

CARATTERISTICHE QUALITATIVE E QUANTITATIVE DEL SEME DI *CANNABIS SATIVA* L. *Galasso I.*, Russo R., Mapelli S., Ponzoni E., Brambilla I, Reggiani R.*

Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, CNR, via Corti 12, 20133
Milano

**incoronata.galasso@ibba.cnr.it*

INTRODUZIONE

La crescente domanda di oli vegetali e proteine, insieme con l'attuale consapevolezza circa il loro ruolo nutrizionale e funzionale nella dieta umana, ha reso indispensabile caratterizzare nuove fonti vegetali. A questo proposito, il seme della canapa (*Cannabis sativa* L.) contenente proteine di alta qualità e circa il 75% di acidi grassi polinsaturi potrebbe costituire una nuova risorsa di proteine e olio per l'alimentazione umana e degli animali.

In particolare, le proteine del seme di canapa costituiscono un'ottima fonte nutrizionale, in quanto contengono una discreta quantità di tutti gli amminoacidi essenziali ^[1]. Le due proteine principali nei semi di canapa sono la 11S globulina (edestina) e la 2S albumina. L'edestina, rappresenta circa il 60-80% del contenuto proteico totale e recentemente è stata caratterizzata a livello biochimico e molecolare ^[2]. Tuttavia, la qualità nutrizionale delle proteine vegetali è influenzata da numerosi fattori tra cui la composizione amminoacidica e la digeribilità. La composizione in amminoacidi può essere influenzata dalla variabilità genotipica o da condizioni agronomiche, quali la fertilità del suolo e la lavorazione post-raccolta che altera il rapporto tra i componenti dei semi, mentre la digeribilità delle proteine può essere influenzata dalla struttura delle proteine, da alcuni processi industriali che utilizzano alte temperature e dalla presenza di composti antinutrizionali. Questi ultimi si trovano in tutte le pianta e/o nei semi ed hanno un ruolo rilevante nella

difesa della pianta contro animali predatori e patogeni. Quando, però, il contenuto nei semi di questi composti antinutrizionali è molto alto, essi determinano un effetto depressivo sulla digeribilità e sull'utilizzazione delle proteine (inibitori di proteasi, lectine, composti fenolici, saponine), dei carboidrati (inibitori dell'amilasi, composti polifenolici) e dei minerali (acido ossalico, acido fitico) da parte dell'uomo o degli animali.

Recentemente, è stato dimostrato che la farina di canapa (sottoprodotto ottenuto dopo estrazione dell'olio dai semi) contiene alcuni di questi composti antinutrizionali: inibitori di proteasi, tannini condensati, glicosidi cianogenici, saponine ed acido fitico. Tra questi l'acido fitico e gli inibitori di tripsina risultano presenti nel seme in quantità piuttosto elevate ^[1]. L'acido fitico (mio-inositolo esafofosfato) è la principale forma organica di fosforo presente nei semi di moltissime piante. La sua presenza riduce l'assorbimento di micro e macro elementi nel tratto gastrointestinale dell'uomo e degli animali monogastrici, essendo un forte chelante di cationi minerali come zinco, calcio, magnesio e ferro con cui forma dei sali (fitati). I fitati, inoltre, formano legami complessi con residui amminoacidici delle proteine, diminuendone così la digeribilità.

Gli animali monogastrici, incluso l'uomo, non sintetizzano l'enzima fitasi e quindi non riescono a digerire i fitati presenti nei semi. Pertanto l'acido fitico, limitando la biodisponibilità del fosforo e dei minerali, diminuisce il valore nutritivo dei semi e degli alimenti derivati. Per quanto riguarda gli inibitori di tripsina anch'essi sono considerati degli antinutrizionali in quanto capaci di bloccare l'attività degli enzimi digestivi con conseguente diminuzione della digestione ed assimilazione delle proteine.

Qui riportiamo l'analisi della composizione del seme di una collezione di varietà ed accessioni di canapa, di diverse origini geografiche, coltivate nello stesso ambiente (Tabella 1). Sono stati valutati i contenuti di acidi grassi, proteine, e composti

antinutrizionali, ed è stata determinata la composizione amminoacidica delle proteine. Parallelamente è stata avviata una caratterizzazione dei geni che codificano per le proteine di riserva del seme (11S edestina e 2S albumina) volta ad individuare peptidi bioattivi (corte sequenze composte da 3 a 10 amminoacidi) aventi attività antiossidante, antipertensiva e cardioprotettiva.

ATTIVITÀ

Sono stati analizzati 20 genotipi di canapa ottenuti dalla banca dei semi, da ditte sementiere o da scambi con altri ricercatori (Tabella 1).

Tutti i genotipi sono stati coltivati e portati a seme nello stesso ambiente. L'analisi del profilo degli acidi grassi, in tutti i genotipi analizzati, ha confermato che l'olio è composto principalmente da acidi grassi insaturi e, come atteso, tra gli acidi grassi polinsaturi l'acido linoleico (18:2 ω 6) e α -linolenico (18:3 ω 3) sono risultati i più abbondanti. Il contenuto proteico nella farina è piuttosto variabile tra i diversi genotipi.

Le accessioni CAN20 e CAN40 hanno mostrato la concentrazione di proteine più alta (35,6 % del peso secco). In generale il contenuto medio di proteina nelle farine è significativamente più alto nelle accessioni (34,1%) rispetto alle cultivar (33,3%).

Per quanto riguarda la composizione amminoacidica delle proteine, le analisi eseguite non hanno invece rivelato grosse differenze tra i diversi genotipi di canapa, mentre il contenuto amminoacidico medio dei semi di canapa è comparabile col contenuto amminoacidico del seme di soia, che è il legume più consumato nell'alimentazione umana e zootecnica (Figura 1).

Tabella 1 - Accessioni (da CAN19 a CAN58) e cultivar di canapa (da cv. Finola a cv. Kc Dora) ottenute dalle banche dei semi (genbank) e ditte sementiere

	Genotipi	Origine	Donatore
	<i>C. sativa</i> CAN19	Italy	IPK ¹
	<i>C. sativa</i> CAN20	Korea	IPK
	<i>C. sativa</i> CAN24	Italy	IPK
d	<i>C. sativa</i> CAN26	Turkey	IPK
i	<i>C. sativa</i> CAN39	China	IPK
o	<i>C. sativa</i> CAN40	Italy	IPK
i	<i>C. sativa</i> CAN48	Italy	IPK
c	<i>C. sativa</i> CAN51	Argentina	IPK
h	<i>C. sativa</i> CAN58	Spain	IPK
e	<i>C. sativa</i> cv. Finola	Finland	Ditta sementiera
	<i>C. sativa</i> cv. Carmagnola	Italy	Ditta sementiera
	<i>C. sativa</i> cv. Carmagnola Selezionata (CS)	Italy	CRA-CIN ²
	<i>C. sativa</i> cv. Fibranova	Italy	CRA-CIN ²
m	<i>C. sativa</i> cv. Fedora	France	Ditta sementiera
o	<i>C. sativa</i> cv. Futura 75	France	Ditta sementiera
n	<i>C. sativa</i> cv. Felina 32	France	Ditta sementiera
o	<i>C. sativa</i> cv. Ferimon	France	Ditta sementiera
i	<i>C. sativa</i> cv. Codimono	Italy	CRA-CIN ³
c	<i>C. sativa</i> cv. Carmaleonte	Italy	CRA-CIN ³
h	<i>C. sativa</i> cv. Kc Dora	Hungary	Ditta sementiera
e			

¹ IPK, Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Germany (<http://gbis.ipk-gatersleben.de/>)

² CREA-CIN, Centro di ricerca per le colture industriali, Bologna, dal dr. A. Di Candilo

³ CREA-CIN, Centro di ricerca per le colture industriali, Rovigo, dal dr. G. Grass

Particolarmente interessante è la grande quantità di arginina presente nelle farine di canapa (120 g kg⁻¹ proteina) rispetto a soia (75 g kg⁻¹ proteina). L'arginina è un amminoacido semi-essenziale importante soprattutto nei primi anni dello sviluppo dei bambini e degli animali, in quanto solo negli individui adulti la sua via biosintetica è completamente espressa.

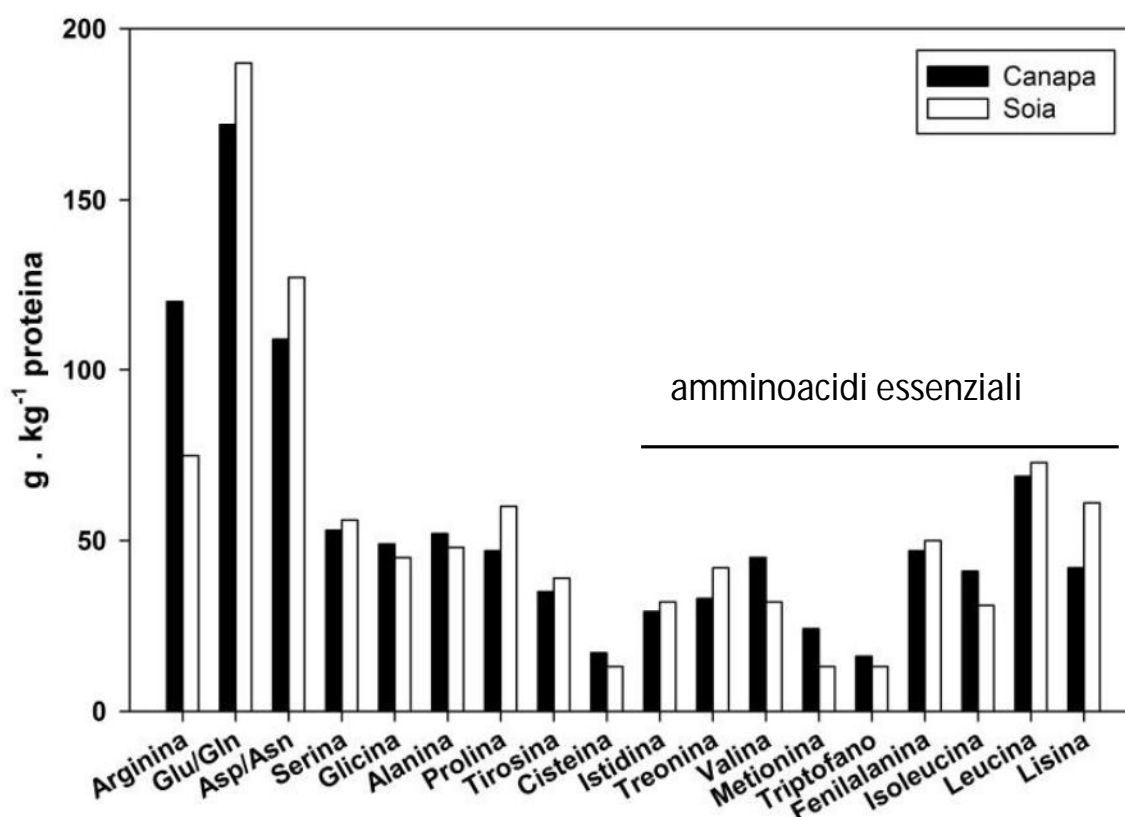


Figura 1 - Confronto del profilo amminoacidico medio delle proteine di canapa e soia

Un'altra caratteristica importante della proteina del seme di canapa è il contenuto in amminoacidi essenziali (istidina, treonina, valina, metionina, triptofano, fenilalanina, isoleucina, leucina e lisina) in quanto l'uomo e gli animali non sono in grado di sintetizzarli e pertanto devono essere assunti con la dieta.

Le nostre analisi hanno evidenziato che quattro amminoacidi essenziali (valina, metionina, triptofano, isoleucina) su nove sono presenti in concentrazioni più alte nelle farine di canapa rispetto alla soia, mentre i rimanenti cinque sono leggermente più abbondanti in soia (Figura 1). Come riportato in altre oleaginose, anche in canapa la lisina è l'amminoacido limitante.

Durante il lavoro di caratterizzazione del seme di canapa, particolare attenzione è stata posta all'analisi dei composti antinutrizionali dato che, ad oggi, solo pochissimi lavori

scientifici li hanno presi in considerazione. Questo deriva dal fatto che in passato il seme di canapa è stato poco considerato a scopo alimentare. Il gruppo di ricerca dell'IBBA-CNR, grazie ad alcuni progetti (Velica e Filagro) finanziati dalla Regione Lombardia e dal CNR sulla valutazione nutrizionale del seme, ha intrapreso questo studio già da diversi anni. Le primissime analisi eseguite su alcune cultivar italiane e francesi hanno evidenziato livelli di acido fitico e di inibitori di tripsina piuttosto elevati nelle farine^[1-3]. In seguito a questi primi risultati, l'analisi è stata estesa ad un numero maggiore di genotipi di diversa provenienza geografica coltivati nello stesso ambiente^[4].

Questa indagine ha mostrato contenuti trascurabili di tannini condensati, glicosidi cianogenici e saponine, mentre ha confermato che il contenuto in acido fitico ed inibitore di tripsina è piuttosto alto, anche se molto variabile tra i diversi genotipi. Come si può osservare dalla Figura 2 esiste un'ampia variabilità per entrambi i composti antinutrizionali tra i diversi genotipi analizzati.

Il livello di acido fitico è compreso tra 43,7 e 75,5 g kg⁻¹ di peso secco, mentre il contenuto di inibitori di tripsina varia tra 10,8 e 27,8 unità mg⁻¹ di peso secco. I genotipi Kc Dora, Carmaleonte, CAN40 e CAN26 presentano la quantità più bassa di entrambi i composti antinutrizionali.

L'analisi del coefficiente di correlazione di Pearson ha mostrato una correlazione positiva ($r = 0,697$) tra l'acido fitico e gli inibitori di tripsina.

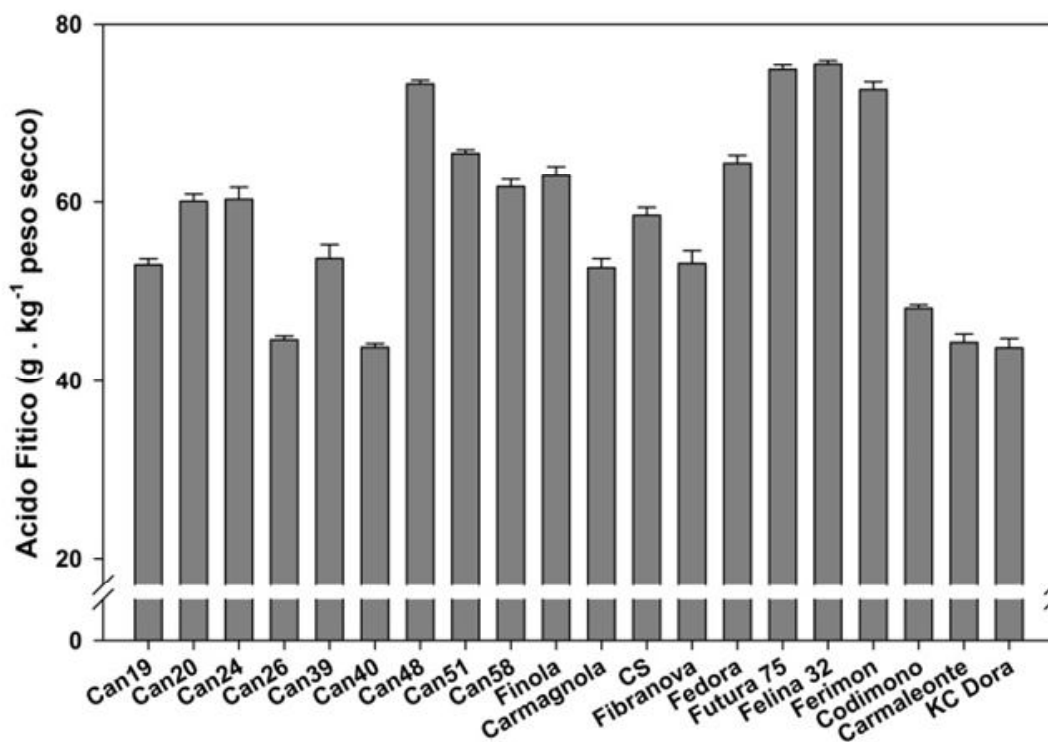
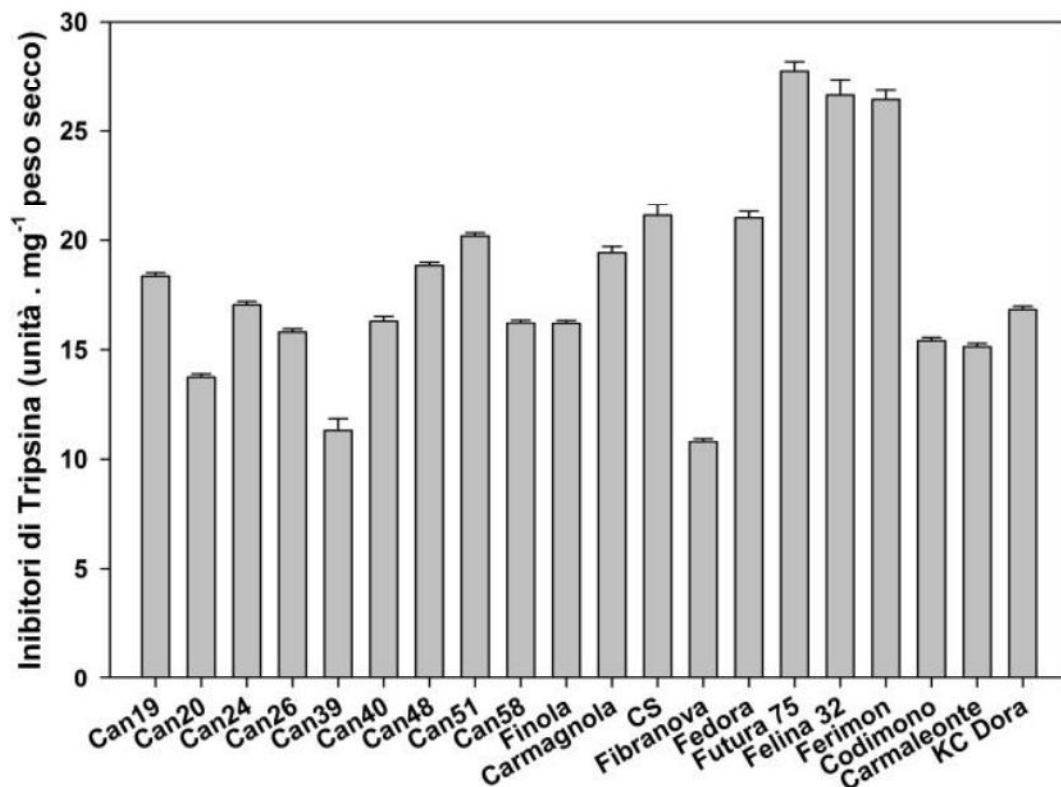


Figura 2 -Contenuto in inibitore di tripsina (sopra) e acido fitico (sotto) nelle farine dei diversi genotipi di canapa

In generale, ad eccezione di CAN48, tutti genotipi di origine italiana (CAN19, CAN24, CAN40, Carmagnola, CS, Fibranova, Codimono, Carmaleonte) mostrano un contenuto di acido fitico ed inibitori di tripsina inferiore rispetto alle varietà francesi (Futura, Felina e Ferimon).

L'alto contenuto di questi due antinutrizionali potrebbe rendere un po' limitante l'utilizzo del seme o della farina di canapa per la preparazione di alimenti funzionali o per l'alimentazione degli animali monogastri. Una riduzione di questi composti sarebbe quindi auspicabile. Infatti, per la soia il cui contenuto in acido fitico è circa $2,20 \text{ g kg}^{-1}$, per il fagiolo $1-1,5 \text{ g kg}^{-1}$ ed anche per alcuni cereali quali mais, grano e riso sono già stati prodotti dei mutanti a ridotto contenuto in acido fitico (circa il 70-90% in meno) mediante mutagenesi [5-7].

Un'altra attività, di cui il gruppo di ricerca dell'IBBA-CNR si sta occupando, è quella dell'identificazione e caratterizzazione di tutti i geni che codificano per le proteine di riserva del seme di canapa, in quanto le proteine del seme potrebbero costituire una fonte di peptidi bioattivi con attività antipertensiva ed antiossidante. I peptidi bioattivi sono costituiti da corte sequenze amminoacidiche (3-10 AA) presenti in alcune proteine vegetali che, liberati a livello gastroenterico mediante l'azione di proteasi, svolgono funzioni biologiche oltre al semplice compito nutrizionale.

Recentemente sono stati estratti, dalle proteine totali del seme di canapa, alcuni peptidi bioattivi (Tabella 2) aventi attività antiossidante e antipertensiva [8, 9].

Pertanto per conoscere in quale proteina sono contenuti abbiamo avviato un lavoro di identificazione e caratterizzazione dei geni che codificano per tutte le proteine di riserva del seme. Dopo identificazione, amplificazione mediante PCR, clonaggio e sequenziamento sono state identificate tre principali famiglie geniche che codificano per le proteine di riserva del seme: 11S edestina, 2S albumina e 7S vicilina-like (quest'ultima mai

riportata prima da altri autori). L'analisi delle sequenze nucleotidiche che codificano per l'edestina e l'analisi delle sequenze amminoacidiche dedotte da quelle nucleotidiche, ha messo in luce che l'edestina è codificata da tre tipi diversi di geni (denominati ede1, ede2, ede3) con una percentuale di similarità tra di loro pari al 50%. L'analisi della struttura primaria di tutte le sequenze amminoacidiche ha permesso di dimostrare che alcuni di questi peptidi bioattivi, con attività antipertensiva ed antiossidante, potrebbero derivare dall'edestina1. Infatti, tutti i genotipi di canapa analizzati hanno mostrato all'interno della sequenza amminoacidica dell'edestina1 il peptide NHAV e IPAGV mentre per quanto riguarda HVRETALV, l'edestina1 ne contiene uno simile al 75% HVREGIDV. Nessuna di queste corte sequenze amminoacidiche, riportate in Tabella 2, è stata ritrovata nella sequenza amminoacidica della 2S albumina o della 7S vicilina-like.

Tabella 2. Peptidi bioattivi

	Peptidi bioattivi	Attività
Lu et al. (2010)	HVRETALV	antiossidante
	NHAV	antiossidante
Girgih et al. (2014)	WVYY	antipertensiva
	PSLPA	antipertensiva
	IPAGV	antipertensiva
	WYT	antipertensiva

CONCLUSIONI

Le nostre analisi confermano che il seme di canapa è un prodotto eccellente per la preparazione di alimenti e mangimi in termini di contenuto proteico, composizione dell'olio e profilo amminoacidico, ma il contenuto di alcuni composti antinutrizionali, in particolare l'acido fitico e inibitori di tripsina, può influenzare negativamente il suo potenziale valore nutrizionale. Pertanto, un miglioramento genetico per questi caratteri sarebbe auspicabile.

Sebbene le nostre analisi hanno esplorato solo una piccola collezione di diversi genotipi di canapa, i risultati ottenuti mettono in evidenza che esiste una buona variabilità per tutti i componenti del seme e che questa variabilità potrebbe essere utilizzata per migliorare la qualità del seme.

Infine, le conoscenze acquisite sulla struttura primaria di tutte le proteine di riserva del seme potranno essere utilizzate, in un immediato futuro, per velocizzare il ritrovamento di nuovi peptidi bioattivi anche *in silico* mediante l'uso di diversi programmi informatici.

BIBLIOGRAFIA

- [1] R. Russo, R. Reggiani. Evaluation of protein concentration, amino acid profile and antinutritional compounds in hempseed meal from dioecious and monoecious varieties. *American Journal of Plant Sciences* **2015**, 6: 14-22.
- [2] T. Docimo, I. Caruso, E. Ponzoni, M. Mattana, I. Galasso. Molecular characterization of edestin gene family in *Cannabis sativa* L. *Plant Physiology and Biochemistry* **2014**, 84: 142–148.
- [3] R. Russo, R. Reggiani. Variability in Antinutritional compounds in Hempseed meal of Italian and French varieties. *Plant* **2013**, 1: 25-29.
- [4] I. Galasso, R. Russo, S. Mapelli, E. Ponzoni, I. M. Brambilla, G. Battelli, R. Reggiani. Variability in seed traits in a collection of *Cannabis sativa* L. genotypes. *Frontiers in Plant Science* **2016**, 7: 688.
- [5] V. Raboy. Approaches and challenges to engineering seed phytate and total phosphorus. *Plant Science* **2009**, 177: 281–296.

- [6] T. Rose, L. Liu, M. Wissuwa. Improving phosphorus efficiency in cereal crops: Is breeding for reduced grain phosphorus concentration part of the solution? *Frontiers in Plant Science*. **2013**, 4.
- [7] F. Sparvoli, E. Cominelli. Seed Biofortification and Phytic Acid Reduction: A Conflict of Interest for the Plant? *Plants* **2015**, 4: 728-755.
- [8] R.R. Lu, P. Qian, Z. Sun, X.H. Zhou, T.P. Chen, J.F. He, H. Zhang, J. Wu. Hempseed protein derived antioxidative peptides: purification, identification and protection from hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. *Food Chemistry* **2010**, 123: 1210-1218.
- [9] A.T. Girgih, R. He, S. Malomo, M. Offengenden, J. Wu, R.E. Aluko. Structural and functional characterization of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein-derived antioxidant and antihypertensive peptides. *Journal of Functional Foods* **2014**, 6: 384-394.