano che il processo di digestione gastrointestinale non riduce il potere immunogenico del glutine. Sebbene l'analisi proteomica mostrava un diverso profilo peptidico, la caratterizzazione della componente proteica mediante spettrometria di massa evidenziava la presenza di un considerevole numero di peptidi immunogenici, per i soggetti celiaci. Il processo di digestione gastrointestinale sembrava ridurre in generale l'effetto

tossico, come mostrato dai risultati ELISA, ma ben al di sopra del valore consentito per i pazienti celiaci.

Interessante è stato valutare la componente amilacea, dopo digestione gastrointestinale. I risultati dimostravano una maggiore percentuale di amido resistenza della pasta Hammurabi, rispetto a quella di grano duro convenzionale e integrale. Questo dato suggerisce che la varietà Hammurabi può essere caratterizzata da un minor indice glicemico. Ulteriori studi sono necessari al fine di confermare i risultati di cui sopra, soprattutto in confronto con altre varietà di grano monococco.

### CONCLUSIONI

La pasta Hammurabi rispetto alla pasta di semola e alla pasta integrale:

- riduce l'insorgenza del diabete nel modello murino di diabete autoimmune;
- ha una maggior percentuale di amido resistente.
- ha una migliore digeribilità proteica;

Pertanto i nostri risultati suggeriscono che:

1. La varietà Hammurabi potrebbe essere caratterizzata da un minor indice glicemico e pertanto essere un cereale adatto alla dieta di pazienti affetti da sindrome metabolica (prediabete) e/o da diabete conclamato. Ovviamente, per confermare tale ipotesi, sono necessari altri studi, in particolare sarà molto importante analizzare l'indice glicemico della pasta Hammurabi mediante un trial clinico pilota in soggetti normali e/o con sindrome metabolica, necessario prima di eseguire uno studio clinico in pazienti con diabete. L'indice glicemico è un parametro che deve essere considerato nella scelta degli alimenti da introdurre nella dieta delle persone con il diabete. Una dieta con basso indice glicemico determina un miglioramento del controllo glicemico.

2. L'analisi del contenuto proteico della pasta Hammurabi, ha dimostrato che la parte proteica dannosa per i celiaci è in buona parte distrutta durante il processo di digestione gastrointestinale, contrariamente a quanto succede per il glutine della pasta di semola e della pasta integrale. Tuttavia, seppur meno tossico, l'Hammurabi non è comunque idoneo per pazienti celiaci, ma possedendo un glutine più digeribile potrebbe essere un candidato ideale per la dieta di quella parte di popolazione affetta sia da "sensibilità al grano non-celiaca" (NCWS, dall'inglese Non-Celiac Wheat Sensitivity) sia da sindrome dell'intestino irritabile (IBS, dall'inglese Irritable Bowel Syndrome) e che intendono limitare l'assunzione di glutine potenzialmente dannoso per la loro salute. Da evidenziare che il numero di nuovi casi diagnosticati di NCWS e IBS cresce in tutto il mondo. Nei paesi industrializzati occidentali la prevalenza nella popolazione è compresa tra il 5 e il 10 per cento.

Dati recenti dimostrano che oltre al glutine, altre molecole presenti nei cereali, quali gli inibitori dell'amilasi/tripsina (ATIs) ed i carboidrati fermentabili a catena corta (FODMAPs), scatenano la sintomatologia intestinale nei soggetti con NCWS e con IBS. Pertanto, prima di effettuare una sperimentazione clinica sui pazienti con NCWS e/o con IBS, è importante analizzare il contenuto delle ATIs e dei FODMAPs nel grano Hammurabi, rispetto ad altri monococchi e grani moderni.

#### Bibliografia

1. Gianfrani C et al. Immunogenicity of Monococcum wheat in Celiac Patients. *Am J Clin Nutr* 2012;96:1338–44.
2. Mazzarella G et al. Extensive in vitro gastrointestinal digestion markedly reduces the immune-toxicity of gliadin from ancient Triticum monococcum wheat: implication for celiac disease prevention. *Mol Nutr Food Res*. 2015 Sep;59(9):1844-54. doi: 10.1002/mnfr.201500126.

 Consiglio Nazionale delle Ricerche  
Istituto di Scienze dell'Alimentazione

3. Iacomino G et al. Lack of Adverse Immune Responses to Amylase Trypsin Inhibitors in Ancient Wheat: Implications for *Wheat-Related Disorders* (submitted *Food Research International*).
4. Funda et al, *Diabetes Metab. Res. Rev.* 1999, 15, 323;
5. Schmid et al, *Clin. Immunol.* 2004,111, 108;
6. Maurano et al, *Diabetologia* 2005, 48, 931
7. Antvorskov et al, *Diabetologia* 2014, 57: 1770;
8. Bruun et al, *J Diabetes Res.* 2016; 2016:2424306
9. Adlercreutz et al, *Acta Paediatr.* 2015, 104, 178.
10. Gorelick J et al. The Impact of Diet Wheat Source on the Onset of Type 1 Diabetes Mellitus-Lessons Learned from the Non-Obese Diabetic (NOD) Mouse Model. *Nutrients.* 2017 May 10;9(5).
11. Barone et al, *Nutrients* 2018 ;10 :16
12. Leiter, *Methods Mol Biol* 2009 ;560 :1
13. Brodkorb, A., et al (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature protocols*, 14(4), 991.
14. Picariello L et al. (2016). Use of brush border membrane vesicles to simulate the human intestinal digestion. *Food Research International*, 88, 327-335.
15. Mamone, G., et al. (2015). Tracking the fate of pasta (T. Durum semolina) immunogenic proteins by in vitro simulated digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(10), 2660-2667.
16. Di Stasio et al (2020). Comparative Analysis of in vitro Digestibility and Immunogenicity of Gliadin Proteins From Durum and Einkorn Wheat. *Front Nutr* May 22;7:56

Avellino 21/10/2020



Il Responsabile Scientifico  
D. Giuseppe Mazzerella

*Giuseppe Mazzerella*