



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE DELLE PRODUZIONI VEGETALI**
INDIRIZZO AGRONOMIA AMBIENTALE - CICLO XX
Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali

**Isoflavoni e proteina in soia.
Valutazione di varietà in differenti condizioni
di gestione agronomica.**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Andrea Battisti _____

Supervisore : Ch.mo Prof. Giuliano, Mosca _____

Dottorando : Giuseppe Barion

DATA CONSEGNA TESI

31 gennaio 2008

1	
Riassunto	5
Summary	6
1 Introduzione	7
1.1 LA SOIA: ORIGINE E DIFFUSIONE	7
1.2. CARATTERI BOTANICI	7
1.3. TIPI DI ACCRESCIMENTO	12
1.4. SOSTANZE CON FUNZIONE NUTRACEUTICA	12
1.4.1 GLI ISOFLAVONI.....	14
1.4.2 LINEA BIOSINTETICA DEGLI ISOFLAVONI.....	16
1.4.3 Proprietà nutraceutiche degli isoflavoni di soia.....	23
1.4.4 Malattie cardiovascolari e isoflavoni di soia	24
1.4.5 Osteoporosi e isoflavoni di soia.....	25
1.4.6 Cancro e isoflavoni di soia.....	26
1.4.7 Assorbimento e metabolismo degli Isoflavoni	27
1.4.8 Tenore e composizione in isoflavoni nel seme di soia.	29
1.5 ASSIMILAZIONE DELL’AZOTO	31
1.6. FISSAZIONE DELL’AZOTO ATMOSFERICO	32
1.6.1 Tecniche di misura dell’azoto fissato e assimilato.	33
1.6.2 Proteine	38
1.7 Importanza dei prodotti a base di soia	42
1.7.1 Definizioni e metodi di preparazione.....	43
1.7.2 Farina e tritume di soia	46
1.7.3 Farine di soia parzialmente disoleate “Extruded Expelled”	46
1.7.4 Farina di soia testurizzata “Textured Soy Flour”.....	47
1.7.5 Concentrati.....	47
1.7.6 Concentrati di proteina testurizzati	48
1.7.7 Isolati proteici	48
1.7.8 Soy Foods e ingredienti alimentari	48
1.8 COMPOSIZIONE AMINOACIDICA	49
1.8.1 Proteine	50
1.8.2 Inibitori della digestione	53

1.8.3 Le proteasi a serina.....	55
1.8.4 Lectine (emoglutinine)	57
2 Scopo del lavoro.....	59
3 Materiali e metodi	60
3.1 PROVA VARIETALE	60
3.1.1 Operazioni colturali eseguite in località Legnaro	64
3.1.2 Operazioni colturali eseguite in località Pozzoveggiani	65
3.1.3 Analisi effettuate nelle prove varietali:	67
3.2 PROVA D'IRRIGAZIONE E CONCIMAZIONE.....	71
3.2.1 Protocollo coltivazione prova d'irrigazione (2006)	73
3.2.2 Analisi effettuate nella prova di irrigazione:	74
3.2.3 Coltivazione in terreni diversi	93
4 Risultati e discussione	95
4.1 EMBRIONE VARIAZIONI DI COMPOSIZIONE.....	95
4.1.2 Forme glucosiliche	95
4.1.3 Forme maloniliche.....	95
4.1.4 Forme Agluconiche	96
4.2 COTILEDONE VARIAZIONI DI COMPOSIZIONE	97
4.2.1 Forme glucosiliche	97
4.2.2 Forme maloniliche.....	97
4.2.3 Forme agluconiche	97
4.3 SINTESI SULLA VARIAZIONE DI COMPOSIZIONE	98
4.4 COMPOSIZIONE NELLE SINGOLE VARIETÀ	98
4.5 ISOFLAVONI TOTALI	104
4.6 PROTEINA E ISOFLAVONI.....	107
4.7 EFFETTO DELL'IRRIGAZIONE	113
4.7.1 Produzione di isoflavoni totali	113
4.7.2 Analisi delle ureidi durante la fase del ciclo	125
4.8 COLORAZIONE DELL'ILO.....	131
4.9 EFFETTO DEL DIVERSO TIPO DI TERRENO	132
5 Conclusioni.....	139
6 Bibliografia	140

Riassunto

La presenza della soia negli avvicendamenti colturali italiani può parzialmente rispondere ad una crescente esigenza di salvaguardia dell'ambiente, sfruttando la capacità naturale di questa coltura di accumulare l'azoto atmosferico in composti proteici ad elevato valore biologico, parte dei quali può migliorare la disponibilità di azoto organico nel terreno. Presso l'azienda agraria sperimentale dell'Università degli Studi di Padova, è stata svolta una sperimentazione volta a valutare la diversa attitudine delle principali varietà di soia coltivate in Italia per la produzione di molecole a carattere "nobile", quali isoflavoni e proteine. Queste sostanze sono attualmente molto studiate per la loro funzione nutraceutica, essendo in grado – se assunte regolarmente con la dieta – di agire nella prevenzione e/o rallentamento nell'insorgenza di alcune patologie gravi, come i sintomi della post-menopausa per l'azione antitumorale, riduzione del colesterolo.

La sperimentazione ha riguardato la coltivazione di 35 e 28 varietà diverse, rispettivamente nel 2005 e nel 2006 e 2007, sia con metodo convenzionale che biologico. Dalle analisi di laboratorio mediante metodica HPLC eseguite sugli embrioni decotiledonati e sui cotiledoni è stato possibile osservare il diverso profilo biochimico dei genotipi studiati, evidenziando la vocazione alla destinazione nutraceutica o alla produzione di alimenti ad elevato valore aggiunto (isolati proteici), indicando che esiste una variabilità intraspecifica modesta per la proteina (C.V. <3%) e più marcata per gli isoflavoni (C.V. 27%). La concentrazione di molecole nutraceutiche derivanti dal metabolismo secondario (isoflavoni) è risultata essere sensibile al tipo di tecnica di coltivazione utilizzata. Nel corso del 2006 è stata eseguita una seconda sperimentazione allo scopo di valutare l'effetto dell'irrigazione, del tipo di terreno e della dotazione di azoto del suolo sul contenuto in isoflavoni e saponine, considerando due varietà, una con elevata attitudine alla concentrazione di isoflavoni e modesta attitudine alla produzione di proteina (Ales, KWS) e l'altra con bassa attitudine alla concentrazione di isoflavoni ed elevata per la proteina (Nikir, Pioneer). Le due varietà sono state coltivate in condizioni di ottimale rifornimento idrico (ETM) in comparazione con un controllo mantenuto in asciutto. Si è saggiato inoltre l'effetto di una concimazione azotata tardiva (fase R3).

I risultati ottenuti indicano che per entrambe le varietà, le condizioni di evapotraspirazione massima e l'assenza di apporti azotati (tardivi) determinano un maggiore accumulo di isoflavoni nel seme rispetto al controllo non irrigato e concimato (accumulo maggiore dell' 11%,) effetto maggiormente riscontrabile nei semi portati dalle ramificazioni laterali.

Summary

The soybean can be a top crop for the health's environment. It's a crop which fixes the atmospheric nitrogen in his tissues. The nitrogen is fixed by nitrogenase-reductase to produce high biological value Organic compound. A part of these substances remains in the soil and can to enrich the soil fertility. (organic-N availability). In the Padua University Experimental Farm, a research work has been realized for to evaluate the nutraceutical compounds production of the most important soybean varieties diffused in Italy. The nutraceutical compounds examined are isoflavones and proteins.

The isoflavones and the soybean proteins are the positive effects on the human health if they are firmly integrated in the diet. (Cancer prevention, menopause symptom alleviation, reduction of the cholesterol accumulation) (Lacombe S et al 2000).

This work has concerned the study of the 35 and 28 soybeans varieties during the 2005. 2006 and 2007. The varieties are cultivated in two different ways:

- a) biological way
- b) traditional way

The production of the isoflavones are been evaluated in the different plant parts (germ and cotyledon) with a simple HPLC analysis method. A variability coefficient $>27\%$ has been found. A different varieties vocation for the soyfood productions has been underlined.

Some varieties are good for the nutraceutical production (high contents in isoflavone compound), some varieties are good for the low content isoflavone production (baby meal).

The agronomic variables have influenced the isoflavone concentration in the soybean seeds

In the 2006 and 2007 a second experiment has been realized for to study the irrigation effect, the nitrogen input effect, the soil type effect, on the isoflavone and proteins production. For this study two different varieties has been chosen: Ales (high isoflavone concentration low protein concentration) and Nikir (high protein concentration and low isoflavone concentration). These varieties are grown in the water optimal availability condition and they have compared with a control non irrigated.

By the results is it possible to see witch the ETM condition determine a major isoflavone concentration, (+11%) in the seeds in comparison with the control non irrigated and fertilized. This effect is more evident in the seeds produced on the stem ramification.

1 Introduzione

1.1 LA SOIA: ORIGINE E DIFFUSIONE

La soia è una pianta annuale originaria dell'Asia centro-orientale. Le prime notizie certe di questa pianta risalirebbero al 2° millennio a.C., anche se probabilmente era conosciuta già molto prima. Fino alla fine dell'Ottocento era coltivata esclusivamente in Cina. Nel XVIII secolo fu portata in Europa e agli inizi del XIX secolo negli Stati Uniti, dove per anni fu coltivata come prodotto agricolo secondario, destinato alla produzione di foraggio. Nei primi anni Venti lo sviluppo dell'industria della trasformazione della soia diede un notevole impulso alla coltivazione di questo legume, che oggi costituisce il terzo prodotto agricolo statunitense, dopo il mais e il grano. Gli Stati Uniti producono circa il 60% della soia venduta nel mondo e destinano il 30% circa della loro produzione all'esportazione. Brasile e Cina detengono rispettivamente una quota del 14 e del 10% della produzione mondiale ed estese coltivazioni di soia si trovano, inoltre, anche in Argentina, Taiwan, Canada e India. In Europa è coltivata soprattutto in Italia e Francia.

La coltivazione della soia nell'UE è scesa da 500.000 ettari del 1998 a poco più della metà nel 2004 (270.000 ettari), peggiorando il grado di auto approvvigionamento sia dei semi che delle farine. La soia di produzione italiana, essendo ben poca cosa rispetto al fabbisogno, rappresenta circa il 70% della soia prodotta in Europa.

La riduzione delle superfici investite a soia nella UE deriva essenzialmente dal fatto che gli aiuti comunitari si sono notevolmente negli ultimi anni

1.2. CARATTERI BOTANICI

La soia appartiene alla famiglia delle *Leguminosae*, sottofamiglia *Papilionoideae*, tribù *Phaseoleae*, genere *Glycine Willd.*, specie *Glycine max* (L.) Merr.. Le varietà coltivate appartengono alla specie *G. max* (L.) Merr. sembra sia derivata da una specie selvatica

(*Glycine soja*, Sieb. e Zucc.) presente in forma spontanea in Cina, Taiwan, Giappone, Corea, e Stati dell'ex Unione Sovietica. Esiste una terza specie *Glycine gracilis*, intermedia tra le due. Le tre specie presentano lo stesso numero cromosomico ($2n = 40$) e sono interfertili. Per molte altre, sempre appartenenti al genere *Glycine*, la classificazione è ancora incerta.

L'apparato radicale (Fig. 1) è costituito da una radice principale fittonante dalla quale si dipartono radici secondarie poste su più palchi lungo il profilo. Sulle radici secondarie si formano diverse ramificazioni. Dopo la germinazione si sviluppano le radici avventizie a circa 4-5 cm dall'apice radicale e continuano a formarsi mano a mano che la radice primaria si approfondisce. Le ramificazioni secondarie continuano a prodursi durante l'intera vita della radice.

Dopo una settimana dall'emergenza, sulle radici si iniziano a formare i noduli radicali, (Fig. 2) sito dell'azotofissazione operata dalla soia grazie ad una simbiosi con un rizobio specifico.



Figura 1 Apparati radicali di soia



Figura 2. Noduli radicali in soia

Il fusto si presenta eretto, ricco di peluria (bruna o argentea) e ramificato. Le ramificazioni iniziano fin dai primi centimetri dal terreno ed è maggiore con investimento rado (poche piante per m²). Raggiunge al massimo i 90-130 cm di altezza. Nella normale pratica di coltivazione è necessario che il fusto non ramifichi fin dalla base, poiché i baccelli delle ramificazioni non sono facilmente raccogliibili meccanicamente con conseguenti perdite di granella quantificabili in un 4-10%. Per ottenere questo risultato si seminano 40 piante/m² (usando 55-60 semi/m²) ad una profondità di 3 cm e con un'interfila di 45 cm.

L'apparato fogliare è composto di una coppia di foglie semplici (unifogliate) e trifogliate. Le prime, dette foglie primarie, appaiono da tre a dieci giorni dall'emergenza e sono inserite in modo opposto sul fusto. Le trifogliate sono composte ognuna di 3-4 foglioline, con lamine di forma diversa. Compaiono un po' più tardi delle precedenti e si alternano sui due lati del fusto mano a mano che cresce in altezza (Toniolo e Mosca, 1986).

I fiori (Fig. 3) sono di colore purpureo o bianco, piccoli, riuniti in racemi ascellari, contenenti da 2 a 35 fiori ciascuno, posti su corti peduncoli. La potenzialità fiorale è elevatissima, ma molti fiori abortiscono (dal 20 all'80%), così come numerosi baccelli. La fecondazione è autogama: il polline di solito è

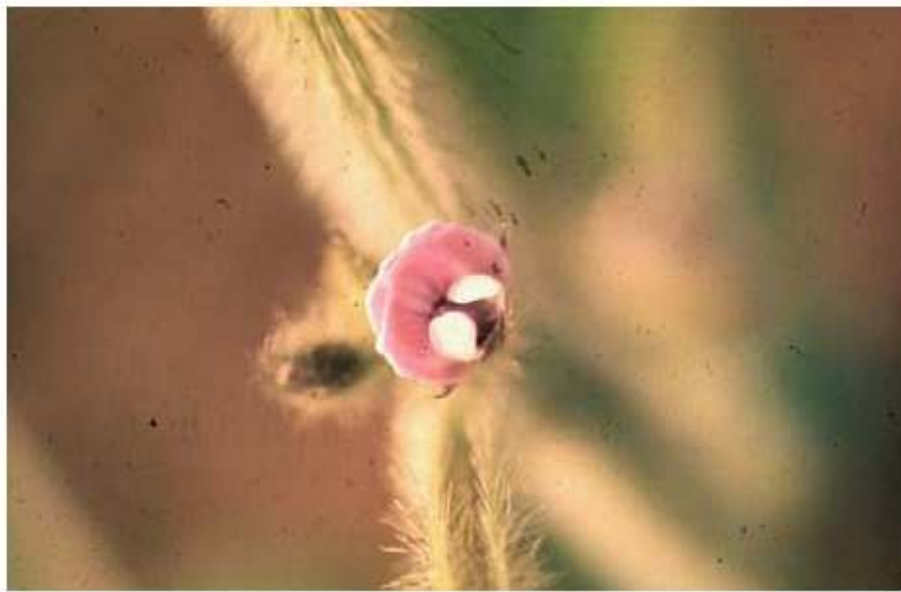


Figura 3: Particolare del fiore di soia

formato dagli stami prima che le altre parti del fiore siano completamente schiuse, il che lascia poche possibilità all'impollinazione incrociata spontanea. Ciononostante, si può riscontrare eterogamia nell'1% o anche meno dei casi. Il periodo di fioritura dipende dall'epoca di semina e dalla varietà: può durare da tre a più di cinque settimane.

I frutti sono chiamati legumi o baccelli (Fig. 4): sono leggermente curvi o dritti, pelosi e, a maturazione tendono ad aprirsi (deiscenza). Il loro colore varia dal giallo al grigio, al bruno e contengono da due a tre semi (anche uno solo) (Fig. 5). Il numero di baccelli per infiorescenza varia da 1 - 2 fino a 20, e la loro lunghezza oscilla da 2 a 7 cm, secondo la varietà.

Il seme, privo di endosperma, è formato da un tegumento seminale che ricopre un grande embrione provvisto di due cotiledoni. La forma è rotonda o ellittica.

Il colore del tegumento seminale può essere giallo paglierino o giallo-grigio, verde, bruno, nero o una combinazione di questi colori.

Il tegumento seminale è caratterizzato dalla presenza dell'ilo (zona di attacco del seme al baccello) che varia nella forma (da lineare a ovale) e nel colore.

La dimensione del seme è molto variabile: il peso di 1000 semi può infatti oscillare da 50 a 450 grammi.



Figura 4: Baccelli ascellari di soia.



Figura 5: Riempimento del baccello.

Il ciclo di sviluppo della soia si svolge in modo continuo iniziando con la germinazione e terminando con la maturazione completa del seme. Con la germinazione, dal seme si sviluppa una radice primaria fittonante che si accresce verticalmente nel terreno. La loro espansione è prima orizzontale per circa 40 cm, poi si approfondisce fino a più di un metro.

Contemporaneamente, durante i 5-10 giorni dalla semina, a seconda della temperatura del terreno e della profondità del seme, emergono i cotiledoni. Dalla loro emergenza il ciclo di sviluppo della pianta può essere suddiviso in diversi stadi vegetativi e riproduttivi, riportati nella tabella 1 secondo quanto proposto da Fher e Caviness (1977).

1.3. TIPI DI ACCRESCIMENTO

In soia il tipo di accrescimento può essere indeterminato, determinato o semi-determinato. Nei tipi indeterminati, la fioritura avviene dal basso verso l'alto, mano a mano che i fiori si differenziano lungo l'asse della pianta e non è presente un racemo terminale. La gemma apicale infatti continua l'attività vegetativa durante la maggior parte del ciclo. Nei tipi determinati invece i primi a schiudersi sono i fiori situati nella parte apicale e, dopo l'inizio della fioritura, l'assetto della pianta non subisce ulteriori modificazioni. Questi inoltre sono caratterizzati da un periodo di fioritura piuttosto breve che non permette di bilanciare eventuali periodi avversi con l'emissione di nuovi fiori. L'impiego di tipi determinati potrebbe tuttavia consentire di orientare sia lo svolgimento delle diverse fasi fenologiche nei periodi più favorevoli sia l'esecuzione di certi interventi agronomici (es. irrigazione) nel momento più opportuno (Mosca et al., 1984).

Nel tipo semi-determinato, nella stessa varietà sono presenti piante con infiorescenza terminale miste ad altre con fioritura continua e scalare, ad accrescimento indeterminato. La presenza contemporanea delle due forme porta a disformità nell'apparenza e nell'habitus di crescita del complesso (Toniolo e Mosca, L.C.).

1.4. SOSTANZE CON FUNZIONE NUTRACEUTICA

In soia alcuni composti a carattere "nobile" sono studiati per la loro funzione nutraceutica, ovvero per la proprietà che hanno se assunti regolarmente nella dieta di prevenire e/o rallentare e/o curare alcuni tipi di patologie.

I composti nutraceutici derivano dal metabolismo secondario della pianta (ad esempio isoflavoni) o dal metabolismo principale come le proteine.

In soia sono studiati anche altri composti che hanno un effetto negativo sul metabolismo: gli inibitori della tripsina: inibitori di Kunitz e Bowman Birk.

Tutte le sostanze ⌘ opraccitate sono presenti nel seme di soia (nell'embrione decotiledonato e nel cotiledone) nonché in tutti i prodotti di lavorazione della semente

Abbreviazione	Stadio vegetativo	Descrizione
VE	Emergenza	Cotiledoni visibili fuori dal terreno.
VC	Cotiledonare	Foglie unifogliate non ancora espanse con margini che non si toccano.
V1	Primo nodo	Completo sviluppo delle foglie unifogliate al nodo cotiledonare.
V2	Secondo nodo	Completo sviluppo della foglia trifogliata sul nodo superiore a quello della unifogliata.
V(n)	Ennesimo nodo	n. nodi del fusto principale con foglie trifogliate completamente sviluppate (partendo dal nodo delle unifogliate).
Abbreviazione	Stadio Riproduttivo	Descrizione
R1	Inizio fioritura	Presenza di un fiore aperto in almeno un nodo del fusto principale.
R2	Piena fioritura	Presenza di un fiore in almeno uno dei due nodi più alti (con foglia completamente formata) sul fusto principale.
R3	Inizio formazione baccelli	Presenza di baccelli lunghi 5 mm su almeno uno dei quattro nodi più alti sul fusto principale.
R4	Completa formazione baccelli	Presenza di baccelli lunghi 2 mm su almeno uno dei quattro nodi più alti sul fusto principale.
R5	Inizio formazione seme	Semi di 3 mm di lunghezza su almeno uno dei quattro nodi più alti sul fusto principale.

R6	Completa formazione seme	Semi ancora verdi che riempiono la loro cavità, su almeno uno dei quattro nodi più alti sul fusto principale.
R7	Inizio maturazione	Presenza di un baccello con colorazione tipica della maturazione sul fusto principale.
R8	Piena maturazione	95% dei baccelli hanno raggiunto la colorazione tipica della maturazione. Servono ancora 5-10 giorni di clima asciutto per raggiungere umidità inferiori al 15%.

Tabella 1: Descrizione degli stadi vegetativi e riproduttivi della soia.

1.4.1 GLI ISOFLAVONI

Gli isoflavoni sono composti fenolici appartenenti al gruppo dei flavonoidi, sono caratterizzati dalla migrazione del gruppo B dalla posizione 2, alla posizione 3.

I principali tipi di Isoflavoni:

le forme più semplici sono le agluconiche (Fig. 5) quali la genisteina, la gliciteina e la daidzeina.

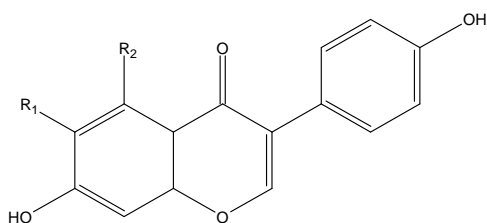
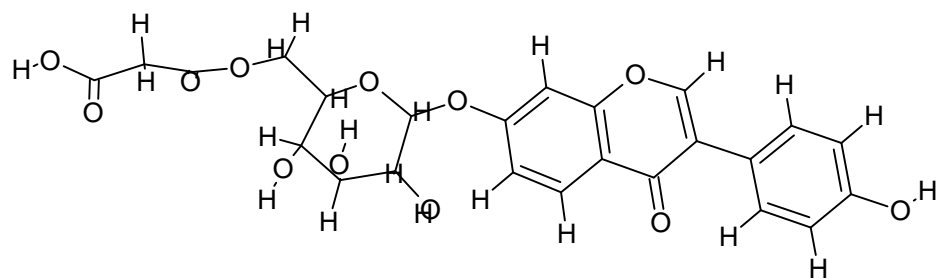


Figura 5. Isoflavone forma agluconica



Forma coniugata

Figura 6

Isoflavone	Gruppo R1	Gruppo R2	Gruppo R3
genisteina	H	OH	-
gliciteina	OCH ₃	H	-
daidzeina	H	H	-
genistina	H	OH	H
glicitina	OCH ₃	H	H
daidzina	H	H	H
malonil-genistina	H	OH	COCH ₂ COOH
malonil-glicitina	OCH ₃	H	COCH ₂ COOH
malonil-daidzina	H	H	COCH ₂ COOH
acetil-genistina	H	OH	COCH ₃
acetil-glicitina	OCH ₃	H	COCH ₃
acetil-daidzina	H	H	COCH ₃

Tabella 2. gruppi sostituenti degli isoflavoni

Gli isoflavoni sono composti presenti in diverse specie vegetali, le Leguminose, in particolare le Papilionacee sono maggiormente vocate alla concentrazione di queste molecole. Questi flavonoidi sono prodotti a partire da due vie di sintesi: la via dell'acido shichimico e quella dell'Acetilcoenzima-A.

Nel seme di soia sono presenti 12 forme di isoflavoni (tabella 1) suddivise in tre famiglie: quelli derivati della genisteina, quelli della gliciteina e della daidzeina.

Questi 3 tipi di isoflavoni esistono sotto 4 diverse forme: la prima, aglucone, o "forma semplice". Quelle coniugate sono rappresentate invece da: glucosidi, acetilglucosidi,

malonilglucosidi (tabella 2). Le forme acetiliche sono considerate come dei prodotti di denaturazione dovuti a trattamento termico.

1.4.2 LINEA BIOSINTETICA DEGLI ISOFLAVONI

Nella pianta la sintesi degli isoflavoni è possibile grazie all'esistenza di tre vie metaboliche fondamentali: (SCHIJLEN et al 2004)

1. la prima via biosintetica è la via dell'acido scichimico;
2. la via dei fenil-propani;
3. e la via dei flavonoidi.

La via dell'acido scichimico è comunemente denominata via degli amminoacidi aromatici, anche se non tutti vengono sintetizzati con questo processo. Tale via è assente negli animali che quindi devono assumere gli amminoacidi essenziali con la dieta. La via prende il nome da un composto che si origina dalla reazione chimica tra il fosfoenolpiruvato (PEP), intermedio della glicolisi e dell'eritrosio-4-fosfato (E4P), intermedio della fase luminosa della fotosintesi.

La via può essere suddivisa in due parti:

- 1) la via dell'acido scichimico vera e propria che partendo dall'E4P e da PEP porta all'acido corismico (Fig. 7).
- 2) la trasformazione dei tre amminoacidi fenilalanina, triptofano e tiroxina (Fig.8).

La figura 7 illustra i sette passaggi fondamentali di questa via biochimica (Maffei M.1999). La prima reazione riguarda la condensazione di una molecola dell'intermedio della glicolisi PEP con una molecola dell'intermedio del ciclo dei pentosofosfati E4P per formare il composto eterociclico DAHP; questo primo passaggio è catalizzato dalla DAHP sintasi che nelle piante è attivato dal manganese e dal triptofano, due ligandi in grado di stabilizzare la struttura dell'enzima.

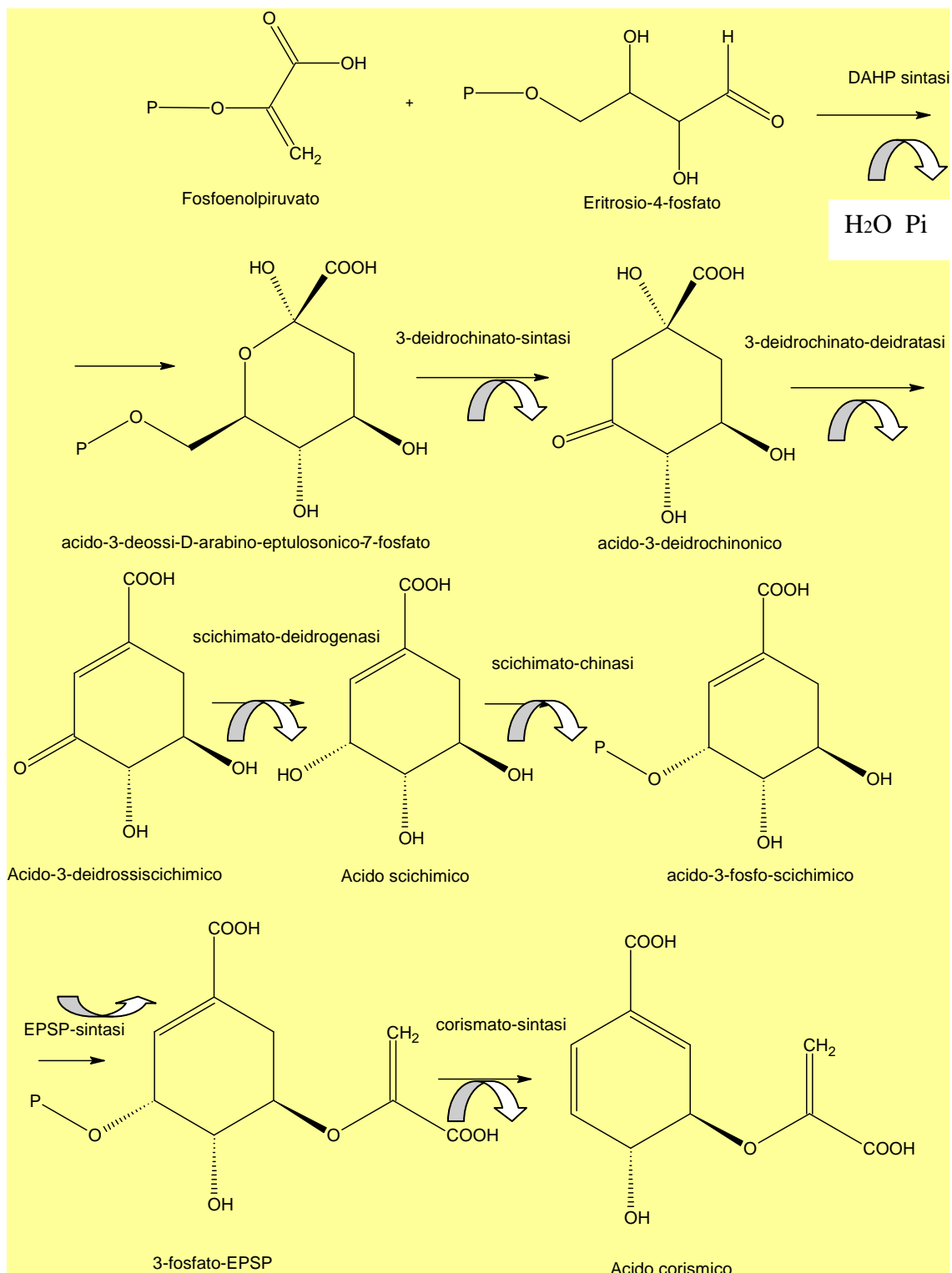


Figura 7. via dell'acido scichimico

Il secondo passaggio consiste nella trasformazione dell'eterociclo contenente ossigeno dal DAPH nel cicloesano variamente sostituito rappresentato dall'acido 3-deidrochinonico. Questa reazione è resa possibile dall'intervento della 3

deidrochinato sintasi un enzima per la cui attività sono richiesti NAD⁺ e un catione bivalente.

I seguenti passaggi riguardano l'aromatizzazione del cicloesano, requisito fondamentale per la costruzione della fenilalanina, della tiroxina e del triptofano. L'attività della 3 idrochinato deidratasi e della scichimato deidrogenasi (3° e 4° passaggio) sono svolte nelle piante superiori da uno stesso enzima. Il numero di turnover della deidratasi è circa 1/9 di quello deidrogenasi, così l'acido diidrochinonico viene facilmente convertito in acido scichimico senza l'accumulo di acido deidro-schichimico.

Il passaggio successivo riguarda la fosforilazione dell'acido scichimico, trasformato in scichimato 3- fosfato reazione operata dalla scichimato chinasi.

Il quinto enzima implicato in questa via metabolica è molto studiato ed è il principale bersaglio metabolico di alcuni erbicidi (Glyphosate), questo enzima causa la formazione reversibile del 5-enolpiruvilscichimato 3-fosfato sintasi e di fosfato organico.

L'ultimo passaggio nella via dell'acido scichimico riguarda la formazione dell'acido corismico tramite l'eliminazione del fosfato dall' EPSP operata dall'enzima corismato sintasi. (Maffei M. LC)

L'acido corismico è soggetto ad alcune trasformazioni che portano alla sintesi degli aminoacidi aromatici fenilalanina, tirosina e triptofano. Queste reazioni conducono all'aromatizzazione dell'anello cicloesadienico dell'acido corismico. Il termine "corismico" deriva dal greco e significa forca o biforcazione, in questo punto della via metabolica infatti si dipartono due vie: una che porta verso la sintesi di fenilalanina e tiroxina e l'altra che conduce alla sintesi di triptofano.

L'enzima che agisce sull'acido corismico è la corismato mutasi che trasforma l'acido corismico in acido pterfenico. L'acido pterfenico viene quindi transaminato dalla pterfenato aminotransferasi per formare acido arogenico. A questo punto non si è ancora formato l'anello aromatico della fenilalanina e occorre una decarbossilazione e la perdita di una molecola d'acqua operata dalla alogenato deidratasi per formare la molecola di fenilalanina (Fig. 8).

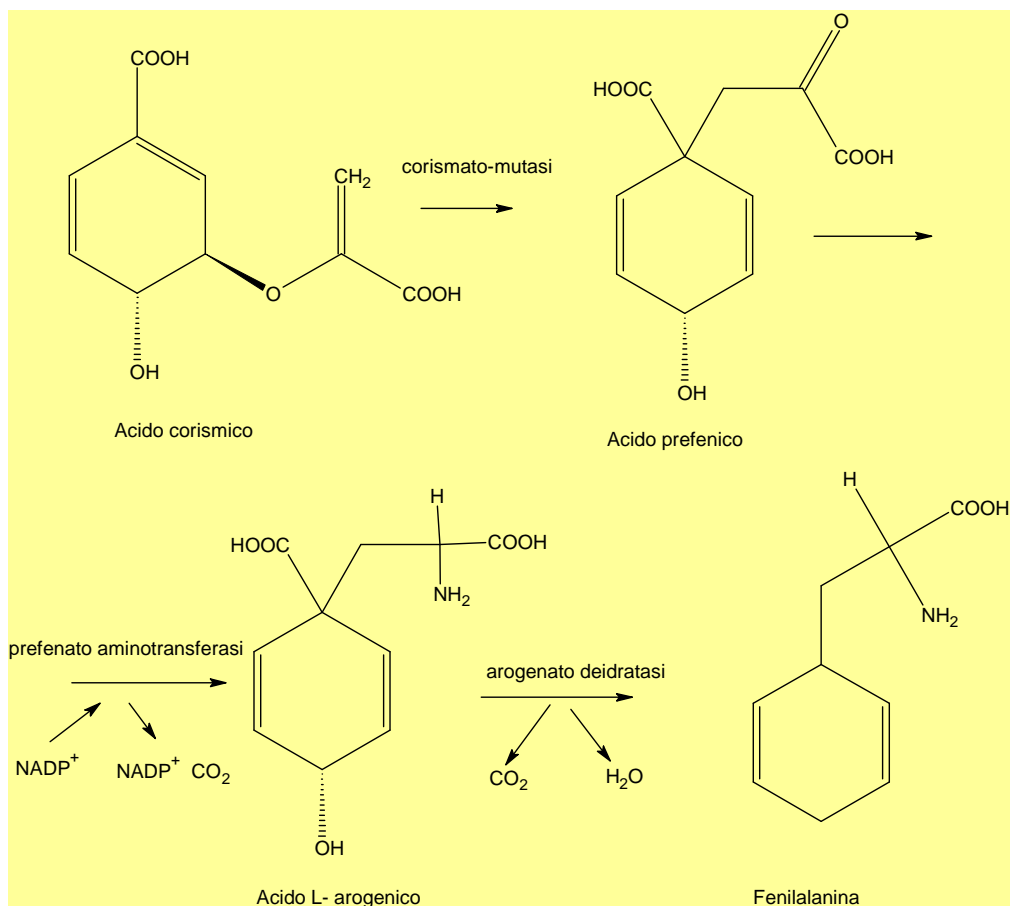


Figura 8. sintesi della fenil alanina

La via dei fenil-propani e dei flavonoidi

I fenil-propani sono prodotti dalla deaminazione degli aminoacidi fenilalanina e tiroxina.

Questi composti entrano in processi metabolici costitutivi per la sintesi di strutture di base come la lignina o per impartire ai fiori, ai frutti e alle foglie particolari colorazioni. Un ruolo importante di queste molecole è svolto anche nei meccanismi di difesa in risposta agli attacchi di patogeni e in seguito a stress. La figura 9 illustra la via metabolica degli isoflavoni, dal precursore fenilalanina fino alla genisteina. Per ottenere un fenilpropano a partire da una molecola di fenilalanina occorre che avvenga una condensazione tra una molecola di fenilalanina e 4 molecole di coenzima-A (1 molecola di cumariol coenzima-A e 3 molecole di malonil coenzima-A). Perché tale processo sia possibile è necessario che dapprima avvenga

una reazione di deaminazione, catalizzata dalla fenilalanina ammino liasi (PAL) a carico della fenilalanina.

Successivamente il cumarato coenzima-A in presenza di acido cinnamico permette la condensazione di una molecola di cumariol coenzima-A alla catena alifatica della fenilalanina. In seguito la calcione sintasi permette la formazione di una catena di 6 atomi di carbonio a ridosso della molecola di fenilalanina (fenilalanina esano) e sempre la calcione-sintasi è in grado di provvedere alla ciclizzazione della catena alifatica di nuova formazione. Si forma così un primo tipo di difenilpropano che viene subito modificato dalla calcione isomerasi che permette la deidrogenazione dell'ossidrilico in posizione 9 e la reazione dell'ossigeno con il carbonio in posizione 2. Si forma così l'eterociclo aromatico naringenina. La naringenina è un fenilpropano più stabile del suo intermedio putativo, tale molecola è il primo precursore della via metabolica degli antociani. La flavanone 3 idrolasi, primo enzima della linea biosintetica per gli antociani, è dunque in competizione con l'isoflavone sintasi per questo tipo di composto.

Successivamente inizia la via dei flavonoidi, l'enzima isoflavone sintasi (IFS) catalizza il trasferimento del gruppo fenile derivante dall'aminoacido fenilalanina dalla posizione 2 alla posizione 3, si forma così l'isoflavone genisteina. Tale aminoacido è in equilibrio con le sue forme glucosidiche e maloniliche infatti l'isoflavone 7-O glucosio transferasi (IGT) e l'isoflavone malonil transferasi (IMT) permettono rispettivamente la condensazione di una molecola di zucchero e di un gruppo malonile alla molecola di genisteina. (Fig. 6) Contemporaneamente l'isoflavone malonil glucosidasi esterasi (IEST) e l'isoflavone glucoside glucosidasi (IGLC) catalizzano la rimozione del malonile e del glucosio dall'isoflavone originando nuovamente la genisteina. La formazione della daidzeina e della gliciteina, con i loro composti derivati, ha un percorso simile a quello della genisteina con la differenza che per la daidzeina, la calcione reductasi interviene sul fenilpropano di prima formazione e catalizza la rimozione dell'ossidrilico in posizione 5. Si forma così l'isoliquiritigenina, mentre in seguito si formeranno la liquiritigenina e la daidzeina.

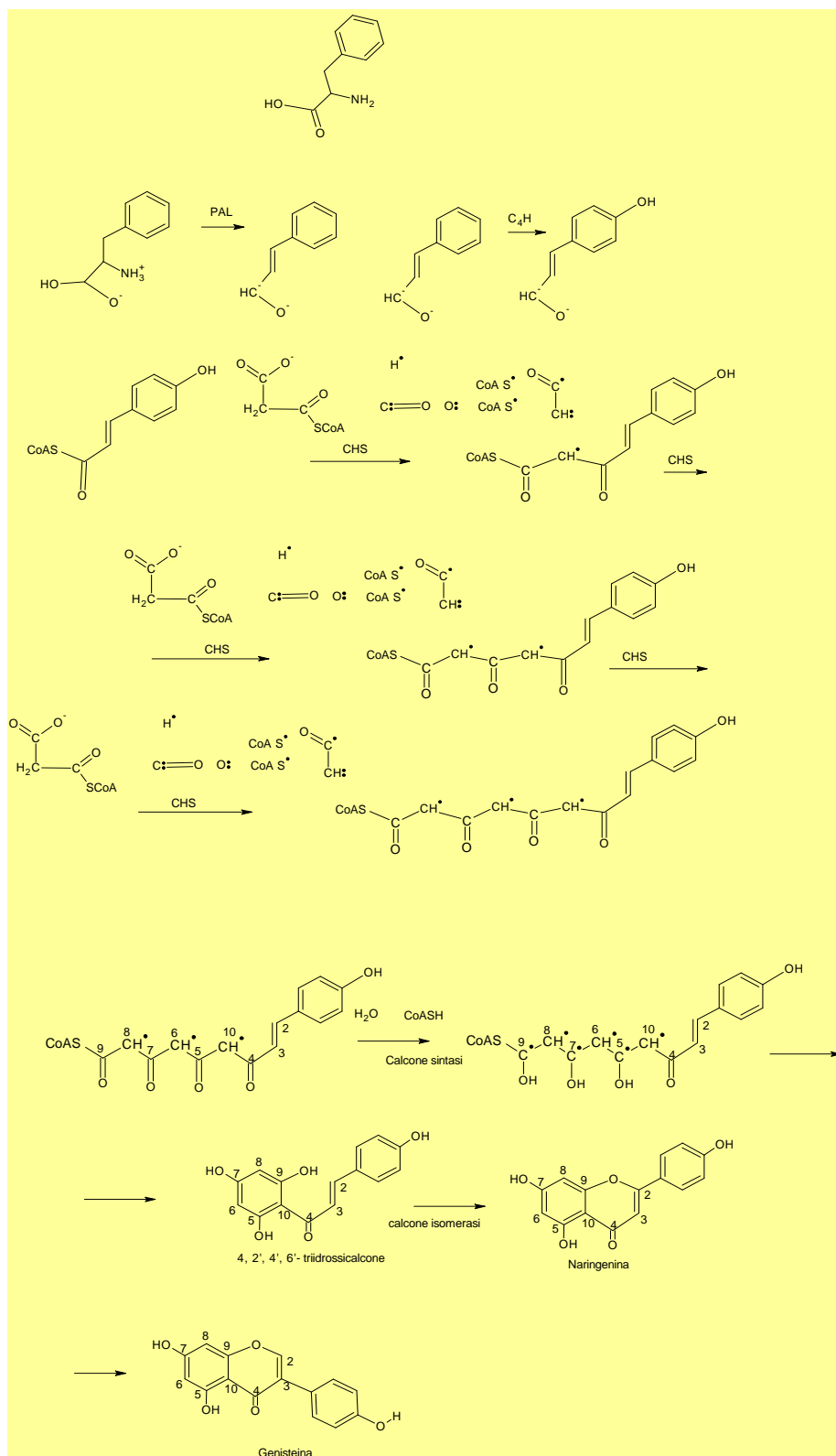


Figura 9. la via dei fenil propani che porta al 4-2'-4'-6'-triidrossi calcone e la via dei flavonoidi dalla naringenina alla genisteina

Per la gliciteina invece, oltre all'azione della calcione-reduttasi, interviene molto probabilmente una 6-O- metiltransferasi che catalizza il trasferimento di un gruppo acetile in posizione 6 prima che avvengano le reazioni a carico della calcione-isomerasi e dell'isoflavone sintasi.

Ruolo fisiologico degli isoflavoni

La pianta secerne dei composti che le permettono di interagire con la microflora del suolo, si tratta di alcuni tipi di essudati che sono riconosciuti dal batterio e inducono in esso un cambio di comportamento.

I flavonoidi prodotti dalle radici sono un indicatore dell'espressione dei geni batterici necessari alla nodulazione (Broughton e al 2003). La genisteina e la daidzeina tra questi sono un indicatore dell'espressione dei geni "nod" del *Bradyrhizobium japonicum* (Kosslak et al 1987). I geni *nod*, *nol*, *noe* sono organizzati in operoni e la loro espressione è regolata da geni regolatori della famiglia "nodD". I geni *nod* sono responsabili della sintesi degli enzimi necessari alla produzione dei "fattori nod", tetra e penta-saccaridi residui di

N-Acetyl glucosamina (Lerouge et al. 1990) che sembrano essere all'origine della differenziazione cellulare che conduce alla formazione dei noduli (Fisher e Long, 1993; Perret et al., 2000; Irving et al., 2000, Cullimore et al., 2001; Miklashevichs et al., 2001). Tali composti sono inoltre in grado di interagire con gli enzimi della via biosintetica degli isoflavoni, fungono cioè da sostanze elicitorie. Genisteina e daidzeina nella radice sono altresì associate all'espressione dei fattori *nod*. È stato dimostrato che la presenza di questi isoflavoni, in particolar modo della genisteina, è associata ad una nodulazione e a un tasso di fissazione dell'azoto atmosferico cospicue (Zhang and Smith, 1996; 1997).

La concentrazione in isoflavoni negli estratti radicali può dunque essere un indicatore del potenziale di nodulazione e di fissazione di una varietà e dunque indirettamente del suo metabolismo azotato.

Isoflavoni e difesa dai microrganismi

Gli isoflavoni giocano un ruolo nella difesa della pianta dagli attacchi dei patogeni, gli isoflavoni sono infatti delle fitoalessine che contribuiscono a limitare l'estensione delle infezioni batteriche e fungine nelle piante. Le fitoalessine sono generalmente presenti in concentrazione molto debole o assenti ma sono rapidamente sintetizzate nel caso di un attacco batterico o fungino (Graham e Graham 1991). La genisteina e una molecola derivata dalla daidzeina cioè la glicecollina intervengono nella lotta contro le infezioni (Park et al., 2002).

Isoflavoni e stress ambientali

Gli isoflavoni sono composti importanti anche nella difesa dagli stress abiotici come l'esposizione ai raggi ultravioletti. Nelle piante esposte a raggi UV il tenore in isoflavoni aumenta suggerendo che sono sostanze in grado di offrire protezione contro le radiazioni nocive di tipo UV-B (proprietà antiradicaliche e inibizioni di enzimi) (Caldwell et al 1983).

1.4.3 Proprietà nutraceutiche degli isoflavoni di soia

Due tipi di approccio hanno contribuito allo sviluppo delle ricerche riguardanti gli isoflavoni di soia e la loro relazione con l'impiego nutraceutico.(Kim H. et al 1998)

Il primo approccio è di ordine epidemiologico. In effetti la frequenza delle malattie a larga diffusione come le malattie cardiovascolari o l'osteoporosi, è meno elevata in Asia che in occidente e questo è noto esser legato ad una importante differenza nel

regime alimentare. Un secondo approccio è relativo agli studi sui meccanismi regolatori della cancerogenesi, sottolineano l'importanza dei composti di origine alimentare implicati nella regolazione della crescita cellulare (come gli isoflavoni di soia). Numerosi studi mostrano che la soia (consumata regolarmente dalle popolazioni asiatiche) e in particolare gli isoflavoni presentano diverse attività farmacologiche. (a titolo di esempio le dosi ingerite quotidianamente dagli individui sono state stimate da 50 a 100 mg).

Queste bioattività potrebbero essere implicate nel meccanismo di prevenzione delle malattie cardiovascolari, di alcuni tipi di cancro e dei problemi legati alla menopausa.

Le attività biologiche degli isoflavoni nell'organismo dipendono naturalmente dalla loro biodisponibilità. D'altra parte la bioattività degli isoflavoni consumati, potrebbe presentare in certi casi degli effetti indesiderati.

1.4.4 Malattie cardiovascolari e isoflavoni di soia

Sembra che gli isoflavoni presenti negli estratti proteici possano ridurre il tasso di colesterolo. Gli isoflavoni sono strutture analoghe all'estradiolo (ormone estrogeno endogeno). L'estradiolo presenta delle proprietà di tipo ipocolesterolemico. (Carroll 1995) (Potter SM. 1995-1996). In effetti questo ormone è coinvolto nel metabolismo delle apoproteine (costituenti proteici dell'LDL). Sembra dunque che due tipi di composti possano spiegare, una largo effetto ipocolesterolemico dei prodotti a base di soia contenenti proteine e isoflavoni. (la daidzina e la genisteina e i loro metaboliti).

Sembra che la riduzione della colesterolemia (Beaglehole R. 1990). non sia che uno dei principali meccanismi di protezione degli isoflavoni nei confronti di malattie cardiovascolari e dell'arteriosclerosi.

L'ossidazione di particolari LDL è considerata come una tappa fondamentale ed indispensabile della formazione del glomerulo di colesterolo. Degli antiossidanti

naturalmente presenti nel seme di soia, come gli isoflavoni, potrebbero prevenire l'ossidazione di particelle LDL. Inoltre la genisteina inibisce la tiroxina chinasi intracellulare. La tiroxina-chinasi sembra implicata nella promozione e nella progressione dell'arteriosclerosi tramite la proliferazione di cellule muscolari lisce e lo sviluppo di placche. Infine l'arteriosclerosi può essere associata a una diminuzione della dilatazione arteriosa (principale causa di infarto al miocardio) negli uomini e nelle donne in menopausa (Gilugam D.L. et 1997). Si è visto che come gli estrogeni di origine animale, gli isoflavoni accrescono l'elasticità delle arterie con arteriosclerosi nelle femmine di scimmia priva di ovaie.(Honoré K. Et al. 1997)

Certi studi fatti su pazienti con una colesterolemia "media" mettono comunque in evidenza un effetto non significativo di una integrazione alimentare a base di isoflavoni . È doveroso sottolineare che studi clinici prolungati nel tempo non sono ancora stati completati. (Chen L.et al. 2005) (Whang H.. e Murphy P.A. 1994)

1.4.5 Osteoporosi e isoflavoni di soia

Nel corso della menopausa, la diminuzione del tenore in estrogeni circolanti nel sangue, accelera la perdita di tessuto osseo.(Cooper C. e al 1992) La frequenza dell'osteoporosi, è differente a seconda delle diverse regioni del globo (più debole in Asia che in occidente). Un'alimentazione ricca in fitoestrogeni potrebbe spiegare questa differenza. Uno studio ha mostrato che un regime alimentare contenente delle proteine di soia con una forte quantità di isoflavoni (2,5 mg/g) aumentava la densità e il contenuto in minerale osseo delle donne in menopausa ma solamente a livello della colonna vertebrale. Questo risultato mette in evidenza che l'effetto dei fitoestrogeni di soia è dose dipendente e sito osseo specifico.(Anderson J.J.B. e Garner S.C 1997) e Un altro studio mostra che gli isoflavoni di soia stimolano la formazione ossea e che un consumo

regolare, su lunga durata, è necessario per aumentare progressivamente la massa ossea. (Armandi B.H. et al 1998)

Le vampate di calore, (ugualmente legate alla diminuzione del tasso di estrogeni circolante), rappresentano uno dei fastidi solitamente più riscontrati nelle donne in menopausa. La frequenza di questi sintomi varia da 70% - 80% per le donne europee (Knight DC, Eden J.A. 1996) al 18 e 14% per le donne di Cina e Singapore (Boulet M, et al 1994) Il regime alimentare ricco in fitoestrogeni, potrebbe almeno in parte spiegare questa differenza. Gli studi effettuati, portano a risultati contraddittori e la relazione tra isoflavoni e vampate di calore non è stata ancora chiarita.(Singham S.A. et al 1998)

1.4.6 Cancro e isoflavoni di soia

Come per l'osteoporosi o le malattie cardiovascolari, la frequenza dei tumori ormonodipendenti (della prostata e del seno più particolarmente) è più bassa in Asia che in occidente.(Severson RK et Al. 1989) (Lee HP et Al. 1991) La differenza di regime alimentare potrebbe anche in questo caso spiegare in parte questi dati epidemiologici. In questo contesto, è stato mostrato che gli isoflavoni contenuti negli alimenti a base di soia presentavano delle proprietà particolarmente interessanti, nella prevenzione di alcuni tipi di cancro.

Nelle donne in menopausa per esempio, gli isoflavoni, in qualità di fitoestrogeni potrebbero prevenire la comparsa e lo sviluppo di tali tumori grazie alle loro proprietà antagoniste di quelle degli estrogeni endogeni.(Setchell KDR 1984) (Molteni et al 1995) Gli estrogeni endogeni stimolano lo sviluppo cellulare. Questa attività è stata individuata come responsabile della comparsa del cancro al seno.(Breckwoldt M, et al 1995)

Inoltre è stato mostrato che gli isoflavoni aumentano la durata del ciclo mestruale e in particolare della fase follicolare.(Cassidy A et Al 1994) Dato che il tasso mitotico è quattro volte più elevato durante la fase luteinica rispetto alla fase

follicolare, gli isoflavoni possono partecipare alla riduzione della proliferazione cellulare nel caso di tumori ormono-dipendenti della donna.

Esistono tuttavia altri meccanismi d'azione degli isoflavoni di soia aventi effetto potenzialmente preventivo relativamente allo sviluppo del cancro (Messina M. et Barnes S., 1991). Oltre alla loro attività estrogenica, gli isoflavoni presentano delle proprietà antiossidanti. (Bowen R. e Barnes S., 1995) Queste proprietà possono garantire una protezione dagli stress ossidativi cronici responsabili della cancerogenesi, come il tabagismo o la qualità e la quantità del regime alimentare. Infine certi isoflavoni presentano un effetto inibitore degli enzimi implicati nella proliferazione cellulare. Gli isoflavoni agirebbero così in modo diretto (inibizione di enzimi implicati nel ciclo cellulare) o indiretto (azione antiestrogenica, antiossidante.) sulla proliferazione cellulare nel corso della cancerogenesi

Tuttavia, per le donne in menopausa colpite da cancro al seno nelle fasi iniziali, non sarebbe indicato un consumo troppo elevato di isoflavoni. In effetti gli isoflavoni agendo come sostanze *estrogenosimili*, in una fase iniziale possono accentuare lo sviluppo delle cellule cancerose. (Rckard S.E., Thompson L.U., 1997) In generale, nonostante i meccanismi d'azione potenziali degli isoflavoni nei confronti delle malattie cardiovascolari, di alcuni tipi di cancro e dell'osteoporosi siano stati messi in evidenza, sono necessari ancora ampi studi supplementari (negli animali, e clinici) al fine di determinare l'attività reale degli isoflavoni nell'organismo umano. D'altra parte per quanto riguarda le loro proprietà (estrogeniche in particolare), una alimentazione ricca in isoflavoni può anche essere sospettata di provocare effetti secondari negativi.

1.4.7 Assorbimento e metabolismo degli Isoflavoni

Tenuto conto della bioattività degli isoflavoni, la determinazione della loro biodisponibilità sembra indispensabile. Sfortunatamente, il metabolismo degli isoflavoni non è ancora totalmente conosciuto.

Si considera tuttavia che dopo l'ingestione, gli isoflavoni coniugati siano idrolizzati da alcuni enzimi della flora intestinale in condizioni di pH acido determinato dallo stomaco.

Gli isoflavoni sono assorbiti a livello dell'intestino crasso, e probabilmente a livello del colon sotto forma non coniugata. La degradazione degli isoflavoni da parte dei batteri intestinali, genera diversi metabolici (Aldercrutz H et Al 1991) la 6^l-idrossi-O-dimetilangolesina (O-DMA) è derivata direttamente dalla genisteina, esistono inoltre due vie metaboliche per la daidzeina che producono sempre la 6^l-idrossi-O-dimetilangolesina. Questi metaboliti sono rintracciabili nella bile o nell'urina. Dopo una escrezione nella bile gli Isoflavoni possono essere idrolizzati ancora una volta nel tratto intestinale, metabolizzati e riassorbiti grazie alla circolazione enteroepatica.(Griffits L.A.- Barrows A) Il tasso di assorbimento è differente a seconda del tipo di isoflavone considerato. In effetti la daidzeina sembra più disponibile che non la genisteina. (Whang HJ et al 1992) Le forme coniugate della daidzeina sono anch'esse maggiormente biodisponibili che non quelle della genisteina. (King R.A. 1998) Questi risultati suggeriscono che le differenze di struttura tra la daidzeina e la genisteina possono influire significativamente sulla loro biodisponibilità. Inoltre a causa del carattere idrofilo più marcato (Brown P. 1998) e del loro peso molecolare più importante, gli isoflavoni coniugati sono meno biodisponibili che gli agluconi. Benché, in linea generale l'assorbimento e l'escrezione degli isoflavoni nell'uomo sia funzione della quantità ingerita, (Harris e al, 1995) esistono delle differenze a livello di produzione dei diversi metaboliti, derivati dagli isoflavoni ingeriti. Certi individui (circa 70% degli individui di una data popolazione) sono incapaci di metabolizzare e di eliminare equolo a partire dalla daidzeina.(Kelly GE et al, 1993) Questa differenza tra individui può rivelarsi importante poiché la produzione di equolo a partire dagli isoflavoni assorbiti è responsabile di gran parte degli effetti biologici legati al consumo di isoflavoni. In effetti l'attività estrogenica dell'equolo è largamente superiore a quella della daidzeina o di quella dell' O-DMA.(

Delle differenze nella capacità di metabolizzare gli isoflavoni secondo il sesso dei consumatori sono ugualmente stati osservati. (Lu LJW, Anderson KE 1998)

Le differenze tra isoflavoni che riguardano, la loro biodisponibilità e il loro metabolismo, non permettono momentaneamente, una determinazione razionale della quantità ottimale di isoflavoni da ingerire. Tuttavia, la conoscenza del tenore della composizione in isoflavoni nei prodotti a base di soia è condizione indispensabile perché vengano stabilite raccomandazioni specifiche.

1.4.8 Tenore e composizione in isoflavoni nel seme di soia.

Numerosi studi hanno messo in evidenza l'importanza del fattore "genotipico" per il tenore in isoflavoni. Così per esempio (Eldridge e Kwolek e Tsukamoto et al. hanno rilevato un tenore in isoflavoni da 1,16 a 3 mg/g e da 0,79 a 3,5 mg/g a seconda delle varietà. Inoltre sembra che il range di variazione sia funzione dell'origine dei diversi genotipi. In effetti lo studio su 8 varietà americane, e su tre varietà giapponesi, rivela che il livello di isoflavoni totale varia da 2,05 a 4,02 mg/g per le varietà americane e da 1,26 a 2,34 mg/g per le varietà giapponesi. (Whang H.J. e Murphy P.A 1994) Date le condizioni colturali, esiste dunque una forte variabilità nel tenore in isoflavoni. Questa variabilità sembra legarsi a certe caratteristiche intrinseche della pianta come ad esempio la precocità. Sembra che le varietà precoci abbiano un tenore in isoflavoni meno elevato rispetto alle varietà tardive (Kitamura et al, 1992). Il tenore in isoflavoni caratteristico di una varietà può essere legato anche alla sua capacità di resistenza nei confronti di patogeni e parassiti. Così la forte resistenza ai patogeni di certe specie potrebbe essere dovuta al forte contenuto in daidzina e genisteina. (isoflavoni maggiormente bioattivi).

Il potenziale genotipico inoltre è influenzato in modo marcato da fattori ambientali (Interazione Genotipo/ambiente). La biosintesi degli Isoflavoni, e in linea generale la biosintesi dei composti flavonoidi sono sotto l'influenza delle condizioni del mezzo di coltivazione. Variazioni nel tenore in isoflavoni per una stessa varietà,

sono state osservate a seconda dell'annata di coltivazione o delle condizioni della coltura.(Aussenac T. e al 1998). Eldridge et Kwolek osservano una variazione del tenore da 0,46 a 1,95 mg/g per una stessa varietà e per i differenti luoghi di coltura. Tra i parametri ambientali influenzanti il tenore in isoflavoni, la temperatura durante la fase di sviluppo sembra essere il principale. Temperature elevate tenderebbero a ridurre il tenore in isoflavonoidi nel cotiledone.(Aussenac T. et al 1999)

La temperatura durante la crescita della pianta influenza la durata del suo ciclo fisiologico. Un legame significativo tra il tenore in isoflavoni del seme a maturità e la durata dello sviluppo sembra sia stato messo in evidenza

Da prove sperimentali condotte in Francia è stato messo in evidenza che si possono avere variazioni nelle concentrazioni di isoflavoni dell'ordine del 50-60% a parità di caratterizzazione genotipica in funzione delle differenti condizioni ambientali. Particolarmente importanti sembrano essere: la gestione della temperatura nella fase di germinazione e nella prima fase di sviluppo della pianta, la disponibilità idrica nell'ultima fase del ciclo (uno stress idrico nell'ultima fase del periodo di riempimento del seme comporta un abbassamento del tenore in isoflavoni), la presenza di stress relativi a danneggiamento dei tessuti dovuti ad esempio a stress biotici e/o di tipo meccanico.

La risposta difensiva della pianta a stress di tipo meccanico che di solito si osserva, comporta la deposizione di sostanze fenoliche nella parete cellulare delle cellule danneggiate, questo meccanismo può avvenire solamente grazie all'attivazione dei geni che controllano la via biosintetica dei fenil-propani. La deaminazione della fenilalanina che conduce alla sintesi della parte agluconica degli isoflavoni fa parte della linea biosintetica dei fenil-propani. (Maffei M. 1999).

1.5 ASSIMILAZIONE DELL'AZOTO

Parte dell'azoto contenuto nella pianta deriva da azoto presente nel terreno, assorbito dalle radici sotto forma di ione nitrato senza dispendio di energia o sotto forma di ione ammonio con utilizzo di molecole di ATP. L'enzima responsabile della riduzione dello ione nitrico a ione ammonio è la nitrato reduttasi presente nel citoplasma della cellula radicale. Lo ione ammonio entra in seguito nel ciclo dell'acido glutammico che produce nelle radici asparagina (Fig. 13) elemento base fondamentale per la sintesi proteica. Nelle foglie l'ammonio trasportato attraverso il floema entra anch'esso nel ciclo dell'acido glutammico e viene inglobato nella molecola della glutammina (Fig. 14) un altro "mattoncino fondamentale" per la sintesi proteica nella pianta. (Fig. 11)

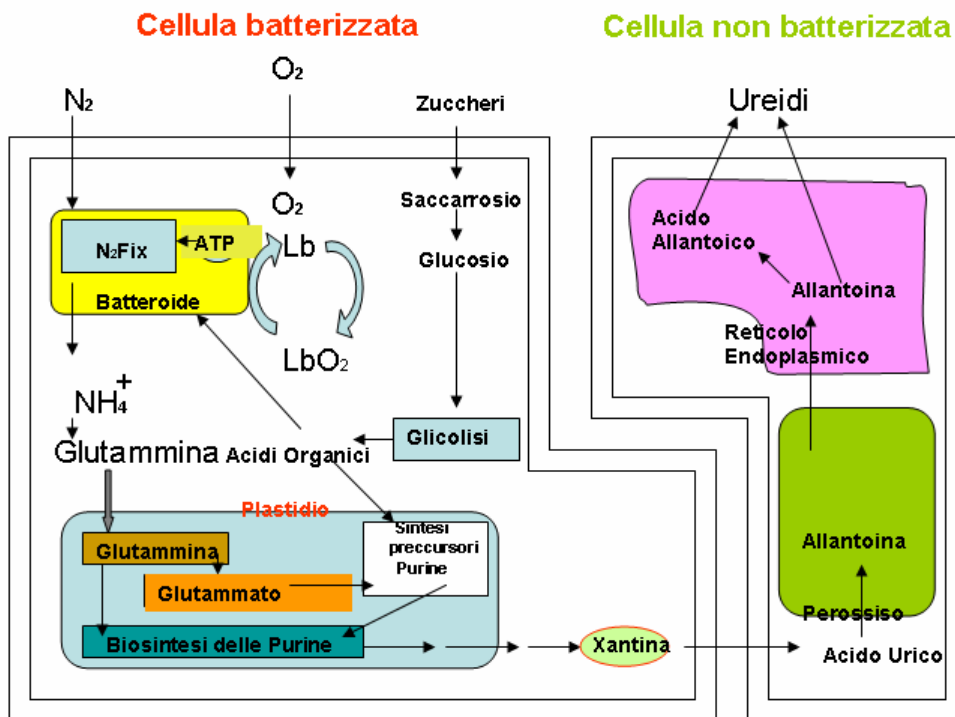


Figura 10. localizzazione dei principali processi biochimici della fissazione

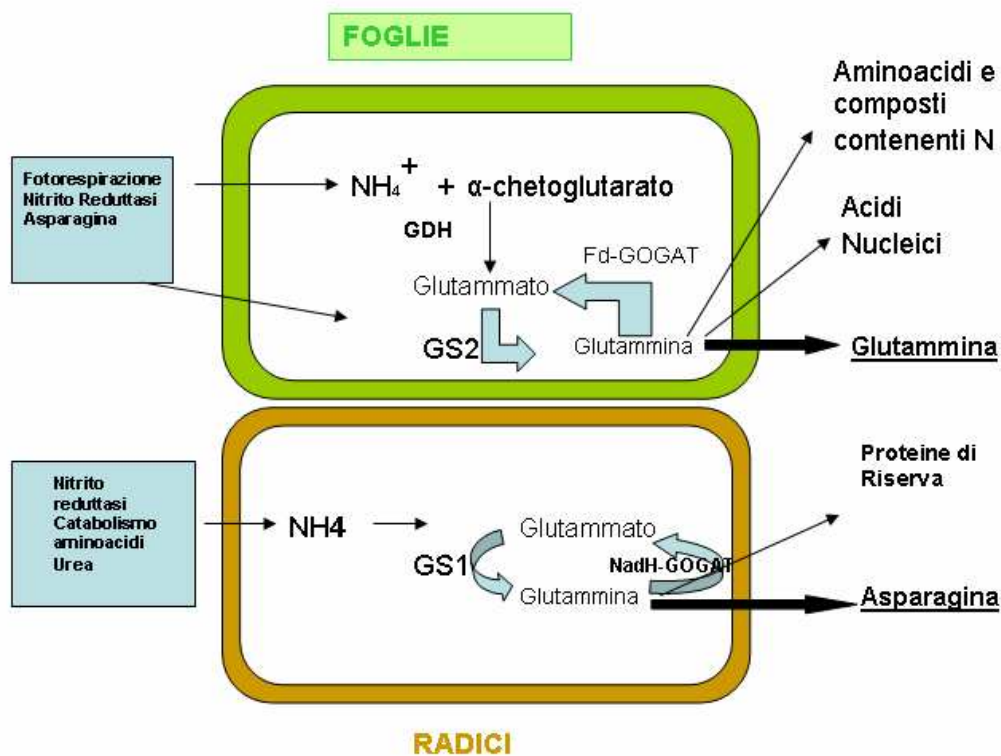


Figura 11. localizzazione dei processi biochimici di utilizzazione dell'ammonio

1.6. FISSAZIONE DELL'AZOTO ATMOSFERICO

Dalla letteratura internazionale (Mosca. G. 1984) si può stimare che nella coltura di soia sono complessivamente allocate circa 300 kg di azoto per ettaro. Fra queste circa 170 kg derivano da fissazione simbiotica e i rimanenti 130 derivano da assimilazione radicale dell'azoto. In un avvicendamento colturale che veda il frumento seguire a soia, si può stimare che sul cereale si scarichi un effetto residuale di circa 50 kg/ha di azoto. I residui colturali di soia apportano infatti circa 100 kg/ha che vengono ridotti nella loro entità in modo variabile da processi quali la denitrificazione e la percolazione profonda.

Il processo di fissazione (figura 10) svolge quindi un ruolo fondamentale che senza nessun costo per l'agricoltore permette di accumulare nella pianta composti "di natura nobile".

Il processo di fissazione avviene nella pianta di soia grazie all'azione del sistema enzimatico nitrogenasi.

Il sistema nitrogenasico comprende due tipi di enzimi, la nitrogenasi-reduttasi e la Fe-Mo-co-proteina. Entrambe queste molecole acquisiscono capacità riducente in seguito a determinate reazioni biochimiche: La nitrogenasi-reduttasi acquista capacità riducente in seguito all'acquisizione di elettroni derivanti dalla molecola di ferrodossina la Fe-Mo-co-proteina acquista capacità riducente grazie alla riduzione da parte della nitrogenasi reduttasi ed è in grado a sua volta di ridurre l'azoto atmosferico in ambiente sub-acido. Il risultato di questo biochimismo è la produzione di due molecole di ammoniaca che vengono immediatamente ridotte ad ammonio. La prima parte di questo processo avviene all'interno delle strutture batteroidi della cellula vegetale batterizzata la seconda parte (riduzione dell'ammoniaca) avviene nel citoplasma della cellula batterizzata. Il plastidio della cellula batterizzata ospita invece il ciclo dell'acido glutammico attraverso cui l'ammonio fissato è inglobato nella glutammina.(Figura 12) La glutammina entra nel ciclo di sintesi delle purine che porta dopo una lunga serie di reazioni alla sintesi della Xantina. Questa molecola è importante perché consente il passaggio dell'azoto fissato dal sistema "nodulo radicale" al "sistema pianta".

La xantina in seguito è convertita in acido urico nella cellula vegetale non batterizzata. L'acido urico è poi trasportato sul reticolo endoplasmico della cellula radicale in questo sito si ha la conversione in *ureidi*, molecole che fungono da trasportatori dell'azoto fissato attraverso il floema fino alle parti aeree della pianta.

La valutazione del livello di ureidi presenti nel fusto consente di stimare lo stato del processo di fissazione nella pianta.

1.6.1 Tecniche di misura dell'azoto fissato e assimilato.

E' interessante poter determinare l'importanza relativa delle due vie della nutrizione azotata della soia. Esistono numerosi metodi ma nessuno di questi è perfetto ed è ed è dunque necessaria la comparazione dei risultati ottenuti attraverso diverse tecniche.

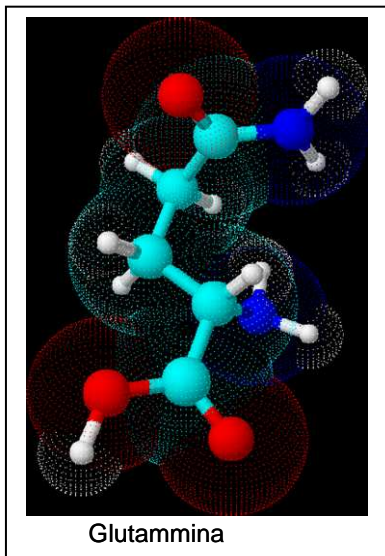


Figura 12. Glutammina

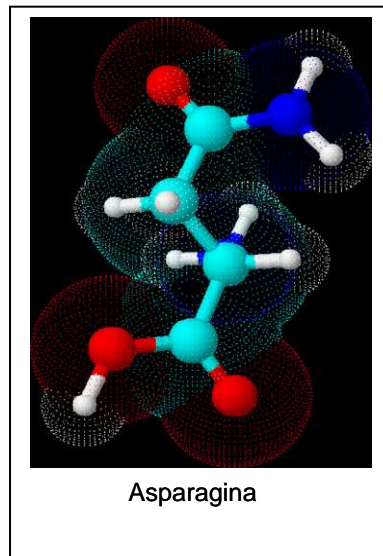


Figura 13. Asparagina

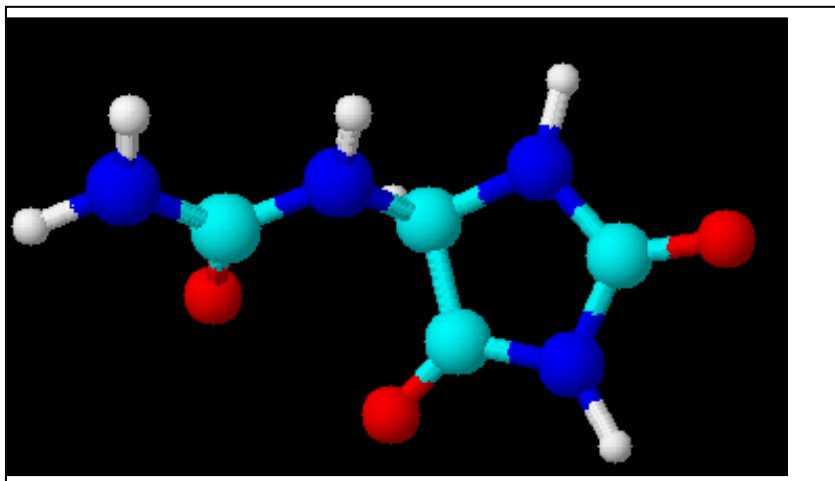


Figura 13b ureide allantoina

Si possono distinguere due gruppi di metodi: a) le misure cumulative ottenute per differenza; b) le misure istantanee delle attività enzimatiche.

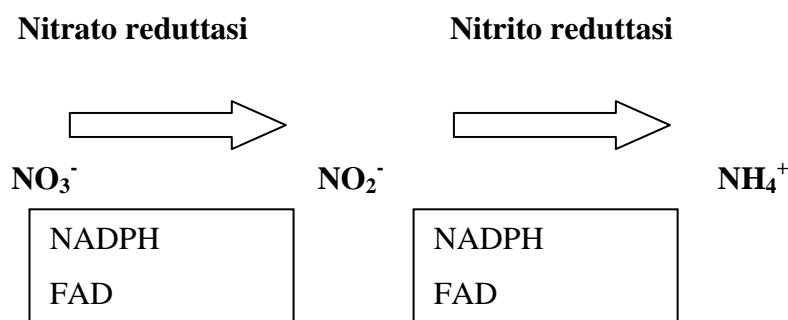
I metodi per differenza sono in generale utilizzati alla raccolta della coltura. Confrontando la quantità d'azoto contenuta in una coltura di soia nodulata e in una non nodulata (non inoculata coltivata in un terreno contenente dei *Rizobi* specifici, o geneticamente non nodulante), si può ottenere una stima della quantità dell'N fissato.

Questo metodo è tuttavia falsato dal fatto che una pianta non nodulata assorbe azoto dal terreno in modo differente dalla pianta nodulata.

Un altro metodo cumulativo consiste nell'utilizzare la marcatura dell'azoto assimilato attraverso l'isotopo naturale ^{15}N . Sono disponibili due tecniche che derivano dal medesimo principio, l'utilizzazione di un concime arricchito in ^{15}N oppure la misura dell'abbondanza isotopica naturale in N^{15} . La quantità di azoto fissato si ottiene per differenza tra azoto totale e azoto assimilato. E' la tecnica più precisa a condizione di disporre di una buona pianta fissatrice di riferimento, che assorba il concime marcato nello stesso momento e nella stessa quantità dal suolo della pianta nodulata; questo metodo cumulativo permette di determinare la quantità di azoto fissato dopo un lungo periodo di tempo cioè alla raccolta.

Esistono d'altra parte dei metodi istantanei che permettono di rivelare delle variazioni rapide di nutrizione azotata. Questi metodi si basano sulla misura dell'attività degli enzimi chiave, nitrato riduttasi per l'assimilazione dell'azoto e nitrogenasi per la fissazione o sulla misura di un prodotto specifico dell'assimilazione o della fissazione.

Il nitrato ridotto è misurato a partire dalla reazione.



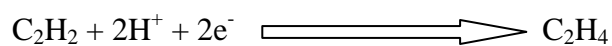
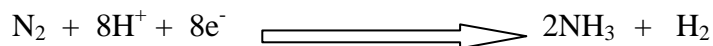
La prima di queste due reazioni costituisce la tappa limitante principale dell'assimilazione dell' NO_3^- , è dunque teoricamente possibile valutare l'attività reale di questo enzima dosando il nitrito prodotto durante un dato tempo da un vegetale o da un suo campione

La misura può essere effettuata attraverso la metodica *in vivo* (Scharff A.L. et al 2003) su frammenti di foglia o di radice, oppure attraverso il metodo *in vitro*, su tessuti essiccati o tramite il metodo *in situ* su foglia o anche piante intera.

Nel metodo *in vitro* le concentrazioni dei substrati NO_3^- e NADH sono saturanti, la quantità di nitrito formata è proporzionale alla quantità di proteina nitrato riduttasi presente nel tessuto vegetale. Si può anche stimare la capacità nitrato riduttasica su di un estratto enzimatico ottenuto dopo essiccazione dei tessuti.

Il metodo *in situ* ha per obiettivo la misura dell'attività reale della nitrato riduttasi. In questo caso, l'attività reale della nitrato riduttasi è ottenuta disponendo gli organi vegetali al buio e in assenza di ossigeno. Nelle foglie vi è una buona correlazione tra questa misura di attività nitrato riduttasica e la quantità di nitrato realmente ridotto, stimata utilizzando il $^{15}\text{NO}_3^-$. In queste condizioni la misura dell'attività dipende strettamente dalla disponibilità in substrati (NO_3^- e NADH) al sito attivo dell'enzima.

La fissazione dell'azoto può essere stimata attraverso la misura dell'attività nitrogenasica, grazie ad una proprietà originale di questo enzima: la sua capacità di ridurre non solamente l'azoto ad ammoniaca ma anche l'acetilene ad etilene.



Ora quest'ultimo gas, l'etilene, è molto facile a misurarsi con il metodo cromatografico in fase gassosa. La misura dell'attività riduttrice dell'acetilene (ARA test) può essere effettuata sui noduli asportati dalla pianta, sul sistema radicale rinserrato in un flacone o su pianta intera.

Quest'ultimo metodo è particolarmente interessante perché permette di lavorare in campo, disturbando al minimo la fisiologia della pianta. Un cilindro di plastica o di metallo viene interrato e contornato da numerose altre piante di soia. Un film di copertura della superficie del terreno è posto a chiusura del sistema, l'acetilene

è iniettato al di sotto di detto film attraverso un tubicino che permette anche il prelievo di campioni di etilene una volta che si sia formato.

Un altro metodo di misura della fissazione si basa sulla proprietà delle piante della Tribù *Phaseoleae*, tra cui la soia, di trasportare l'azoto fissato essenzialmente sotto forma di ureidi (allantoina, acido allantoico), questi composti restano per contro ad una concentrazione molto bassa nella linfa se la pianta assorbe il nitrato. (Van Berkum P et al 1985)

Vi è una buona correlazione tra attività fissatrice e tenore in ureidi (Herridge et al., 1982) .(David F. et al., 1990)

Nella linfa durante i primi 60-80 giorni dall'inizio del ciclo vegetativo della pianta. La misura può essere effettuata sulla linfa che sale di lungo il fusto di una pianta sezionata a livello del colletto o sulla linfa presente sulle parti aeree estraendola con una pompa da vuoto.

Il metodo istantaneo di riferimento, utilizzabile solamente in laboratorio, consiste nel collocare l'apparato radicale in una atmosfera arricchita di $^{15}\text{N}_2$ per un breve periodo di tempo.

I metodi cumulativi sono interessanti per conoscere il bilancio a fine coltura; i metodi istantanei sono utili invece per determinare l'influenza immediata di un trattamento sugli enzimi chiave della nutrizione azotata della soia. Inoltre vi è una buona correlazione tra le misure di fissazione ottenute mediante l' ^{15}N e i valori settimanali cumulati di riduzione dell'acetilene.

I metodi che sembrano più rispondenti alle esigenze del lavoro di ricerca in esame sono:

- 1) Il metodo di stima delle ureidi: questa procedura consente di stimare lo stato del processo di fissazione nella pianta. Nel lavoro di ricerca in esame tale rendicontazione sarà utilizzata per valutare l'effetto di diversi trattamenti agronomici nei genotipi identificati come più performanti relativamente al livello della proteina e alla produzione di sostanze del metabolismo secondario: Isoflavoni.

1.6.2 Proteine

Le proteine vegetali sono i composti in cui viene stoccato l'azoto inglobato nella pianta. In soia il contenuto proteico del seme oscilla tra il 35 e il 45%. La proteina si accumula nei vacuoli del parenchima cotiledonare ed è composta da due diverse subunità: le glicinine più leggere e povere in aminoacidi solforati e le conglucine più pesanti e normalmente meno abbondanti. Varietà diverse presentano nella proteina rapporti diversi, tra queste diverse subunità e il rapporto differente induce un differente tipo di utilizzo, ad esempio la prevalenza di subunità leggere rende la materia prima proteica più adatta ad ottenere derivati liquidi (in cui la proteina è in soluzione), la presenza di sub unità pesanti favorisce la gelificazione e quindi l'ottenimento di prodotti derivati di tipo solido. Anche il contenuto in aminoacidi essenziali può essere discriminante, ad esempio sul tipo di utilizzo nel settore mangimistico.

La caratterizzazione delle varietà secondo la qualità proteica è un aspetto che non viene considerato attualmente nei nostri mercati, dove la granella di soia come prodotto indifferenziato spunta prezzi di mercato molto bassi.

1.6.2.1 TENORE E COMPOSIZIONE IN PROTEINE NEL SEME DI SOIA.

Da un punto di vista fisiologico, il tenore in proteine del seme è condizionato dalla qualità del trasferimento dell'azoto fissato negli aminoacidi (ad es. Asparagina, Glutamina) e/o nelle ureidi (allantoina) verso le cellule cotiledonari del seme. Questo trasferimento coinvolge tre fenomeni,

- La rimobilizzazione dell'azoto dai fusti e dalle foglie sotto forma di composti organici.
- La fissazione dell'azoto derivante dalla simbiosi pianta-*bradyrhizobium* (può prolungarsi più o meno nel corso del ciclo riproduttivo).
- L'assorbimento tardivo dell'azoto nitrico dal suolo (la seconda via di nutrizione azotata della soia).

Le differenze nel tenore proteico osservate spesso tra le cultivar sono dovute a dei fattori di ordine puramente genotipico e all'interazione della pianta con il suo ambiente di coltura.

1.6.2.2 Effetto del regime idrico

In tema di rifornimento idrico, sembra che la natura degli apporti sia capitale, dato che una applicazione tardiva dell'irrigazione (con un regime che soddisfa il 70% dei fabbisogni totali) influisce positivamente sul tenore finale in proteine in tutti i tipi di suolo e per tutti i genotipi studiati. (Daydé J. 1994) e (Bouniol A. et al. 1994)

1.6.2 3 Effetto della temperatura

Il processo di traslocazione dell'azoto fissato in strutture organiche (aminoacidi e/o ureidi) nelle cellule ad attivo accumulo proteico del seme è dipendente anche dalla temperatura. L'accumulo di elevate temperature durante la fase di riempimento del seme, (in assenza di stress idrico) produce degli effetti significativamente positivi sulla sintesi di proteine e sul rendimento in proteina della granella.

La scelta varietale e quindi il peso dei fattori genotipici, è la più importante ai fini dell'ottenimento di elevate rese proteiche, anche se è di una certa rilevanza per questo scopo la realizzazione di protocolli colturali appropriati. È fondamentale che le varietà scelte siano ben adattate al luogo di coltivazione (precocità del genotipo e rispetto dei periodi di semina consigliati.). Molto importante è inoltre la gestione dell'irrigazione (apporti tardivi molto raccomandati). Queste pratiche sono chiaramente note, ma ancora scarsamente messe in pratica.

Il tenore in proteine del seme (Figura 14) è un elemento chiave per l'industria agroalimentare. Il tenore globale in proteine condiziona tutte le voci di trasformazione: valore del pannello dopo l'estrazione dell'olio, qualità del mangime ottenuto da cottura del seme intero (Tipo di estrusione), qualità dei prodotti di prima trasformazione destinati all'agroalimentare. Per questi ultimi

anche la qualità delle proteine è essenziale. Il livello di qualità del soyfood dipende dalle differenti proprietà della materia prima (granella) in funzione dei tipi di prodotti finali considerati. Nel caso del tonyu (latte di soia) e, in linea generale per tutte le bevande a base di soia, le qualità funzionali, come le proprietà di solubilizzazione delle proteine, sono le più importanti. Per quanto riguarda il tofu (formaggio di soia) e i suoi derivati molta attenzione deve essere prestata alla capacità di coagulazione delle proteine. In linea generale la composizione della frazione proteica condiziona le numerose proprietà funzionali del seme di soia. Di conseguenza la conoscenza delle differenti frazioni proteiche del seme risulta essere molto importante ai fini della valorizzazione di un determinato tipo di granella.

1.6.2.4 Frazioni proteiche del seme.

Dopo la dissoluzione con l'acqua e l'ultracentrifugazione, le proteine di soia possono essere separate in 4 frazioni caratteristiche, in funzione dei coefficienti di sedimentazione: 2S, 7S, 11S, 15S. (Cheftel JC e Laurient D. 1985)

Nel seme le frazioni 11S e 7S possono rappresentare dal 70 al 75% della totalità delle proteine. Le globuline costituiscono la maggior parte delle frazioni 7S e 11S.

Sono distinte in:

- frazione 7S: la β -conglycina (fino a 35% delle proteine del seme) che comprendono tre sottounità a carattere acido α , α_1 , e β ;
- frazione 11S: la glicinina è costituita di dodici sottounità, in maggioranza idrofobe, sei a carattere acido e sei a carattere basico.

La frazione 7S è particolarmente povera in aminoacidi solforati (i soli deficitari nelle proteine di soia), non contiene cisteina e la sua subunità β non contiene neanche metionina.

La frazione 11S è invece ricca in zolfo (3-4 volte il contenuto in aminoacidi solforati, rispetto alla frazione 7S).

L'ottimizzazione del rapporto tra proteine 7S e 11S è un parametro che discrimina il tipo di utilizzo che avrà la granella di soia. (tonyu, tofu).

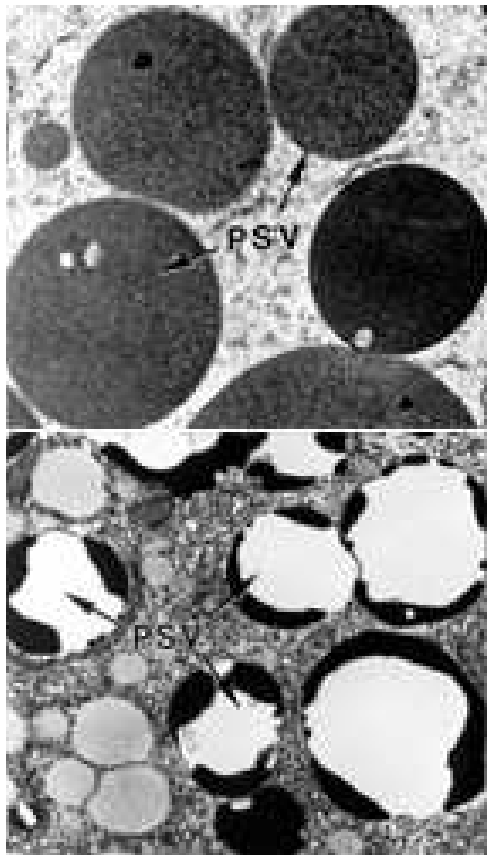


Figura 14. riempimento dei vacuoli delle cellule del cotiledone con proteine di riserva

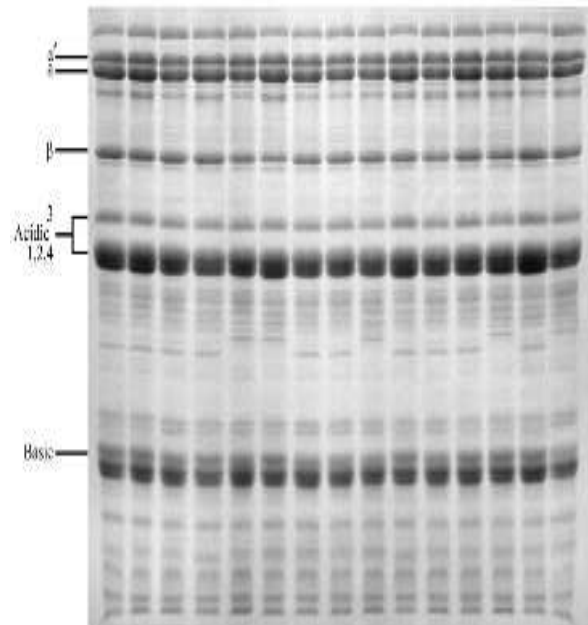


Figura 15. le frazioni 7S più leggere prime tre linee elettroforetiche a partire dall'alto e le proteine 11S più pesanti ultime tre linee

1.6.2.5 Miglioramento del tenore in proteine

È conveniente definire preliminarmente quali sono le caratteristiche biochimiche più consone ai diversi tipi di soyfood.

Per le bevande a base di soia, la qualità delle quali è soprattutto funzione della solubilità delle proteine, deve essere massimizzata la quantità dei composti di basso peso molecolare. Inoltre la frazione proteica 7S si caratterizza per delle proprietà ipocolesterolemizzanti.(Lovati M.L. et al 1991)

L'accrescimento del tenore in proteine del tipo 11S, sembra dunque in questo caso, in tutto auspicabile sia da un punto di vista dietetico che tecnologico.

Inoltre la stabilità del tofu (formaggio di soia) è molto influenzata dal rapporto percentuale 7S/11S della granella di soia.(Skurray G et al 1980)

Un forte tenore in proteine del tipo 11S sarebbe responsabile di un gel più stabile (Snyder H.E. et al 1987) quest'ultimo obiettivo è raggiungibile seguendo metodi di selezione tradizionale delle varietà. Combinando linee a basso tenore o private di certe subunità della frazione 11S con del materiale migliorato di ricercatori giapponesi e canadesi si sono ottenute delle linee che presentano delle proporzioni 7S/11S molto variabili con conseguenti diverse "vocazioni" nella produzione dei soyfoods .

L'ingegneria genetica è molto efficacemente utilizzata da grandi gruppi (Dupont) per modificare il rapporto 7S/11S. (Wilcox J.R. and Kinney A.J. 1999)

Sembra che anche i fattori ambientali condizionino il rapporto 7S/11S e sembra inoltre che le frazioni 7S si accumulino in modo relativamente tardivo durante il corso della maturazione. Di qui la possibilità di modulare la lunghezza del ciclo di sviluppo al fine di ottenere la composizione proteica ottimale. Per esempio il tenore in proteine 7s sarebbe più importante quando la granella è raccolta ad uno stato avanzato della sua maturazione.

1.7 Importanza dei prodotti a base di soia

Sin dagli anni 60 i prodotti derivati dalla di soia sono stati usati come ingredienti in diversi tipi di generi alimentari disponibili per i consumatori. La storia delle Agrosienze in questi ultimi anni ci ha consegnato colture cerealicole in grado fornire fonti caloriche di qualità ed economicamente convenienti. La soia in un'ottica di incremento della popolazione mondiale può considerarsi il supplemento proteico ai cereali più immediato. I prodotti a base di proteine di soia sono una ideale fonte di approvvigionamento per alcuni degli amminoacidi indispensabili usati come

complemento alle proteine dei cereali. Attualmente la proteina di soia è la più versatile rispetto a tutte le altre forme di proteina considerate nei programmi di nutrizione mondiali e rappresenta una fonte proteica di elevato valore biologico a basso costo.

Negli Stati Uniti dei segmenti dell'industria alimentare si sono specializzati nella produzione di alimenti contenenti proteina vegetale. Il progresso nella tecnologia di produzione di integratori a base di soia ha permesso l'ottenimento di prodotti che possiedono funzioni diverse: emulsionanti, leganti, strutturanti. Il successo nell'utilizzo di questi composti vegetali è cresciuto in ragione del loro basso costo. L'elevato valore nutrizionale dei prodotti contenenti proteina di soia è stato recentemente riconosciuto dalla US Food Administration, dalla US Drug Administration e dall'USDA (School Lunch Program).

1.7.1 Definizioni e metodi di preparazione

La pianta di soya (*Glicine max*) appartiene alla famiglia delle leguminose. Essa, come visto precedentemente, è in grado di utilizzare l'azoto atmosferico attraverso una simbiosi batterica che avviene nell'apparato radicale. Dopo la rimozione del tegumento e dell'olio dalla granella si ha un prodotto denominato come "fiocchi sgrassati" (o disoleati), questi costituiscono la materia base da cui si ottiene la maggior parte dei derivati proteici della soia.

I fiocchi disoleati hanno un contenuto di proteina di circa il 50%.

Diet:			
Protein source:		SPC	Casein
Item	Soyhulls, %:	0	0
n		13	12
Nitrogen		89.0	100.3
Amino acids			
Indispensable			
Arginine		94.9	100.3
Histidine		88.0	100.3
Isoleucine		91.6	100.1
Leucine		87.6	100.2
Lysine		88.4	100.3
Methionine		90.9	100.3
Phenylalanine		89.3	100.2
Threonine		84.2	99.9
Tryptophan		87.3	100.1
Valine		87.9	100.1
Dispensable			
Alanine		85.5	100.3
Aspartic acid		85.4	100.2
Cystine		81.1	100.2
Glutamic acid		90.9	100.3
Glycine		83.1	100.3
Proline		115.2	103.0
Serine		91.2	100.1
Tyrosine		91.8	100.3

Tabella 3 Digeribilità degli aminoacidi di soia paragonati a quelli della caseina(FAO 2002)

Aminoacidi essenziali	FAO/WHO			Defatted flour /grits	Concentrati	Isolati
	2-5	10-12	adulti			
mg/g proteina						
His	19	19	16	26	25	28
Iso	28	28	13	46	48	49
Leu	66	44	19	78	79	82
Lys	58	44	16	64	64	64
Met+cys	25	22	17	26	28	26
Phen+Tyr	63	22	19	88	89	92
Thr	34	28	9	39	45	38
Try	11	9	5	14	16	14
Val	35	25	13	46	50	50

Tabella 4. contenuto di aminoacidi essenziali d alcuni derivati alimentari di soia

La granella che entra nel processo di lavorazione è selezionata al fine di rimuovere i bacelli danneggiati e il materiale estraneo.

L'olio viene estratto mediante un solvente (esano) in uno dei numerosi possibili sistemi di estrazione controcorrente. Avvenuta la deoleazione il prodotto lascia l'estrattore e ogni residuo di esano viene rimosso tramite calore e trattamento sotto vuoto.

I derivati della soia possono essere classificati in tre grandi gruppi. Questa suddivisione è basata sul contenuto di proteina che può variare dal 40% a più del 90%. Tutti e tre i fondamentali derivati della soia (eccetto la farina estrusa- e parzialmente disoleata) sono derivati da fiocchi disoleati e sono:

- Farina di soia
- Tritume di soia
- Concentrati proteici
- Isolati proteici.

Concettualmente la farina oleosa è la granella da cui è stato tolto il tegumento, la farina parzialmente disoleata si ottiene dalla macinazione della granella da cui è stato tolto il tegumento e parte dell'olio. La farina disoleata è ottenuta come le precedenti ma l'olio è totalmente estratto. I concentrati proteici si ottengono dalla

farina disoleata da cui sono stati rimossi, zuccheri, acqua ed/o alcohol, gli isolati si ottengono dalla farina disoleata per rimozione di zuccheri, materiali solubili in acqua, fibre dei cotiledoni. Esistono anche prodotti tradizionali basati su tecniche di lavorazione orientale che utilizzano il fagiolo intero come materiale di partenza per la lavorazione successiva.

1.7.2 Farina e tritume di soia

La farina e il tritume di soia vengono prodotte per triturazione e vagliatura dei fiocchi di soia prima o dopo aver rimosso l'olio. Il loro contenuto proteico varia dal 40 al 54%. Questi due prodotti rappresentano la forma di lavorazione minima della proteina di soia ed hanno caratteristiche che possono variare nel contenuto in olio, nella dimensione dei grani, nel grado di trattamento termico. Farina e tritume sono prodotti anche in forme rioletate o lecitinate. Il grado di trattamento termico crea vari livelli di dispersibilità dell'acqua e di qualità dell'attività enzimatica caratteristiche da usare in diversi tipi di attività enzimatica.

1.7.3 Farine di soia parzialmente disoleate "Extruded Expelled"

L'Extruded-Expelled è un processo relativamente nuovo per rimuovere meccanicamente l'olio dalla soia: Nel processo di estrusione, la granella opportunamente macinata e detegumentata per aspirazione viene convogliata in un miscelatore riscaldato dove viti rotanti omogeneizzano il prodotto. La massa così trattata viene poi schiacciata con delle viti spremiatrici in modo da far fuoriuscire l'olio. Il processo elimina alcuni tipi di macchinari come gli essiccatori in corrente di vapore e i condizionatori. Il processo migliora l'estrazione dell'olio rispetto ad un semplice schiacciamento meccanico del seme e elimina l'uso di solventi organici. Mangime a basso contenuto di olio, alto contenuto di proteina e con elevato contenuto calorico è l'ideale per la nutrizione del bestiame da latte. Gli alimenti extruded-expelled "E-E meal" risultano avere una energia digeribile e disponibilità di aminoacidi più alta rispetto ai prodotti ottenuti da estrazione con solvente.(Joseph

J.E., 2001) Questo processo è particolarmente interessante per i produttori di alimenti “naturali”. Dal processo è possibile ottenere farina parzialmente disoleata con un indice di dispersione della proteina che varia da 12-69 e un con un contenuto residuo di olio (4,5 – 13%) aggiustando alcuni parametri durante il processo stesso.

1.7.4 Farina di soia testurizzata “Textured Soy Flour”

È anche conosciuta come TSP (Textured Soy Protein) o TVP (Textured Vegetable Protein). La farina di soia è ottenuta sia mediante una estrusione con vite singola sia mediante estrusione con vite doppia per impartirgli una struttura fibrosa p più grossolana. Questi derivati sono usati come ingredienti alimentari.

I TSP una volta idratati sono frequentemente fatti assomigliare in struttura ed apparenza alla carne di manzo, di maiale, ai frutti di mare o al pollo.

1.7.5 Concentrati

Sono preparati dalla soia disoleata e priva di tegumento per rimozione della maggior parte dei costituenti non proteici solubili in acqua. Contengono almeno il 65% di proteina (N*6,25). I concentrati di soia sono prodotti mediante tre metodi fondamentali:

- 1) Estrazione acida (a pH 4,5)
- 2) Estrazione con acqua e alcohol (60-90%)
- 3) Denaturazione della proteina con vapore, estrazione successiva con acqua.

Il concentrato di proteina di soia ha una bassa solubilità, per questo viene trattato termicamente (steam injection o jet cooking) e mediante lavorazione meccanica (omogeneizzazione) per incrementarne la solubilità e la funzionalità. Il concentrato che ha subito un trattamento meccanico prende il nome di concentrato funzionale.

1.7.6 Concentrati di proteina testurizzati

I concentrati testurizzati sono ottenuti da un concentrato tradizionale o da concentrati ottenuti per estrazione acida, la lavorazione può avvenire mediante macchine a vite singola o doppia. Frequentemente questi prodotti assomigliano in struttura ed apparenza alla carne di manzo, di maiale, ai frutti di mare o al pollo.

1.7.7 Isolati proteici

Gli isolati proteici sono i più raffinati derivati della soia commercialmente disponibili. Sono preparati dalla granella detegumentata e disoleata dopo rimozione di tutti i composti non proteici come mostrato nella tabella 1. Questi prodotti hanno un contenuto di proteina superiore al 90% (N x 6,25) su una base a umidità libera.

1.7.8 Soy Foods e ingredienti alimentari

Gli idrolizzati parziali di proteina di soia, sono prodotti ottenuti dalla digestione tramite enzimi proteolitici (peptidasi di animali, piante o batteri) come pepsina, papaina o bromelaina il peso delle proteine varia da 3000 a 5000 dalton. La riduzione del peso molecolare migliora le proprietà di sospensione e la solubilità acida.

La proteina totalmente idrolizzata usata come agente aromatico può essere preparata dal tritume di soia per idrolisi acida. Un certo numero di enzimi è disponibile come agenti aromatizzanti.

I soy food orientali sono prodotti ottenuti sia da fermentazione che non e sono parte della dieta giornaliera in più aree del mondo. Prodotti come la salsa di soia (shoyu), il formaggio di soia (tofu) e il tempeh ultimamente sono diventati più

popolari anche negli Stati Uniti e in Europa. La preparazione e l'uso di questi soy food è descritta nella tabella 5

Studi effettuati sugli animali e sugli uomini hanno mostrato come i prodotti a base di soia siano un'eccellente fonte proteica. In numerose applicazioni alimentari la proteina di soia non è usata come unica fonte proteica, ma in combinazione con altre proteine. Più studi hanno mostrato come la proteina di soia migliori il valore nutrizionale degli alimenti specialmente quando è combinata con i cereali più diffusi.

1.8 COMPOSIZIONE AMINOACIDICA

I fabbisogni proteici nella dieta umana non riguardano solo la proteina in se ma soprattutto uno specifico apporto di aminoacidi essenziali per la crescita il mantenimento o il lavoro fisico. Il "set" di aminoacidi presenti nella proteina di soia è uno dei più completi fra tutte le fonti di proteine vegetali ed è molto simile (eccezione fatta per gli aminoacidi solforati ad es. metionina) al "set" di aminoacidi derivanti da fonti animali. Le proteine della soia possono inoltre migliorare la qualità nutrizionali di altre proteine vegetali. Aminoacidi che sono limitati in altre fonti vegetali possono essere presenti in eccesso nella proteina (Bodwell, C.E., and Hopkins, D.T., 1985)

di soia. Ad esempio i prodotti a base di proteina di soia contengono un livello di lisina che eccede le esigenze umane, i prodotti a base di soia sono un eccellente correttivo del contenuto di lisina di cereali come il mais o il frumento.

Numerosi studi hanno stabilito i valori nutrizionali della proteina di soia in combinazione con altri alimenti proteici con o senza aggiunta di aminoacidi essenziali.

Tipo	Preparazione	Uso
Farina oleosa (40% proteina)	Detegumentazione, I cotiledoni sono ridotti a una grandezza specifica. Setaccio n°100 U.S. Standard Screen size.	Produzione affermata in Europa e in Asia nell'industria dei prodotti soggetti a cottura e per la produzione del latte di soia.
Farina ad elevato contenuto di enzimi (52-54% proteina)	Prodotta da fiocchi disoleati, subisce un trattamento termico minimo. Elevato NSI ^b (indice solubilità dell'azoto in ambiente basico)	Incrementa la tolleranza alla miscibilità e schiarisce il colore negli impasti; preparazione di concentrati funzionali ed isolati
Farina disoleata (52-54% proteina)	Macinazione fina i grani passano attraverso un setaccio n°100 U.S. Standard Screen size. Trattamento termico ad umidità controllata usato per ottenere il "bianco": NSI 85-90 gradi "Cooked": NSI 20-60 gradi "Toasted": NSI < 20 gradi	Vari usi che richiedono un largo range di solubilità proteica
Tritume disoleato (52-54% proteina)	La grandezza dei grani è vagliata tra il n°10 e il n°80	Alimenti a base di carne macinata, e prodotti di panetteria.
Fiocchi lecitinati	Lecitina o oli vegetali sono combinati con fiocchi disoleati (0.5-30%)	Aumenta la dispersibilità dell'acqua e la capacità di emulsificazione nell'applicazioni in prodotti soggetti a cottura

1.8.1 Proteine

Da indagini statistiche è stato riscontrato che l'incidenza delle malattie cardiovascolari (come l'arteriosclerosi) è minore nei paesi orientali (per esempio

Tabella. 5 - Preparazione e uso della farina di soia.

Isolati Proteici	<p>La proteina è estratta dai fiocchi di soia disoleati non trattati termicamente.</p> <p>Il trattamento è effettuato tramite acqua od alcali deboli, in un range di pH tra 8 e 9 seguita da una centrifugazione per rimuovere le fibre insolubili residue; successivamente con un trattamento dell'estratto ottenuto a pH 4.5 si ha la coagulazione della maggior parte dei precipitati proteici sotto forma di agglomerati che vengono separati mediante centrifugazione dagli oligosaccaridi solubili. Segue un lavaggio multiplo e da essiccazione in corrente si ottiene un isolato isoelettrico. Normalmente lo si neutralizza con Na⁺ o K⁺ per migliorarne la solubilità.</p>	<p>Formule per neonati ed applicazioni nutrizionali.</p> <p>Prodotti di caseificio</p> <p>Applicazioni che richiedono emulsificazione ed emulsione stabilizzazione, assorbimento di acqua e olio, proprietà plastiche e adesivanti.</p> <p>Cibi vegetali.</p>
------------------	--	---

Tabella. 5 - Preparazione e uso della farina di soia.

Tabella. 6 Principali tipi di Soyfood-

Tipo	Preparazione	Uso
Latte di soia	Estratto acquoso di soia intera	Utilizzato come il latte
Tofu (formaggio di soia)	Prodotto dalla coagulazione del latte di soia. Il Tofu contiene l'88% di acqua, 6% Proteina, 3.5% olio. Può essere congelato, essiccato (56% proteina) e stagionato.	Utilizzato come il latte o il formaggio. Può essere conservato a temperatura ambiente per 6-12 mesi
Tempeh	Composto di soia cotta fermentato da <i>Rhizopus Orizae</i> (contenuto proteico	Cucina indonesiana

	circa del 20%) su base umida. Se essiccato ha un contenuto proteico del 50%	
Miso	Ottenuto dalla fermentazione Di un substrato di soia cotta tramite <i>Aspergillus Orizae</i>	Base per zuppe e condimento
Salsa di soia	Prodotta dalla fermentazione di una combinazione di soia e cereali (usualmente grano tenero).	Aromatizzante
HVP (hydrolized vegetable protein)	Idrolisi acida e/o enzimatica di tritume di soia	Aromatizzante
Proteine Battute	Idrolisi parziali con enzimi	Consumo fresco

Tabella. 6 Principali tipi di Soyfood-

(Giappone) che non in occidente. La differenza nel regime alimentare e più particolarmente nel consumo di prodotti a base di soia potrebbe spiegare (almeno in parte) questa differenza. Diversi composti presentano proprietà suscettibili di prevenire malattie cardiovascolari. Carrol ha messo in evidenza l'attività ipocolesterolemica nel ratto, nel criceto e nell'uomo.

Una forte colesterolemia, e in particolare un forte tenore in LDL (low density lipoprotein), trasportatori di colesterolo, sono considerati come dei fattori aggravanti il rischio di malattie cardiovascolari. In linea generale la composizione in acidi amminici del bolo alimentare potrebbe influenzare la colesterolemia. La metionina e la cisteina sembrano ipercolesterolemizzanti come l'arginina. Le proteine delle leguminose e della soia in particolare sono molto eterogenee dal punto di vista della composizione in acidi amminici di differenti frazioni proteiche (2S, 7S, 11S, 15S)¹ e sono di conseguenza, state studiate separatamente.

Delle differenze a livello dell'attività ipocolesterolemica sono state osservate tra le differenti proteine. Così le proteine 7S e particolarmente la subunità β (conglucine)

sono più attive rispetto alle proteine 11S (Glicinine) a livello dell'attivazione dei recettori LDL. In effetti sembra che l'attività ipocolesterolemica degli estratti proteici di soia sia legata all'attività di recettori implicati nel catabolismo del colesterolo di tipo LDL.

1.8 2 Inibitori della digestione

In soia sono studiati anche altri composti che hanno un effetto negativo sul metabolismo: gli inibitori della tripsina e chimotripsina: inibitori di Kunitz e Bowman Birk. (figura 16)

Queste sostanze sono presenti nel seme di soia (nel germe e nel cotiledone) nonché in tutti i prodotti di lavorazione della semente precedentemente illustrati (gli inibitori di Kunitz e Bowman Birk vengono denaturati per trattamento)

(figura 17)

Nella soia consumata senza cottura causano una diminuzione dell'attività delle proteasi a serina. (Tabella 7)

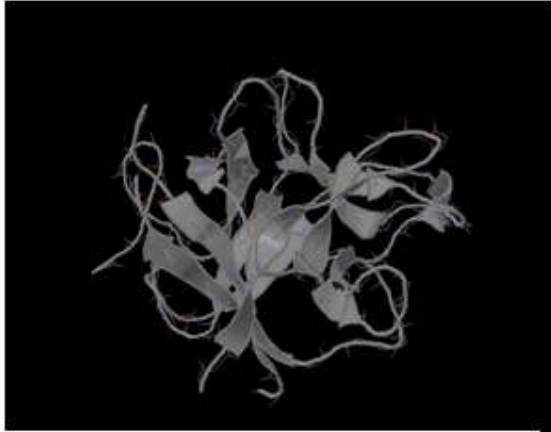
I semi di tutte le piante contengono numerose proteine attive biologicamente che hanno diverse funzioni tra cui la difesa da parte della pianta contro l'attacco di patogeni tra questi fattori è possibile annoverare enzimi idrolitici, enzimi inibitori, proteine e cellule killer. La classificazione degli enzimi che inibiscono l'idrolisi proteica comprendono sia gli inibitori delle amilasi che gli inibitori delle proteasi.

Questi ultimi composti sono denominati composti antinutrizionali per la loro proprietà di diminuire l'efficienza del processo digestivo sia negli animali che nell'uomo.

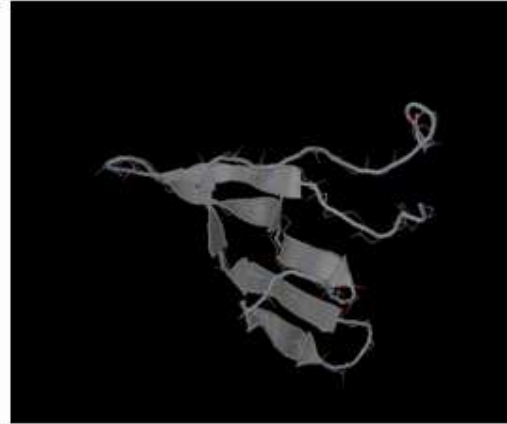
Diversi composti antinutrizionali sono stati recentemente oggetto di studio per le loro proprietà in ambito medico, farmacologico, e cosmetico

Somministrazioni allo 0,5% nella dieta dell'Inibitore di Bowman Birk concentrato (BBIC) hanno ridotto del 42-50% la comparsa di tumori in topi con predisposizione autosomica a neoplasie dell'intestino.

(Kennedy AR, Beazer-Barclay Y, Kinzler KW, Newberne PM, Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, Terao T).



Sequenza: inibitore kunitz
DFVLDNEGNPLENGGTYIILSDITAF
GGIRAAPTGNERCPLTVVQSRNELD
KGIGTIISSPYRIRFIAEGHPLSLKFD
SFAVIMLCVGIPTWVSVVVDLPEGP
AVKIGENKDAMDGWFRLEKRVSDdEF
NNYKLVFCPQQaeDdKCGDIGISIDH
DDGTRRLVSKNKPLVVQFQKLDke
sl Peso molecolare: 20 kDa



Sequenza inibitore Bowman Birk
DDESSKPCDQCACTKSNPPQC
RCSDMRLNSCHSACKSCICALS
YPAQCFCVDITDFCYEPCKPSE
DDKEN
P.M: 7 kDa

Figura 16. inibitori della digestione struttura quaternaria.

L'applicazione di una soluzione all'1% di BBIC, 5 volte alla settimana è stata altamente efficace nel sopprimere la carcinogenesi orale indotta con dimetilbenzantracene in animali da laboratorio (Kennedy AR, et al LC), Ulteriori risultati positivi sono stati ottenuti in umana nei casi di Leucoplachia (tumore del cavo orale) e hanno mostrato come l'impiego dell'inibitore di Bowman Birk sia in grado di prevenire la comparsa nel circolo sanguigno di proteine potenzialmente cancerogene. (Wan XS, Meyskens FL Jr, Armstrong WB, et al.). In particolare l'inibitore di Kunitz si è dimostrato in grado di bloccare in vitro le trasformazioni cellulari indotte dal carcinoma.

I principali inibitori della digestione presenti nel seme di soia (Bowman Birk e Kunitz) sono conosciuti fin dal 1960. l'inibitore di Kunitz è stato recentemente riconsiderato come fattore chemio preventivo, e anche per altre applicazioni

biomediche come la crescita dei capelli e del processo di colorazione degli stessi. E' una proteina di 20,1 Kda la cui sequenza è stata identificata da Koid e collaboratori nel 1973, contiene quattro residui di cisteina che formano due legami disulfide, sono stati descritti dettagliatamente tre isoforme dell'inibitore di kunitz e la struttura tridimensionale è conosciuta

1.8.3 Le proteasi a serina

Le proteasi sono enzimi che catalizzano l'idrolisi di legami peptidici. Le **serin proteasi** sono una classe di proteasi il cui meccanismo catalitico è basato sulla presenza nel sito attivo di un residuo di serina. Appartengono a questa classe **la tripsina, la chimotripsina**, l'elastasi, la trombina, la subtilisina, la plasmina etc. **Chimotripsina** e **tripsina** sono proteasi digestive sintetizzate in forma di *zimogeni* inattivi nel pancreas ed attivate nell'intestino ad opera di altre proteasi. Entrambe sono delle *endopeptidasi* (idrolizzano i legami peptidici interni della proteina, dando origine a frammenti più corti).

La **chimotripsina** scinde in primo luogo i legami peptidici interni in cui gli aminoacidi aromatici *fenilalanina, tirosina* o *triptofano* impegnano il loro carbossile; in seguito scinde con minor efficienza i legami in cui siano presenti la *leucina* o la *metionina*. Molto meno suscettibili di idrolisi sono i legami in cui sono impegnate l'*isoleucina* e la *valina*. Di fatto una proteina idrolizzata dalla chimotripsina da origine in primo luogo a peptidi con gli aminoacidi Phe, Tyr e Trp in posizione C-terminale; in un secondo tempo si formano peptidi con C-terminali Leu e Met. Solo più lentamente appaiono in posizione C-terminale sia Ileu, Val e tutti gli altri aminoacidi.

La **tripsina** possiede una diversa specificità di substrato: essa scinde i legami polipeptidici in cui gli aminoacidi *lisina* ed *arginina* impegnano il loro carbossile. Entrambi questi aminoacidi posseggono a pH fisiologico una carica positiva sulla loro catena laterale.

Sia la chimotripsina che la tripsina sono proteine globulari aventi una cosiddetta tasca idrofobica. Nella tasca idrofobica della chimotripsina, completamente ricoperta da residui di aminoacidi apolari, trova alloggio la catena idrofobica della fenilalanina, della tirosina o del triptofano.

Le serin proteasi sono così denominate perchè un residuo di serina è responsabile dell' attacco nucleofilo al carbonile del legame peptidico.

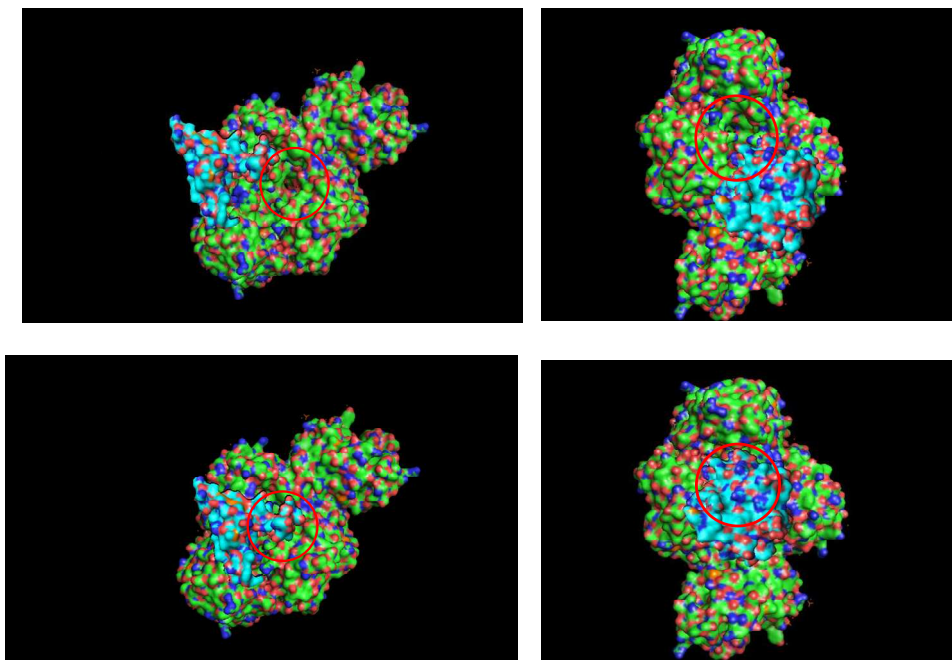


Figura 17. azione dell' inibitore di Bowman Birk (immagini a sinistra) e di kunitz (immagini adestra) sul sito attivo della tripsina.

Attività anti-tripsina degli inibitori naturali	
Con 2 µg di inibitore per 1 µg di tripsina umana, la percentuale di inibizione della tripsina umana è:	
○ Inibitore della tripsina bovina	< 10%
○ Ovomucoide di uovo di gallina	< 10%
○ Soia "AA"	< 10%
○ Piselli secchi	35%
○ Soia	68%
○ Fagioli	70%
○ Fagioli bianchi	72%
○ Ovomucoide di uovo di quaglia	76%
○ Inibitore di Kunitz	99%

Tabella 7. attività antitripsina degli inibitori di Kunitz e Bowman Birk. (da Medi. Biol. 2005)

1.8.4 Lectine (emoglutinine)

Le lectine sono un altro tipo di fattore antinutrizionale della soia. si tratta di Proteine che si combinano con gli oligosaccaridi e i glicolipidi delle membrane cellulari (Fig. 17.1) nella mucosa gastrica ed intestinale, ostacolando in tal modo l'assorbimento dei nutrienti. Le lectine si legano inoltre alle cellule del sangue determinando agglutinazione delle emazie. Ritroviamo tali antinutrizionali nelle leguminose in particolare nel fagiolo, pisello, soia e fava. Le lectine sono termolabili.

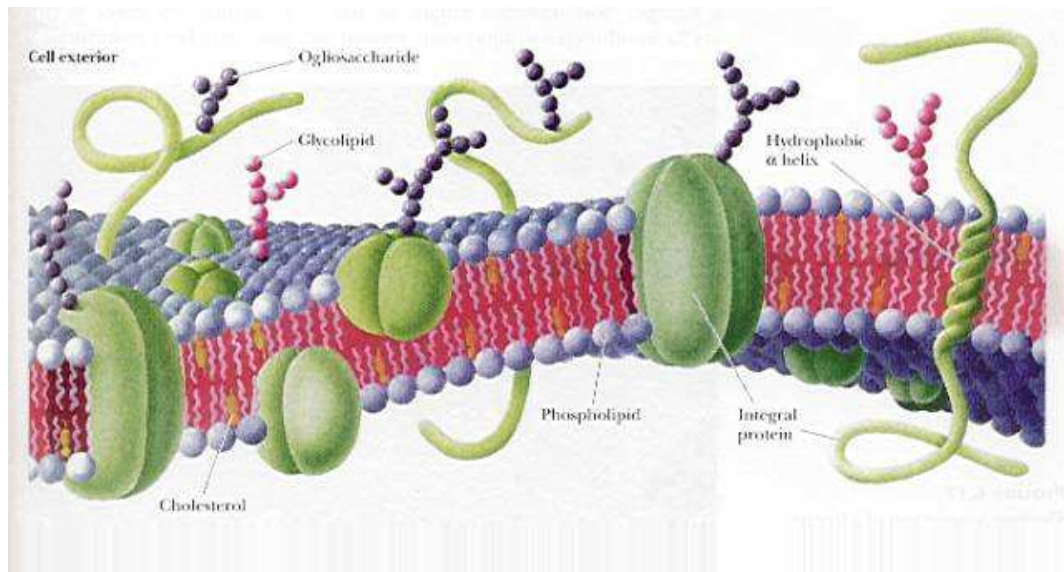


Figura 17.1 German Stanfield 2003 (Fisiologia umana, EdiSES, 2003)

2 Scopo del lavoro

Il presente lavoro è stato impostato allo scopo di valutare l'effetto di alcune variabili agronomiche sulla qualità e sulla quantità di isoflavoni prodotti dal seme di soia, nonché sul contenuto di proteina. Tale scopo è stato dettato dall'esigenza di individuare le varietà di soia sulle quali applicare delle linee guida per la coltivazione che permettano di ottimizzare il contenuto di molecole bioattive nel seme.

Le variabili prese in considerazione nello studio della fisiologia degli isoflavoni in soia vengono così sintetizzate:

1. Fattori varietà e annata per la produzione di isoflavoni
2. Fattore "tipologia di coltivazione" biologico/convenzionale,
3. Siti di produzione all'interno del seme (cotiledone, embrione)
4. Siti di produzione nella pianta
5. Fattori irrigazione, concimazione su differenti varietà.

Le caratteristiche oggetto di stima e misura invece sono riportate come segue:

- a. Valutazione del rapporto tra efficienza della fissazione azotata e la propensione a produrre isoflavoni.
- b. Analisi morfofisiologica dei noduli radicali
- c. Analisi delle ureidi fogliari nel corso del ciclo vegetativo
- d. Analisi delle ureidi dei noduli nel momento di massimo incremento della loro attività
- e. Analisi dell'architettura dell'apparato radicale.
- f. Fattore tipo di terreno.
- g. Analisi dell'intensità di colorazione dell'ilo.

3 Materiali e metodi

3.1 PROVA VARIETALE

Nel triennio 2005-07 sono state allestite due prove di confronto varietale condotte parallelamente secondo due diversi tipologie di coltivazione, coltivazione “biologica e convenzionale”.



Figura 18. Carta dei suoli del veneto 1:250.000 per le località Legnaro e Pozzovegliani.

La prova convenzionale è sempre stata eseguita in località Legnaro mentre la prova biologica è stata allestita in località Pozzoveggiani, entrambe presso l'Azienda Agraria Sperimentale dell'Università di Padova..

Le località distano circa km 4 in linea d'aria e sono caratterizzate da suoli di tipo diverso (figura 18) (ARPAV, da carta dei suoli del Veneto, scala 1:250.000).

In località Legnaro è presente un terreno, di tipo B.R.4.4 (Fig 21) con orizzonte Ap-Bw-Cg con tessitura media di tipo FL (franco limosa), il suolo risulta profondo, con calcare totale superiore al 40% reazione subalcalina ph 8,1 e falda sottosuperficiale a 150 cm. il drenaggio è considerato dalla classificazione di tipo mediocre.

Dalle analisi del terreno si sono ottenuti i parametri evidenziati nella tabella 8.

Parametro	Valore
pH	8,04
S.O.	1,51%
N tot	0,1%
C/N	8,88
P assimilabile	35,15 ppm
P tot	770 ppm
K scambiabile	60,21
Mg scambiabile	190,92 ppm
Ca scambiabile	2609,30 ppm
Na scambiabile	6,06 ppm
C.S.C.	14,8 meq
S (da solfati)	4,18 ppm

Tabella 8. Analisi chimica del terreno in località Legnaro

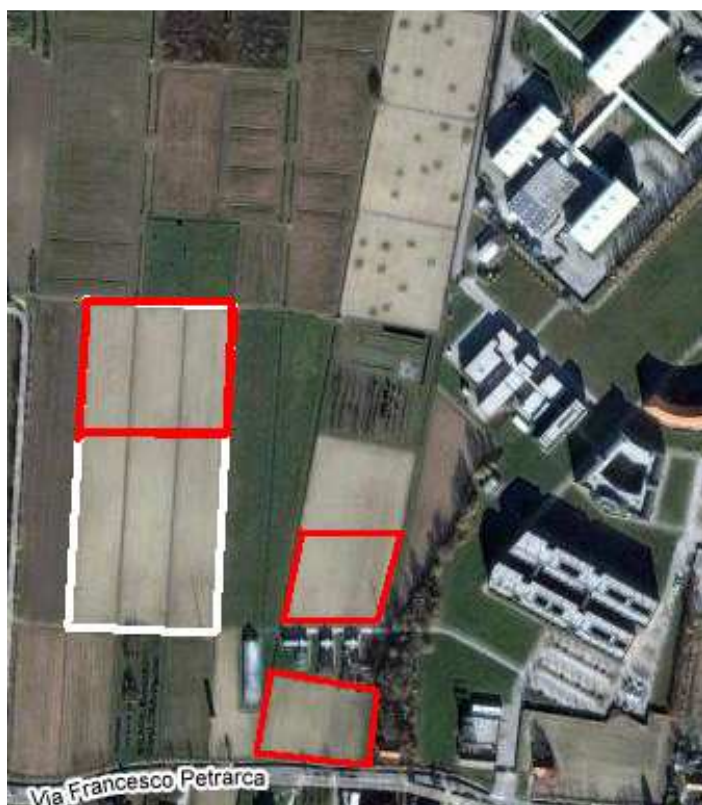


Figura 19. appezzamenti dove era localizzata la prova in località Legnaro.

In località Pozzoveggiani è presente un terreno, di tipo B.R.3.3 con orizzonte Ap-Bw-C: (Fig 22) orizzonte profondo a parziale decarbonatazione (dissoluzione chimica dei carbonati negli orizzonti del suolo ad opera di acque meteoriche ricche di CO_2 , il carbonato passa allo stato di bicarbonato solubile e viene rimosso per lisciviazione) con tessitura media di tipo F (franco), il calcare totale risulta compreso tra il 25% e il 40%, reazione subalcalina (ph 8,1-8,4). La falda sottosuperficiale è a 150 cm. il drenaggio è considerato dalla classificazione di tipo buono.

Il terreno inoltre è stato sottoposto a 3 letamazioni in 6 anni (una letamazione ogni due anni con una dose di letame pari a 400 q/ha). E' stato usato il letame come unico apporto alla fertilità dell'appezzamento trovandosi quest'ultimo in un'azienda di tipo biologico. La colorazione del terreno più scura rispetto a quella di Legnaro indica verosimilmente una buona dotazione di sostanza organica. (Figura 20)



Figura 20. Localizzazione della prova in località Pozzoveggiani

Legenda:

- orizzonte Ap: orizzonte minerale formato in superficie o adiacente alla superficie che mostra un accumulo di S.O. umificata associata strettamente con la frazione minerale, la lettera p indica che tale orizzonte è disturbato dall'aratura o da altre pratiche colturali
- orizzonte Bw: orizzonte minerale in cui la struttura del substrato è cancellata o solo debolmente evidente, la lettera w indica una alterazione dell' orizzonte dovuta alla presenza di argilla in profondità.
- orizzonte C: orizzonte minerale di materiale in consolidato da cui si presume che il solum si sia formato, la lettera g indica la presenza di screziature legate a reazioni di ossidazione e riduzione.



Figura 21. Terreno tpo “Legnaro”.



Figura 22. Terreno tipo “Pozzoveggiani”.

Le varietà sono state coltivate in entrambi gli ambienti seguendo uno schema sperimentale a blocchi randomizzati con 3 ripetizioni. (figura 23 e 24). Sono state coltivate 35 varietà a Legnaro nel 2005 (Tab 10) e un sottoinsieme di 28 varietà sono state coltivate a Pozzoveggiani nello stesso anno (Tab 9).

Nel 2006 e nel 2007 sono state coltivate 25 varietà sia a Pozzoveggiani che a Legnaro, (Tab. 11).

Come già detto i protocolli di coltivazione erano diversi per le due località, a Legnaro la coltura è stata condotta in modo convenzionale, mentre a Pozzoveggiani con metodo biologico.

3.1.1 Operazioni colturali eseguite in località Legnaro

Preparazione del terreno:

- Precessione colturale: mais
- Aratura leggera profondità 30cm (primi marzo)

- estirpatura profondità 30 cm (inizio febbraio)
- estirpatura profondità 30 cm (fine marzo)
- erpicatura rotativa (prima decade di maggio)

Concimazione

- *concimazione presemina effettuata con concime complesso 0 – 100 – 100 distribuiti 100 kg/ha di potassio e 100 kg/ha di fosforo (prima decade di maggio)*
- *semina interfila 50 cm densità 40 semi m² (seconda decade di maggio)*

Controllo della flora infestante

- 29/06/07 scerbatura manuale della flora infestante
- diserbo con Tuareg 1,2 l/ha + Harmony 7g/Ha (prima decade di luglio)

Raccolta

- raccolta scalare manuale e successiva trebbiatura meccanica

Le dimensioni delle parcelle erano di m 2 di larghezza e 10m di lunghezza.

3.1.2 Operazioni colturali eseguite in località Pozzoveggiani

Preparazione del terreno:

- precessione colturale mais
- aratura a 30 cm con aratro bivomere (inizio marzo)
- estirpatura (prima decade marzo)
- 12/03/07 erpicatura con erpice rotante (seconda decade di marzo)

Concimazione

- 10/11/2006 letamazione: 400q/ha di letame con tenore di N del 5 per mille

Semina

- *semina interfila 50 cm densità 40 semi m² seconda decade di maggio*

Controllo flora infestante

- scerbatura manuale della flora infestante (prima decade giugno)
- scerbatura manuale della flora infestante (seconda decade giugno)
- 29/07/07 scerbatura manuale della flora infestante (terza decade luglio)

Irrigazione

- 20/07/07 irrigazione di soccorso 35 mm (solo nel 2006)

Raccolta

- raccolta scalare manuale e successiva trebbiatura meccanica

Tabella 9. Varietà coltivate nel 2005 nell' Azienda Biologica, Pozzoveggiani.

var	gm	fornitore	var	gm	fornitore
PR92-B63	1+	Pioneer	ZEN	1	Monsanto
TOYAMA	1	Monsanto	GIULIETTA	1	Agra
SPONSOR	1	Maisadour	BRILLANTE	1-	Agra
SAREMA	0	Maisadour	NIKIR	1	Pioneer
DEMETRA	1	Agra	PR91-B92	1-	Pioneer
SAMURAI*	1	Monsanto	REGIR	1	Pioneer
ORLANDA	1	Maisadour	CRESIR	0+	Pioneer
FIUME	1-	Sis	DEKABIG	1+	Monsanto
MAGNUM	1	Renk	DENNY	1-	Sivam
NIKKO	1-	Monsanto	ASCHIA	0+	Agra
FLY*	1+	KWS	AIRES	0+	Sis
ATLANTIC	1	Renk	M10	0+	Pioneer
HILARIO	1	Sis	CASA	1+	Sis
SAKAI*	1-	Monsanto	B 12	1	Pioneer

VARIETA'	GM	FORNITORE	VAR	GM	FORNITORE
ATLANTIC	1	Renk	PR91-B92	1-	Pioneer
PR92-B63	1+	Pioneer	ZEN F	1	Monsanto
SPONSOR	1	Maisadour	CASA	1+	Sis
TOYAMA	1	Monsanto	ZEN	1	Monsanto
PACIFIC	1	Renk	ASCHIA	0+	Agra
BRILLANTE	1-	Agra	NIKKO	1-	Monsanto
SAMURAI*	1	Monsanto	HILARIO	1	Sis
FLY*	1+	KWS	B 12	1	Pioneer
NIKIR	1	Pioneer	FIUME	1-	Sis
REGIR	1	Pioneer	ALES	1	KWS
QUEEN	1+	Ensat	NIKKO F	1-	Pioneer
MAGNUM	1	Renk	SAREMA	0	Maisadour
IMARI	1+	Ensat	M10	0+	Pioneer
DEMETRA	1	Agra	AIRES	0+	Sis
GIULIETTA	1	Agra	CRESIR	0+	Pioneer
ORLANDA	1	Maisadour	YUSHU	1-	Ensat
DENNY	1-	Sivam	SAKAI*	1-	Monsanto
DEKABIG	1+	Monsanto			

Tabella 10. Varietà coltivate nel 2005 nell'azienda convenzionale, di Legnaro

3.1.3 Analisi effettuate nelle prove varietali:

- determinazione della resa areica
- determinazione della concentrazione di isoflavoni nell'embrione e nel cotiledone:
Questa metodica ha permesso di misurare le concentrazioni di tutti gli isoflavoni della pianta, per semplicità non sono state considerate le forme acetiliche presenti in bassa concentrazione.
- determinazione del contenuto in proteina grezza del seme
della pianta, per semplicità non sono state considerate le forme acetiliche presenti in bassa concentrazione.
- determinazione del contenuto in proteina grezza del seme

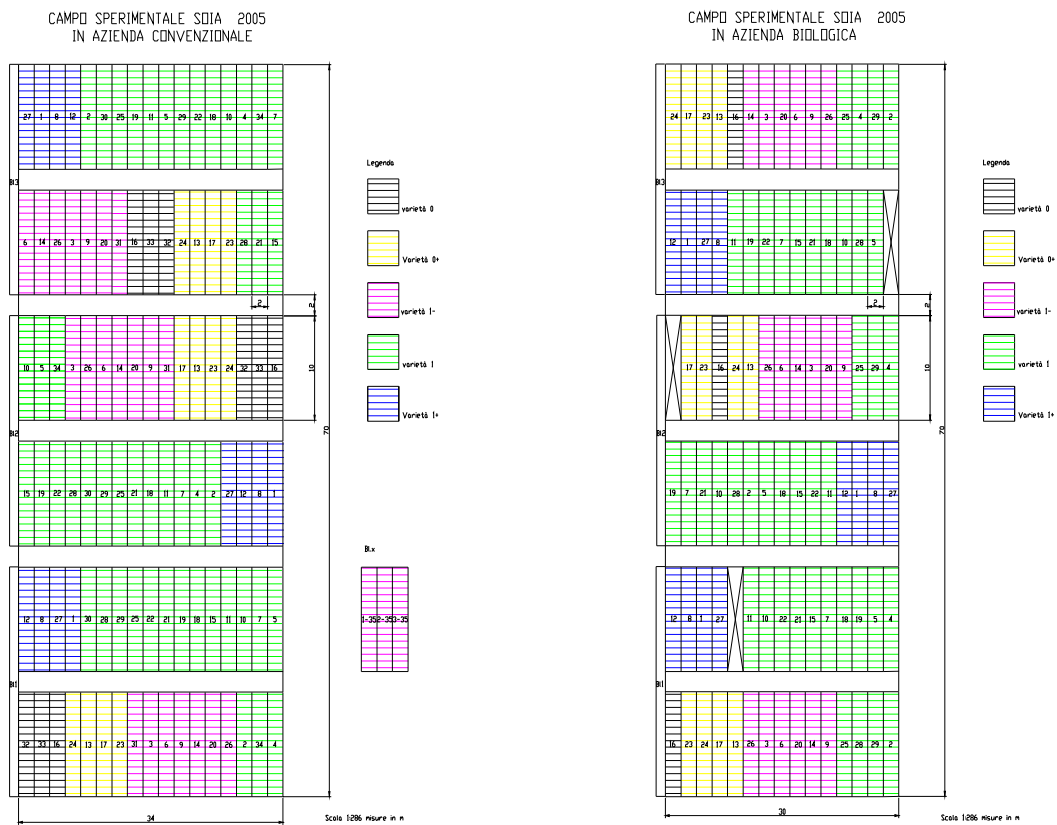


Figura 23. Campi sperimentali 2005 in convenzionale e biologico.

n	Varietà	Fornitore seme	GM
1	Sarema	Semfor	0
2	Aires	Sis	0+
3	M 10	Pioneer	0+
4	Cresir	Pioneer	0+
5	B 92	Pioneer	1-
6	Fiume	Sis	1-
7	Brillante	Syngenta	1-
8	Nikko	Monsanto	1-
9	Sakai	Monsanto	1-
10	Atlantic	Renk Venturoli	1-
11	Indian	Renk Venturoli	1
12	Zen	Monsanto	1
14	Sekoia	Semfor	1
15	Sponsor	Semfor	1
16	Hilario	Sis	1
17	Askasubi	Sis	1
18	Pacific	Sis	1
19	Giulietta	Golden Arvest	1
20	Shama	Golden Arvest	1
21	Ales	KWS	1
22	Nikir	Pioneer	1
23	Regir	Pioneer	1
24	B 63	Pioneer	1+
25	Fukui	Monsanto	1+
26	Dekabig	Monsanto	1+

Tabella 11. Varietà 2006-2007, Pozzoveggiani e Legnaro.

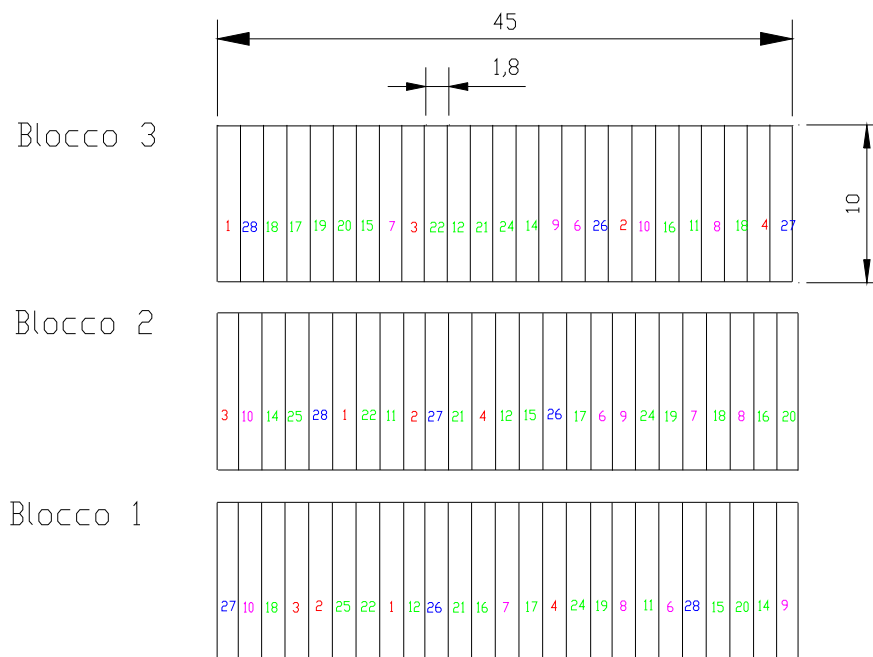


Figura 24 Campi sperimentali 2006-2007 biologico e convenzionale

3.1.3 Analisi effettuate nelle prove varietali:

- determinazione della resa areica
- determinazione della concentrazione di isoflavoni nell'embrione e nel cotiledone:
Questa metodica ha permesso di misurare le concentrazioni di tutti gli isoflavoni della pianta, per semplicità non sono state considerate le forme acetiliche presenti in bassa concentrazione.
- determinazione del contenuto in proteina grezza del seme

3.2 PROVA D'IRRIGAZIONE E CONCIMAZIONE

Al fine di valutare la risposta della pianta di soia ai fattori Irrigazione e concimazione, relativamente alla produzione di Isoflavoni è stata allestita nel 2006 e 2007 una prova sperimentale organizzata a split split-split plot (Fig. 25.1 e 25.2) in cui nelle unità intere è stato saggiato il fattore irrigazione, mentre nelle unità suddivise è stato saggiato il fattore cultivar varietà e “tipo di fusto” nei parcelloni si è saggiato l’effetto irrigazione. L’irrigazione è stata effettuata tramite impianto a manichetta forata, l’umidità del terreno è stata mantenuta costantemente alla capacità di campo, umidità del 32% a circa 30 cm di profondità nel suolo di Legnaro. La valutazione del livello di umidità è stata effettuata tramite misura spot mediante l’utilizzo di TDR.

per la prova sono state scelte due varietà con caratteristiche differenti, Ales con bassa attitudine alla concentrazione di proteina ed elevata propensione alla concentrazione di Isoflavoni e Nikir con attitudini sostanzialmente opposte (elevata propensione alla concentrazione di proteina e bassa propensione alla concentrazione di isoflavoni). L’azoto tardivo è stato apportato col fine di massimizzare la resa proteica, fornendo alla pianta l’elemento azotato in un periodo in cui la nitrato reductasi ha diminuito la sua attività e la nitogenasi non è ancora arrivata ad esprimere il massimo

Della sua capacità catalitica per la fissazione dell’azoto. Sono state separate e valutate distintamente le produzioni dei fusti da quelle delle ramificazioni. Essendo la soia una leguminosa ad elevata capacità di fissazione si è deciso di monitorare l’andamento della fissazione azotata nelle diverse condizioni di coltivazione, valutando mediante spettrofotometro il livello delle ureidi fogliari (Young and Conway mod.).

Schema sperimentale

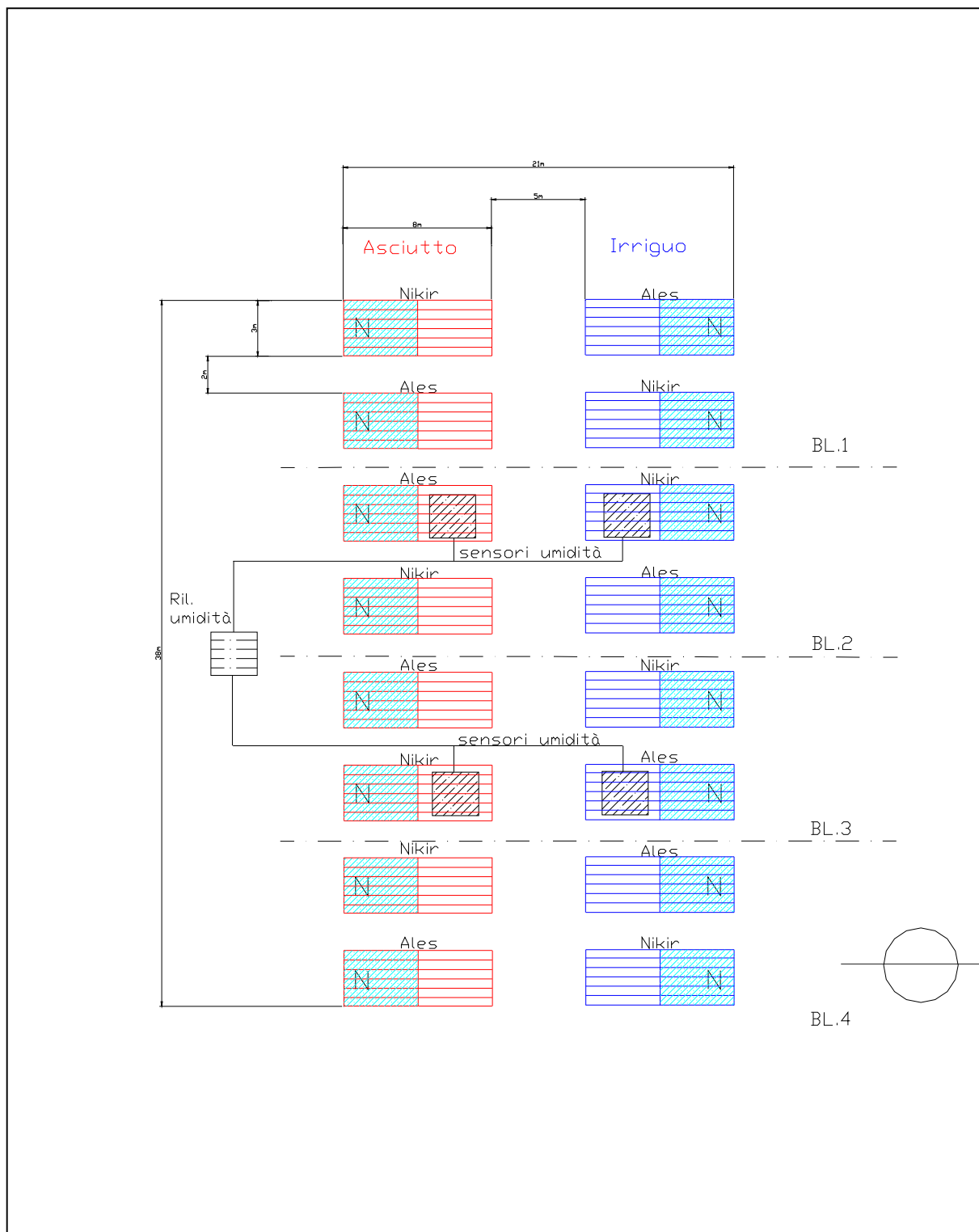


Figura 25.1. Schema sperimentale a split -split plot.



Figura 25.2. Prova d' irrigazione: a sinistra l'unità non irrigata, a destra l'unità irrigata.

Distanza dalla rete elettrica in campo circa 100 m:

- Distanza dalla sede aziendale circa 400 m
- N = porzione di parcella concimata con azoto
- Bl = blocco

3.2.1 Protocollo coltivazione prova d'irrigazione (2006)

Varietà: Nikir, Ales

Preparazione del terreno:

- 27/01/07 aratura a 40 cm con aratro bivomere
- 13/03/07 erpicatura con erpice rotante
- 02/05/07 erpicatura con erpice rotante

Concimazione

- 10/05/07 concimazione presemina 0 – 100 – 100
- 18/05/07 semina interfila 50 cm densità 40 semi m²

Controllo flora infestante

- 12/06/07 fresatura interfila
- 29/07/07 Tuareg 1,2 l/ha + Harmony 7g/Ha

Controllo parassitario

- 02/08/07 trattamento contro ragno rosso Picker SC + Rufast e Irol

Raccolta

- Raccolta manuale (fine settembre)

3.2.2 Analisi effettuate nella prova di irrigazione:

- 1) Analisi HPLC degli Isoflavoni di soia,
- 2) Al fine di vagliare ulteriormente le caratteristiche agronomiche delle due varietà considerate sono stati effettuati dei rilievi sull'apparato radicale e nodulare
- 3) Estrazione e quantificazione degli ureidi totali dalla soia. E' stata eseguita la determinazione del livello di ureidi fogliari durante la fase del ciclo colturale, Determinazione del livello di ureidi nei noduli in una fase di massimo incremento della loro attività (fase R4). Lo scopo di tale analisi era monitorare il livello di fissazione azotata
- 4) Analisi degli apparati radicali determinazione della densità di lunghezza radicale e del diametro medio della radice in diversi orizzonti di terreno tramite l'utilizzo della tecnica del carotaggio associata alla tecnica dell'analisi d'immagine.

- 5) rilievo del numero medio dei noduli e dell'area della superficie equatoriale degli stessi mediante utilizzo di software di analisi d'immagine dopo prelievo di 10 piante campione per ciascuna parcella

3.2.2.1 Analisi HPLC degli Isoflavoni

La semente di soia proveniente dai campi sperimentali 2005 e 2006 è stata sottoposta ad analisi HPLC presso il laboratorio dell'ESA di Purpan (Toulouse- France) le analisi sono state eseguite con un detector UV vis. Indagando su tutte le lunghezze d'onda da 200 a 500 nM (Hubert J. et al., 2005).

La metodica per l'analisi del contenuto in isoflavoni si è svolta nelle seguenti fasi,

- a) preparazione del seme di soia
- b) estrazione in alcol etilico
- c) filtrazione degli estratti
- d) analisi HPLC

Preparazione del seme di soia

La fase di preparazione del seme ha comportato la determinazione del peso di 30 semi per ciascuno dei 420 campioni da analizzare e la determinazione della loro umidità mediante liofilizzazione.

I semi liofilizzati di ciascun campione sono stati poi sottoposti a shock termico mettendoli in stufa a 140° per 90 secondi.

Questo processo ha permesso il distacco della cuticola del seme dai cotiledoni.

Dello stesso. Una volta sottoposti a shock termico i semi di soia (30 per campione) sono stati lavorati in un mortaio di piccole dimensioni al fine di separare i cotiledoni dal germe.

Per ciascun campione è stata determinato poi il peso del germe e il peso dei cotiledoni.

Successivamente sia i germi che i cotiledoni hanno subito un processo di molitura con l'ausilio rispettivamente di un mortaio e di un mulino da laboratorio, la polvere ottenuta è stata conservata separatamente in provette di vetro.

Estrazione in alcol metilico

La polvere degli embrioni e dei cotiledoni (0,9 g circa) è stata sospesa in alcol metilico al 90% per due ore in tubi da 16 ml, le sospensioni sono state mantenute omogenee grazie all'utilizzo di un agitatore a rotazione. Una volta ottenuti gli estratti sono stati conservati in congelatore alla temperatura di $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Filtrazione degli estratti

Gli estratti ottenuti sono stati centrifugati a 10000 g e il supernatante filtrato a $0.2\text{ }\mu\text{m}$ mediante l'utilizzo di filtri a siringa.

L'estratto filtrato è stato poi raccolto in fiale di plexiglass e conservato in congelatore.

Analisi HPLC

L'analisi HPLC degli estratti è stata eseguita su $0.1\text{ }\mu\text{l}$ di campione a partire da campioni di $100\text{ }\mu\text{l}$ inseriti in un sistema di alimentazione ad autocampionatore.

Il sistema di separazione permetteva la separazione di tutti e 12 gli isoflavoni in tempi diversi compresi tra 2 e 12 minuti (Fig. 26).

Il gradiente di eluizione era un gradiente binario composto da metanolo e acetonitrile

- Limite massimo di pressione 300 bar
- Altezza di prelevamento dal fondo della cuvette 2 mm
- Temperatura forno 30 °C
- Step di lettura del sensore UV a sensibilità digitale :

- 1) 210-600 nm
- 2) 250-600 nm
- 3) 260-600 nm
- 4) 320-600 nm
- 5) 200-500 nm

Il sensore di tipo Dyode Array permetteva di individuare lo spettro caratteristico di ogni picco rilevato nel cromatogramma (figura 27)

La taratura del sistema è avvenuta mediante l'utilizzo di standard esterni per le principali forme di isoflavoni.

Sono stati quantificati tutte le forme stabili degli isoflavoni:

Genistina, Daidzina, Glicitina (forme glucosiliche) e le forme agluconiche (genisteina daidzeina e gliciteina) le forme acetili (derivanti solo da denaturazione termica) sono state rilevate ma erano presenti solo in tracce. Dalla somma delle concentrazioni di tutti questi tipi di molecole si è potuta calcolare la concentrazione totale di isoflavoni per ciascun campione analizzato.

La colonna utilizzata era di tipo CIL Cluzeau Turbo 2 a fase inversa, di 4 cm di lunghezza e 4.6 µm di diametro.

I cromatogrammi sono stati poi integrati mediante l'utilizzo di software dedicato (Fig. 26) e i dati convertiti in concentrazione di isoflavoni per mg di sostanza secca analizzata.

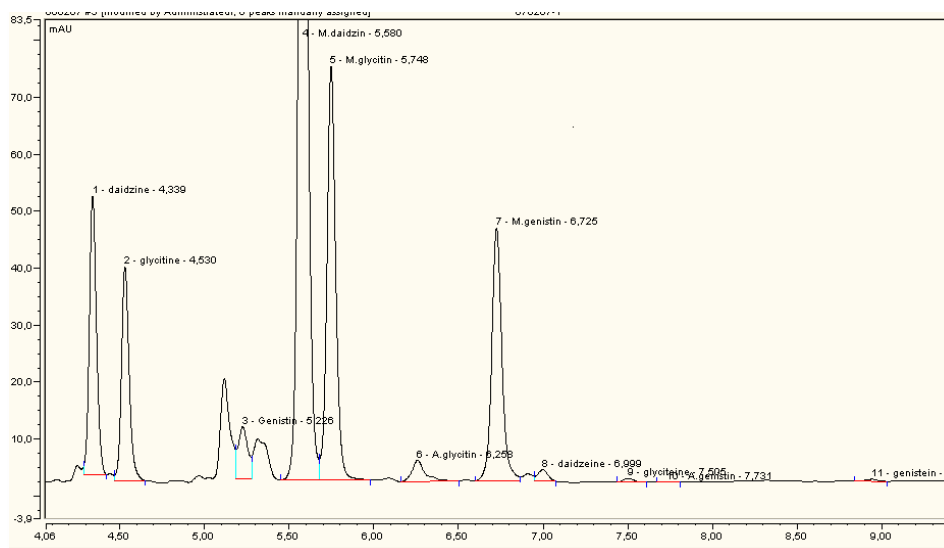


Figura 26. Esempio di cromatogramma: in ascissa il tempo, in ordinata mAu (milli Absorbance unit).

3.2.2.2 Estrazione e quantificazione degli ureidi totali dalla soia

Il protocollo utilizzato per l'estrazione delle ureidi è stato quello di (Herridge et al LC) è stato eseguito per le varietà Ales e Nikir un rilievo in fase R3-R4-R6-ed R7 e un rilievo in fase R4 per gli ureidi nei noduli.

Raccolta dei campioni:

- *Massa fogliare*: è stata prelevata la prima foglia completamente sviluppata del fusto (in prossimità dell'apice)

I campioni sono stati essiccati per 48 h a 60°C e macinati con un setaccio da 20 mesh.

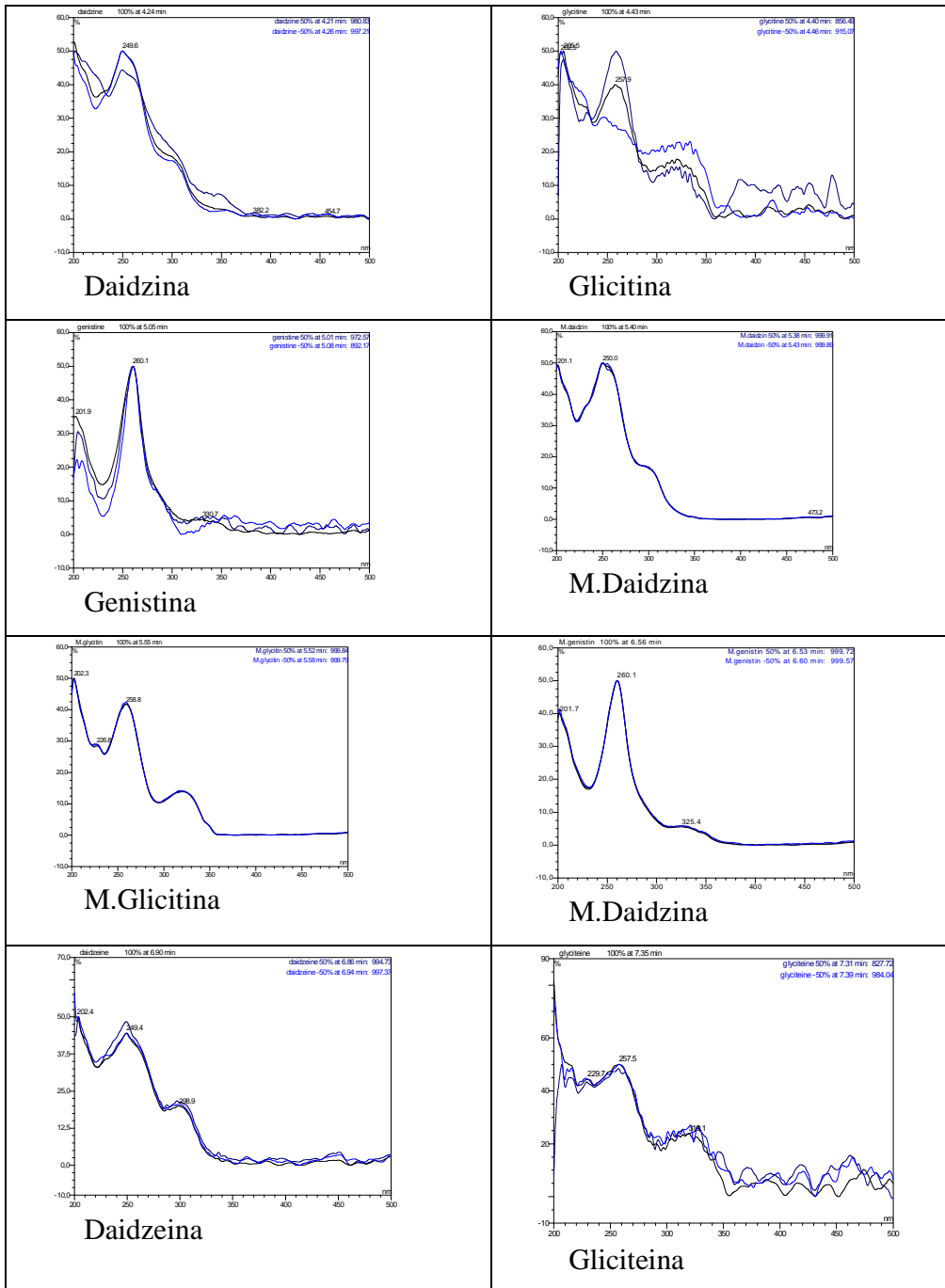


Figura 27. Spettri di assorbimento caratteristici di alcuni isoflavoni.

Estrazione:

- 1) Sono stati campionati 125 mg in un tubo da laboratorio.
- 2) Sono stati aggiunti 5 ml NaOH 0,2 N ed estrarre in acqua a 100 °C per 30 minuti (acqua bollente?)
- 3) i campioni estratti sono stati centrifugati a 10000 g per 5 minuti.
- 4) Sono stati trasferiti 1-1.25 ml dai tubi di estrazione ai tubi per centrifuga e si è scartato il resto del campione.
- 5) Si è pipettato il supernatante (1 ml) in nuovi microtubi da centrifuga poi stoccati a -10 °C prima della determinazione delle ureidi, è stato scartato il pellet.

Si è considerato un rapporto tessuto/NaOH di 25mg/ml

Determinazione delle ureidi (Herridge et al 1982)**Reagenti:**

<u>Amt./vol</u>	<u>Descrizione</u>
20 g/l	(1) 0.5 N NaOH (FW = 40g)
62 ml/l	(2) 0.75 N HCl (12.1 N)
0.165 g/50 ml	(3) 0.33% w/v fenil idrazina HCl (FW = 144.6). Prepararla giornalmente subito prima dell'analisi e coprire il contenitore con un foglio (foto sensibile).
0.835g/50ml	(4) 1.67% w/v ferrocyanide di potassio (FW = 329.2).
(5)	HCl concentrato, a -10 °C (mantenuto in ghiaccio).

Standards:

1 mM di soluzione stock d'acido allantoico (FW 214.2), 0,2142 g/l (o 0,0535 g/250 ml).

La diluizione per la curva di regressione è stata fatta nel modo seguente:

mM	ml stock/100 ml di Acqua distillata
-----	-----
0.005	0.5
0.01	1.0
0.05	5.0
0.1	10.0
0.2	20.0
0.3	30.0

Procedura:

Standard: 0,5 ml di standard + 100 µl di NaOH 0.2 N e arrivare a 1 ml aggiungendo acqua distillata

Campioni: 100 µl di campione + 900 µl di acqua distillata

Il volume campionato può differire da 100 µl. In accordo con la concentrazione di ureidi in funzione dell'assorbanza trovata con la curva di taratura.

Non superare mai i 200 µl di campione per non aver interferenze con la colorazione.

- (1) Aggiungere 200 µl 0.5 N NaOH.
- (2) Mettere in acqua bollente per 8 minuti.
- (3) Aggiungere 200 µl di HCl 0.7475 N.
- (4) Aggiungere 200 µl di HCl fenil idrazina 0.33%.
- (5) Agitare i tubi in un vortex, mettere gli stessi in un bagno d'acqua bollente.
- (6) Rimuovere i tubi dal bagno maria e immergere gli stessi in ghiaccio per 10 minuti.

- (7) Rimuovere i tubi dal bagno di ghiaccio e aggiungere 800 µl di HCl concentrato.
Mantenuto freddo in un bagno di ghiaccio.
- (8) Aggiungere 200 µl di ferrocianide di potassio.
- (9) Agitare i tubi in un vortex e aspettare per 15 minuti lo svilupparsi della colorazione.
- (10) Effettuare la lettura allo spettrofotometro a 520 nm entro 30 minuti.

Quantificazione della concentrazione di ureidi:

- (1) Calcolo delle moli di acido allantoico presenti nel tubo di test:
$$\mu\text{Mol/tt} = \text{mM std/l} \times 0,0005 \text{ l/tt} \times 1000 \mu\text{Mol/mMol}$$
- (2) Determinare la regressione lineare per la concentrazione d'ureidi dagli standards.
$$\text{Assorbanza} = a + b (\mu\text{Mol/tt})$$
- (3) Determinare per ogni campione estratto $\mu\text{mol/tt} = (\text{Assorbanza} - a)/b$.
- (4) determinare $\mu\text{Mol/tt Mol d'ureide}$ per ogni campione estratto:
$$\mu\text{Mol/campione iniziale} = (\mu\text{Mol/tt campione})/0,1.$$

Assumendo che per la determinazione siano stati usati 0,1 ml per 1 ml di campione estratto.
- (5) $\mu\text{Mol/gdw piccolo} = (\mu\text{Mol/campione iniziale})/\text{g piccolo per campione}$

I cromatogrammi sono stati poi integrati mediante l'utilizzo di software dedicato e i dati convertiti in concentrazione di isoflavoni per mg di sostanza secca analizzata.

Vengono riportati qui di seguito a titolo di esempio i dati risultanti dalle analisi effettuate sull'embrione e sul cotiledone dei campioni delle prove varietali del 2006, nella tabella sono presenti le 3 ripetizioni per ogni blocco e i due diversi tipi di coltivazione convenzionale (A), biologico (B).

3.2.2.3 Analisi degli apparati radicali

3.2.2.3.1 RILIEVI EFFETTUATI

Durante il ciclo colturale della soia sono stati effettuati dei campionamenti distruttivi su 10 piante in fase R5 (01/08/2006) per valutare le dimensioni e le caratteristiche morfologiche della massa nodulare. In data 14/09/2006 è stato effettuato un carotaggio dell'apparato radicale (fase R7).

3.2.2.3.2 CAROTAGGIO

Il prelievo delle carote di terreno è avvenuto in fase R₇ mediante l'uso di un martello pneumatico inserendo nel terreno un carotiere del diametro di 7 cm alla profondità di un metro (Fig. 28), in particolare è stata prelevata una carota per ciascuna parcella a circa metà dell'interfila tra la seconda e la terza fila.



Figura 28: Sonda completamente inserita nel terreno.



Figura 29.1: Estrazione della sonda dal terreno.

La carota è stata successivamente estratta usando un paranco (Fig. 29.1). La struttura della sonda è composta da un cilindro esterno con il bordo inferiore affilato in modo da penetrare il terreno e da un cilindro interno di alluminio, diviso in senso longitudinale in due parti uguali (Fig. 29.2).



Figura 29.2: Camicia di alluminio contenete una carota campione di terreno.

Questo secondo cilindro non è fissato con la parte restante del carotiere in modo tale che al momento dell'estrazione dal terreno si preleva facilmente permettendo un agevole accesso al campione di terreno. Il campione così ottenuto è stato poi suddiviso in dieci subcampioni lunghi 10 cm l'uno, e conservati in congelatore alla temperatura di -18 °C.

3.2.2.3.3 LAVAGGIO DEI CAMPIONI

La separazione delle radici dal terreno è stata svolta in un secondo momento tramite lavaggio. Per effettuare questa procedura è necessario scongelare i campioni precedentemente conservati in congelatore e successivamente trattarli con acido ossalico per diminuire l'alta adesività del terreno. Il lavaggio è stato poi eseguito con il metodo di "flottazione": si utilizza una centrifuga (Fig. 30) e si sfrutta l'energia cinetica dell'acqua contenente radici e terreno che, fatta circolare velocemente e

attraversare un setaccio, permette il passaggio delle particelle terrose e di trattenere le radici in sospensione. Le maglie dei setacci hanno un ruolo fondamentale, discriminando le radici dal terreno, in quanto se troppo larghe possono comportare una perdita anche consistente della frazione di radici. La dimensione suggerita in letteratura è di 0,50 mm² (Bohn, 1979).



Figura 30: Sistema centrifugo per il lavaggio delle radici.

Il contenuto del setaccio è poi riversato in una vaschetta che viene riempita con acqua (Fig. 32): in questo modo le impurità e le particelle di terreno che sono rimaste nel setaccio (Fig. 31) dopo il lavaggio si depositano sul fondo, mentre le radici galleggiano in superficie. Utilizzando un colino si riesce a prelevare facilmente le radici (Fig. 33) che vengono poi messe in vasetti di plastica da 25 ml utilizzando una

pinzetta (Fig. 34). I campioni risultanti vengono sigillati in questi contenitori che sono riempiti con una soluzione di etanolo in acqua distillata al 12% e quindi posti in una cella frigorifera fino al momento dell'acquisizione.



Fig. 31: Radici ed impurità



Figura 32 Setaccio e lavaggio.



Figura 33: Prelevamento delle radici



Figura 34: Vasetto con radici

3.2.2.3.4 ACQUISIZIONE DELLE RADICI

La seconda parte del lavoro è stata svolta in laboratorio ed è consistita nel sottoporre i campioni, precedentemente sigillati e conservati, ad una fotografia che ne evidenzia i parametri e ne permette una più veloce e rapida gestione.

Le radici vengono prelevate dal vasetto e adagate su un vassoio di plexiglass (20,5 x 30,7 cm) contenente un velo d'acqua (Figura 35).



Fig. 35: Le radici vengono disposte sul vassoio di osservazione

Devono essere sistemate in modo tale da evitare sovrapposizioni e contatti tra esse o con eventuali impurità, eventualmente aumentando il numero di scansioni per campione. Le radici così disposte e galleggianti vengono fotografate tramite uno scanner che permette l'acquisizione delle immagini (Fig. 36). Queste saranno elaborate da una macro che, abbinandole alla loro posizione (cioè alla profondità della carota di provenienza), le trasforma in dati numerici.



Figura 36: Radici pronte per essere acquisite dallo scanner

Per la scansione è stato utilizzato uno scanner modello HP Scanjet 4c, in grado di acquisire immagini con una risoluzione ottica di 600 dpi. Per rendere le immagini nitide si è dovuto ottimizzare i parametri tramite i quali lo scanner evidenzia i particolari e li salva in formato TIFF (Tagged Image Format File).

L'acquisizione delle immagini è stata fatta in bianco e nero tramite un contrasto di 250, corrispondente al massimo contrasto possibile, e una luminosità variabile da 163 a 173, a seconda del tipo di campione, in una scala da 0 a 250 (Fig. 37).

Per rendere poi le immagini meno faticose da leggere per l'occhio umano, nel caso si dovesse procedere ad una rassegna manuale, si è scelto di salvare il negativo dell'immagine acquisita (per le immagini in bianco e nero questa operazione consiste in una semplice inversione tra i pixel identificati con un tag di 1, ovvero bianco, e i pixel identificati con un tag di valore 0, cioè nero).

La risoluzione scelta per le immagini è stata di 375 DPI, e in fase di acquisizione hanno subito un ulteriore ingrandimento che le ha portate a 5 volte la dimensione originale (cioè un ingrandimento del 500%).

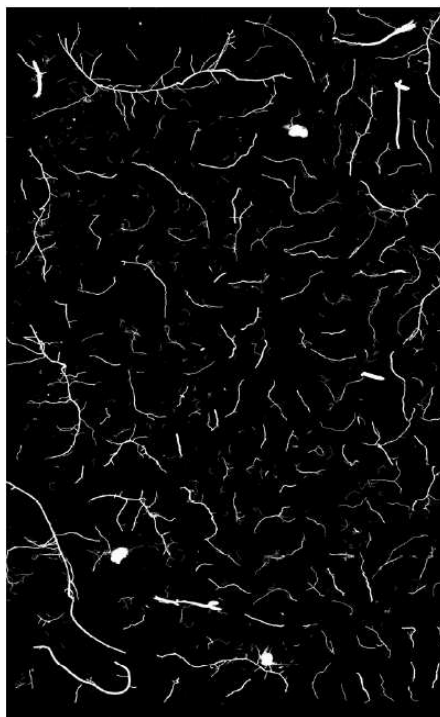


Figura 37: Immagine delle radici ottenuta con lo scanner.

Nell'acquisizione delle immagini un problema rilevante è la presenza di aloni ai margini del campo di acquisizione: sono causati da una non perfetta schermatura dello scanner dalla fuga di luce emessa dal sensore, che poi legge il riflesso di tale luce per digitalizzarlo. Per evitare questi difetti funzionali del sistema si riduce il campo di lettura in fase di

salvataggio per escludere i margini che presentano tale difetto. È inoltre importante posizionare le radici nel vassoio correttamente, evitando che siano in prossimità dei margini dove possono confondersi con gli aloni. Per ottenere un'immagine finale pulita ed evitare che il programma confonda eventuali aloni rimasti ai margini

dell'immagine con le radici, si effettua un ritocco manuale delle scansioni salvate.

Dopo questa operazione si procede all'elaborazione finale dei campioni.

Per l'elaborazione dei dati si è utilizzato il software di analisi di immagine KS 300 Rel. 3.0 (Karl Zeiss Vision Gbm, München-Germania).

Tale software, operando una macro (o funzione esterna) che lavorasse sulla sequenza di immagini acquisite, ha permesso di distinguere all'interno di esse gli oggetti che avessero i parametri tali da poter essere identificati come radici.

La discriminante scelta per distinguere le radici dalle impurità è l'EI (Indice di Allungamento), dato dal rapporto del perimetro al quadrato sull'area.

$$EI = \frac{\text{perimetro}^2}{\text{Area}}$$

L'EI in questa analisi ha assunto il valore di 75, grazie al quale è stato possibile ottenere un'ottima sensibilità di discriminazione, adatta a questo tipo di radice. Valori di EI maggiori indicano al programma di considerare l'oggetto esaminato come un'impurità, escludendolo pertanto da ulteriori elaborazioni. Impostato in questo modo EI, vengono elaborati come oggetti tutti quelli che hanno un'area maggiore di 4 pixel. L'operazione successiva consiste nel calcolo del Fiberlength, o lunghezza radicale, applicando una formula ottimizzata da Vamerli et al. (2003) che, in base all'area e al perimetro degli oggetti, consente di stimarne la lunghezza.

3.2.2.3.5 Determinazione della morfologia dei noduli

Dieci piante contigue per ciascuna parcella dello split-split plot in fase R5 sono state prelevate con il metodo del profilo di trincea. La profondità della trincea era di cm 30 come la sua larghezza.

Da ogni apparato radicale sono stati asportati i noduli che sono stati in seguito lavati e sistemati su uno schermo orizzontale di colore bianco in modo da evitare qualsiasi contatto fra loro.

Le immagini degli apparati nodulari sono state poi acquisite mediante fotocamera digitale (Canon EOS 350 8,1 Mpixel). Le fotografie digitali salvate in formato tiff sono state in seguito elaborate come precedentemente descritto per le radici.

Dalle elaborazioni si sono potute ottenere informazioni relative al numero e alla dimensione dei noduli più precisamente: -

- Perimetro
- Area della sezione mediana
- Asse maggiore ed asse minore
- Numero

3.2.2.4 Intensità di colorazione dell'ilo

20 semi (seme acquistato per la semina) per ciascuna varietà sono stati fotografati con il metodo descritto sopra per l'acquisizione delle immagini dei noduli.

Le foto sono state scattate sotto condizioni di illuminazione standard (lampada al

Neon) La zona dell'ilo è stata poi valutata per l'intensità del grigio con una scala di 250 sfumature, il software ha permesso di contare il numero di pixel attribuibili a ciascuna intensità di grigio. A ciascun ilo è stato attribuito un valore medio, la media di 20 colorazioni di ilo è stata

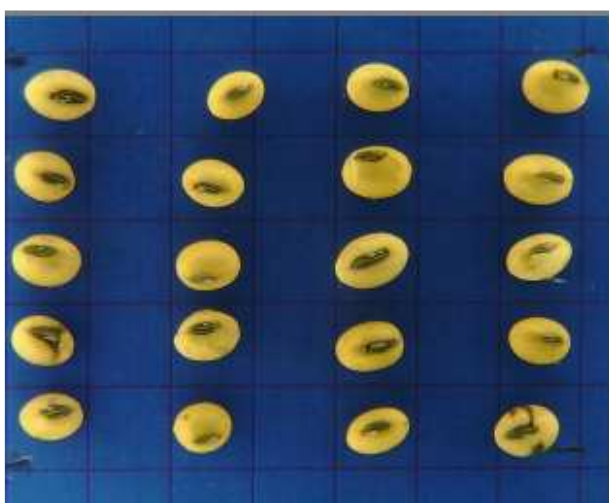


Fig 38. acquisizione digitale della colorazione dell'ilo

considerata come l'intensità di colorazione della varietà.

3.2.3 Coltivazione in terreni diversi

La varietà Nikir è stata coltivata in cassoni lisimetrici di forma quadrata con un lato di 2 m e profondità di 1,50 m. Ciascuno dei quattro lisimetri conteneva un tipo diverso di terreno (Fig. 20): sabbioso, medio impasto, torboso, argilloso

Le piante hanno ricevuto 5 irrigazioni complessive, per un totale di 150 mm. Il seme prodotto da ciascun lisimetro è stato poi raccolto ed è stata determinata la concentrazione di isoflavoni sia per l'embrione che per il cotiledone. Le analisi chimiche sul terreno dei lisimetri hanno mostrato le caratteristiche di tabella 12

	U.M.	Sabbioso	Medio impasto	Torboso	argilloso
ph		8,11	8,15	7,91	8,09
sostanze organica	g/100g	0,64	1,77	3,6	2,42
azoto totale	g/100g	0,03	0,11	0,19	0,15
rapporto C/N		12,07	9,72	10,9	9,41
Fosforo assimilabile	mg/Kg	6,01	8,46	22,16	30,03
Fosforo totale	g/Kg	0,35	0,81	1,39	0,98
Potassio scambiabile	mg/Kg	26,49	59,86	107,95	88,31
Magnesio scambiabile	mg/Kg	51,17	247,08	460,39	382,49
calcio scambiabile	mg/Kg	9,16	2619,42	6659,8	3832,9
sodio scambiabile	mg/Kg	5,62	26,11	36,51	29,64
C.S.C. calcolata	meq	5,1	15,4	37,5	22,6
zolfo da solfati	mg/Kg	1,67	4,08	4,96	4,44

Tabella 12. analisi chimica per i 4 terreni oggetto di valutazione



Figura 39. Varietà Nikir coltivata in 4 terreni diversi.

Analisi statistica

. Con l'analisi statistica dei dati si è valutato un effetto grezzo che unifica la variabilità del fattore località e del fattore metodo di coltivazione. Le varianze dei dati relative ai due ambienti di coltivazione e ai due anni non sono state significativamente differenti. Il metodo statistico utilizzato è stato l'analisi della varianza.

Nei due ambienti di Legnaro e Pozzoveggiani. I parametri di piovosità mensile e temperatura media non hanno evidenziato differenze significative nel corso del 2005 e 2006.

4 Risultati e discussione

Dalle analisi effettuate nel campo varietale è stato possibile effettuare uno screening della produzione di isoflavoni per le forme molecolari più e rappresentative.

4.1 EMBRIONE VARIAZIONI DI COMPOSIZIONE

4.1.2 Forme glucosiliche

Nei campi sperimentali 2005 le varietà coltivate in condizioni convenzionali hanno concentrato più genistina (+7% convenzionale vs biologico, $P=0,04$), il livello di Daidzina è risultato invece invariato nei due ambienti. Come per la Glicitina.

Dai dati sperimentali del 2006 si è visto che l'ambiente di coltivazione convenzionale ha favorito concentrazioni più elevate di genistina(+13% convenzionale vs biologico, $P=0,0074$), e concentrazioni più elevate di daidzina (+6% convenzionale vs biologico, $P=0,0069$).

Glicitina + 4% nel convenzionale (+4% convenzionale vs biologico, $P=0,05$)

4.1.3 Forme maloniliche

I dati del 2005 non hanno mostrato differenze nella concentrazione di malonil genistina e di malonil daidzina nei due ambienti di coltivazione, la *malonil glicitina* per contro è stata prodotta con concentrazioni leggermente più elevate nell'ambiente convenzionale rispetto al biologico (+4% $P=0,0385$)

Tabella 13. differenze percentuali nella concentrazione delle diverse forme di isoflavoni nell’embrione convenzionale vs biologico nel 2005 e 2006 media di tutte le varietà

Embrione	2005 conv.	2005 bio	2006 conv.	2006 bio
Genistina	+ 7%	-	+13	-
Daidzina	-	-	+6%	-
Glicitina	-	-	+4%	-
Malonilgenistina	-	-	-	6%
Malonildaizina	-	-	+4%	-
Malonilglicitina	+4%	-	-	-
Acetilgenistina		+33%	+10%	
Genisteina	55%		-	-
Daidzeina	43%		-	-
Gliciteina	50%		-	-
Totale	4%		-	-

Anche i dati del 2006 non hanno mostrato differenze di concentrazione fra i due ambienti di coltivazione per quanto riguarda la malonil genistina e la malonil daidzina,

4.1.4 Forme Agluconiche

Il convenzionale nel 2005 è risultato più ricco di forme Agluconiche rispetto al biologico (Tab 14)

Forma Agluconica	Incremento di concentrazione da biologico a convenzionale	2005 conv. Vs biologico
Acetilgenistina	0,00063 mg/g	+84%
Genisteina	0,044 mg/g	+55%
Daidzeina	0,12 mg/g	+43%
Gliciteina	0,11 mg/g	+50%

Tabella 14 concentrazione di forme agluconiche nel cotiledone

Nel 2006 non si sono riscontrate nell’embrione differenze di concentrazione nelle forme agluconiche nei due ambienti di coltivazione.

4.1.5 Isoflavoni totali

Nel 2005 la prova varietale coltivata con metodo convenzionale ha prodotto più isoflavoni totali, rispetto a quella coltivata con metodo biologico (+4%) nel 2006 non ci sono state differenze tra i due tipi di coltivazione.

4.2 COTILEDONE VARIAZIONI DI COMPOSIZIONE

4.2.1 Forme glucosiliche

Si nota nel convenzionale del 2005 un incremento rispettivamente del 16% e del 10%, della concentrazione di genistina e della daidzina rispetto al biologico dello stesso anno,

Nel 2006 non ci sono state differenze nelle concentrazioni di forme glucosiliche tra convenzionale e

Biologico

4.2.2 Forme maloniliche

Si nota nel 2005 un incremento rispettivamente del 9% e del 7% di malonilgenistina e malonildaidzina, (convenzionale vs biologico) e nel 2006 una diminuzione di malonil genistina

4.2.3 Forme agluconiche

Si nota nel 2005 un incremento della genisteina (+52% convenzionale Vs Biologico) e un incremento della daidzeina (+41% convenzionale vs biologico) le quantità di

Cotiledone	2005 conv.	2005 bio	2006 conv.	2006 bio
Genistina	+16% ***	-	-	-ns
Daidzina	+10%***	-	-	-ns
Malonilgenistina	+9%***	-	-	+7%**

Malonildaidzina	+7%***	-	-	-ns
Genisteina	+52%***	-	+31%**	-
Daidzeina	+41%***	-	-	-ns
Totale	+11%***	-	-	+5%*

Tabella 15. differenze percentuali nella concentrazione delle diverse forme di isoflavoni nel cotiledone convenzionale vs biologico nel 2005 e 2006 media di tutte le varietà

questi isoflavoni sono comunque minoritarie rispetto ad altre forme come le forme glucosiliche e le malonilche, complessivamente, nel 2006 non si nota nessuna differenza tra i due tipi di coltivazione

4.3 SINTESI SULLA VARIAZIONE DI COMPOSIZIONE

L'anno di maggiore produzione di isoflavoni totali (2005) è risultato associato ad un aumento generale della concentrazione di genistina (forma equivalente) nel cotiledone e ad una diminuzione di daidzina rispetto al 2006

Nell'embrione nel 2005 si è riscontrato una forte diminuzione della percentuale di daidzina e un lieve incremento di genistina e glicitina che però non ha compensato la diminuzione della daidzina

Complessivamente la concentrazione di isoflavoni nell'embrione nel 2005 è stata più bassa rispetto al 2006.

Se si confrontano invece nei due anni la coltivazione biologica con quella convenzionale si nota un leggero aumento della concentrazione di genistina equivalente nel cotiledone l'embrione non presenta variazioni significative di composizione tra convenzionale e biologico.

Confrontando ancora il 2005 con il 2006 si può dire ancora che

Concentrazioni di isoflavoni più elevate nel cotiledone nel 2005 hanno comportato una leggera diminuzione di concentrazione di isoflavoni nell'embrione

4.4 COMPOSIZIONE NELLE SINGOLE VARIETÀ

Per la composizione in isoflavoni delle varietà sono stati presi in considerazione i dati del 2006. La ragione di questa scelta è motivata dal fatto che il 2006 è stato un anno esente

da grandinate e in cui l'effetto ambientale non è stato particolarmente favorevole alla produzione di isoflavoni, il fattore varietà può dunque essere studiato con più precisione.

Per questo tipo di analisi si sono considerate “percentuali equivalenti”, tutte le forme di isoflavoni con la stessa radice agluconica sono state ricondotte ad una unica forma di riferimento. Le forme di riferimento considerate sono state Genistina e Daidzina per il cotiledone

Il fattore varietà è risultato significativo ($P=0,00001$) assieme al fattore ambiente di coltivazione ($P=0,0004$) anche l'interazione fra i due fattori è risultata significativa $P=0,045$

Alcune varietà contengono una più elevata percentuale di genistina nel cotiledone (forma equivalente) gli isoflavoni appartenenti al gruppo della genistina hanno una biodisponibilità inferiore agli altri tipi di isoflavoni ad esempio daidzina (Whang HJ et al L.C.). Aires, Ales, Hilario, Fiume, Denny, Destra sponsor e zen sono varietà a bassa concentrazione di Genistina nel cotiledone e dunque con una buona qualità di isoflavoni (Fig 40) Atlantic, B92, Dekabig, Fukui, Magnum, Nikko, Pacific, Shama sono varietà che si distinguono l'elevato tenore in genistina e quindi con isoflavoni meno biodisponibili.

Altre varietà come Giulietta, Regir, Sekoia, M10, Sakai Brillante, Sarema, Askasubi contengono un livello di genistina intermedio rispetto ai due gruppi precedentemente descritti. La classificazione delle varietà in base al contenuto di genistina è un indice importante che descrive la qualità del contenuto di isoflavoni.

Medie con il 95% significatività P=0,00001

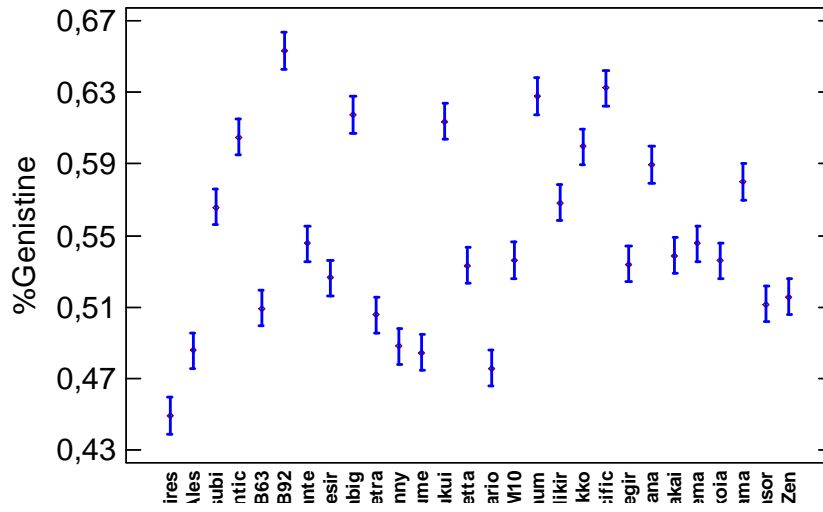


Figura 40. tenore in genistina equivalente nel cotiledone anno 2006

fonti variabilità	Somma quadr.	gl	media	F	P
Effetti principali					
A:varietà	0,460	27	0,0170	60,60	0,00001
B.ambiente colt.	0,004	1	0,0041	2,65	0,2
errore	0,031	112	0,0002		
TOTALE	0,507	167			

Tabella 16 analisi della varianza per la % di genistina equivalente nel cotiledone

varietà	%genistina	Gruppi omogeneità
Aires	0,4757	a
Hilario	0,4843	b
Fiume	0,4856	b
Ales	0,4880	bc
Denny	0,5054	bc
Demetra	0,5092	cd
B63	0,5115	de
Sponsor	0,5156	de
Zen	0,5261	def
Cresir	0,5331	ghi
Giulietta	0,5339	hi
Regir	0,5357	hi
Sekoia	0,5360	hi
M10	0,5386	i
Sakai	0,5453	i
Sarema	0,5454	i
Brillante	0,5657	i
Askasubi	0,5682	l
Nikir	0,5800	l
Shama	0,5895	mn
Safrana	0,5997	no
Nikko	0,6048	nop
Atlantic	0,6139	op
Fukui	0,6176	pq
Dekabig	0,6278	pq
Magnum	0,6324	q
Pacific	0,6533	q

Tabella 17 % genistina equivalentenell’embrione

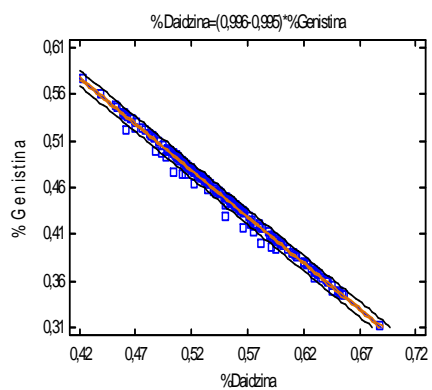


Figura 41 correlazione tra la % di genistina e daidzina.

La sintesi della genistina equivalente (somma delle concentrazioni degli isoflavoni con radicale agluconiè nella pianta inversamente proporzionale alla sintesi di daidzina (isoflavone più biodisponibile) a causa di una competitività nella linea metabolica. Dai dati sperimentali si è potuta osservare questa caratteristica descritta in letteratura. (Berger M. et al 2002) (Fig. 41).le varietà sono state analizzate anche per quanto riguarda la composizione di isoflavoni nell’embrione decotiledonato, anche in questo caso i fattori varietà e ambiente di coltivazione sono risultati molto significativi, l’interazione con l’ambiente non è risultata invece significativa per l’embrione. E’ stato possibile valutare le varietà più ricche di genistina equivalente e quelle con contenuto più basso di questo isoflavone. complessivamente è stato possibile eseguire una mappa delle varietà a più elevata percentuale di genistina (Fig. 42)

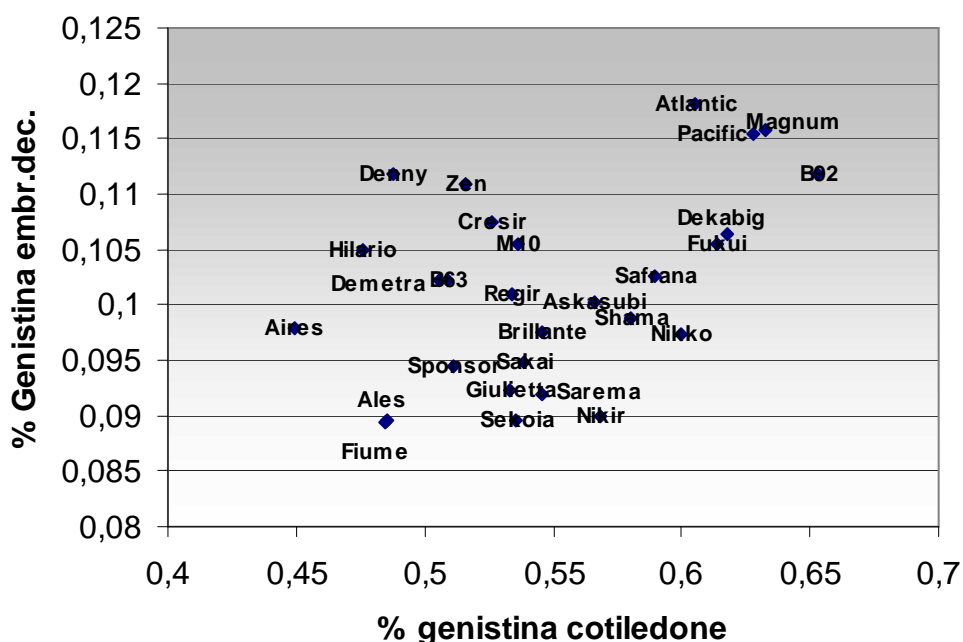


Figura 42. mappa varietale per il contenuto % di genistina equivalente

Sono state messe in evidenza anche alcune varietà ad elevata concentrazione di glicitina (forma equivalente) nell’embrione. Questo tipo di isoflavone è particolarmente interessante dal punto di vista scientifico in quanto gli enzimi appartenenti alla sua via metabolica non sono stati ancora tutti identificati. Le varietà ad elevato contenuto di glicitina possono essere dunque prese in considerazione in studi di ingegneria molecolare.(Fig. 44.1) Ales cresir Fiume Nikir e Sakai sono le varietà a più alto contenuto di glicitina equivalente.

L'effetto varietà e l'effetto ambiente di coltivazione sono risultati molto significativi per la glicitina l'interazione con l'ambiente è stata molto significativa. (Tab. 20) le varietà ad elevato contenuto di glicitina sono: Aires, Cresir, Fiume, Nikko e Sakai

La concentrazione di glicitina risulta correlata negativamente con il contenuto di daidzina in quanto le due molecole sono generate dallo stesso "bivio metabolico".

fonti variabilità	Somma quadr.	gl	media	F	P
fonti variabilità					
Effetti principali	1,13008	27	0,0418	724,39	0,00001
A:varietà	0,00025	1	0,0002	4,46	0,0369
B.ambiente colt.					
interazioni	0,0047	27	0,0001	3,05	0,0000
AB	0,0064	112	0,00005		
errore	1,1415	167			

Tabella 20 Analisi della varianza per il contenuto in glicitina

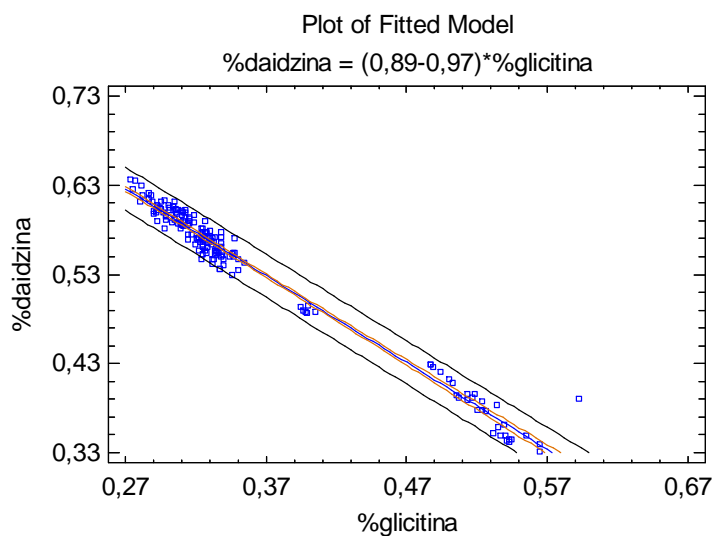


Figura 43 Regressione tra la % di glicitina e la % di daidzina

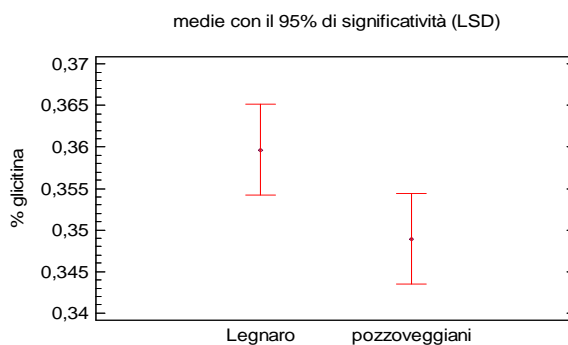


Figura 44.2 % glicitina nei due ambienti di coltivazione

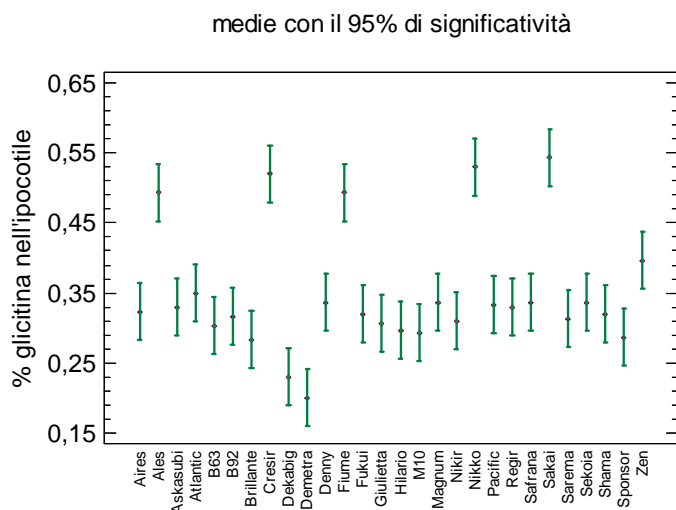


Figura 44.1 percentuali diglicitina nell'ipocotile (embrione)

4.5 ISOFLAVONI TOTALI

Sommando la concentrazione di tutte le molecole il convenzionale nel 2005 ha prodotto l'11% in più rispetto al biologico.(Tab. 25)

Per contro nel 2006 si ha avuto, una produzione totale di isoflavoni maggiore del 5% nella coltivazione biologica (biologico vs convenzionale).

Vengono così confermati i dati di bibliografia (Daydé, Berger 1996) che indicano una relazione inversa tra attività di concentrazione degli isoflavoni nel seme e temperatura e una relazione diretta tra concentrazione di isoflavoni e disponibilità idrica nel periodo R6-maturazione. Complessivamente le prove condotte in condizioni convenzionali hanno concentrato più isoflavoni nel cotiledone rispetto alle prove condotte in agricoltura biologica (+7%). Fig(44.3)

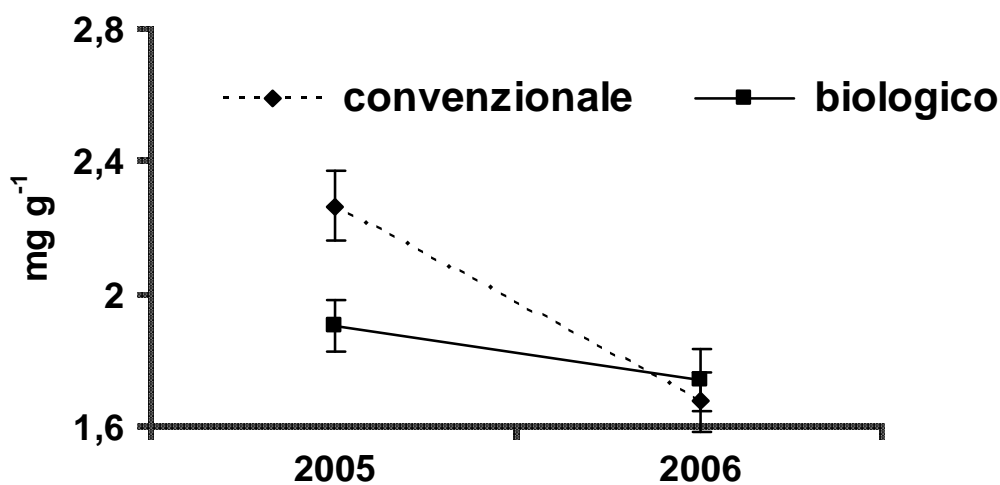


Figura 44.3 Produzione di isoflavoni totali nel cotiledone

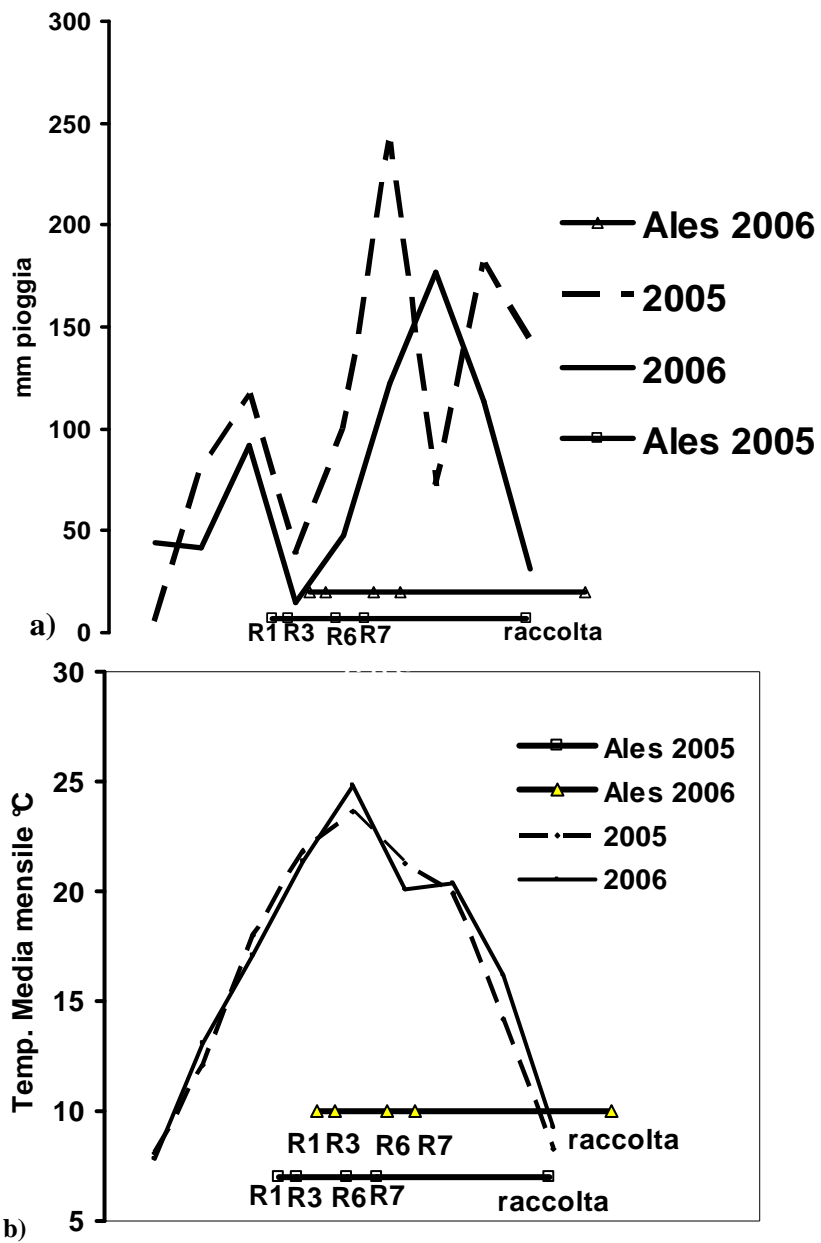


Figura 44.4 Andamento delle precipitazioni (a) e della temperatura (b) nel 2005 e 2006
 le fasi fenologiche sulla linea più bassa sono riferite al 2005 sulla linea più alta il 2006

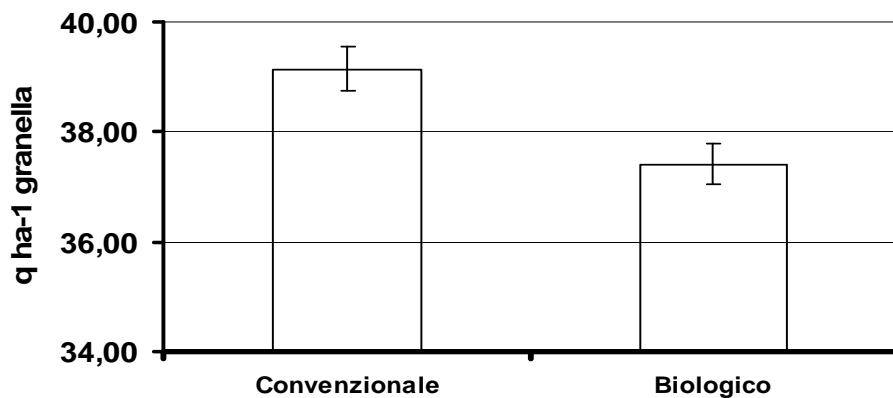


Figura 44.5 Rese medie periodo 2005 2006

Analizzando complessivamente i dati nelle due annate 2005 e 2006 si è potuto constatare come il 2005 sia stato un anno più favorevole all'accumulo degli isoflavoni, rispetto al 2006 (+16% 2005 vs 2006 tabella). Il 2005 si è distinto dal 2006 per una maggiore intensità delle precipitazioni nel periodo R1-R7 (250 mm in più nel 2005 rispetto al 2006) e per la presenza di 4 grandinate che hanno comportato ingenti danni meccanici alla coltura, inoltre nel 2006 la temperatura media nel periodo R1-R7 è stata di 0,5°C inferiore rispetto al 2006 (Fig 44.4).

le piante coltivate nei due ambienti di coltivazione hanno mostrato rese areiche mediamente più elevate a Legnaro rispetto a Pozzoveggiani fig. 44.5

Le analisi della composizione in isoflavoni hanno mostrato che in assenza di stress di tipo meccanico e in condizioni di temperatura e precipitazioni meno favorevoli (anno 2006) la molecola con cui la pianta risponde prima ad un eventuale stimolo positivo (irrigazione di soccorso) è la genistina con le sue diverse forme derivate:

Nel 2006 la soia coltivata in condizioni biologiche ha sofferto un breve periodo di stress idrico in fase R5, si è ricorsi ad una irrigazione di soccorso di 30 mm questo fattore sembra sia bastato ad incrementare la produzione di isoflavoni totali nel biologico di circa il 5% l'aumento è relativo esclusivamente alla malonilgenistina

Quando invece le condizioni a favore della sintesi di isoflavoni sono più ampie (maggiore disponibilità idrica, temperature più basse, stress di tipo meccanico) come nell'anno 2005 l'incremento della sintesi di isoflavoni riguarda più classi di molecole

I danni meccanici sembrano essere associati ad una maggiore concentrazione di forme agluconiche, le forme agluconiche sono le forme biologicamente più attive, con maggiore funzione antiossidante e fungistatiche.

Si è ottenuto dall'analisi statistica delle varietà considerate un coefficiente di variabilità > 27%, sono state individuate varietà a bassa concentrazione di isoflavoni sia nel cotiledone che nell'embrione e varietà ad elevata concentrazione in entrambe le strutture. Le varietà a bassa concentrazione sono più vocate per la produzione di alimenti per l'infanzia le varietà ad alta concentrazione sono invece meglio utilizzabili per la produzione di prodotti nutraceutici ad elevata concentrazione di isoflavoni. (Fig. 45)

Si è riscontrato inoltre come la quantità di Isoflavoni concentrata nel cotiledone sia molto più elevata della quantità rilevabile nel cotiledone ma essendo la massa del cotiledone migliore di circa 30 volte rispetto alla massa dell'embrione la quantità totale prodotta risulta maggiore nel cotiledone di circa 10 volte, il gruppo di maturazione non è risultato legato alla diversa propensione all'accumulo di isoflavoni.

La concentrazione di isoflavoni è stata determinata tramite analisi HPLC.

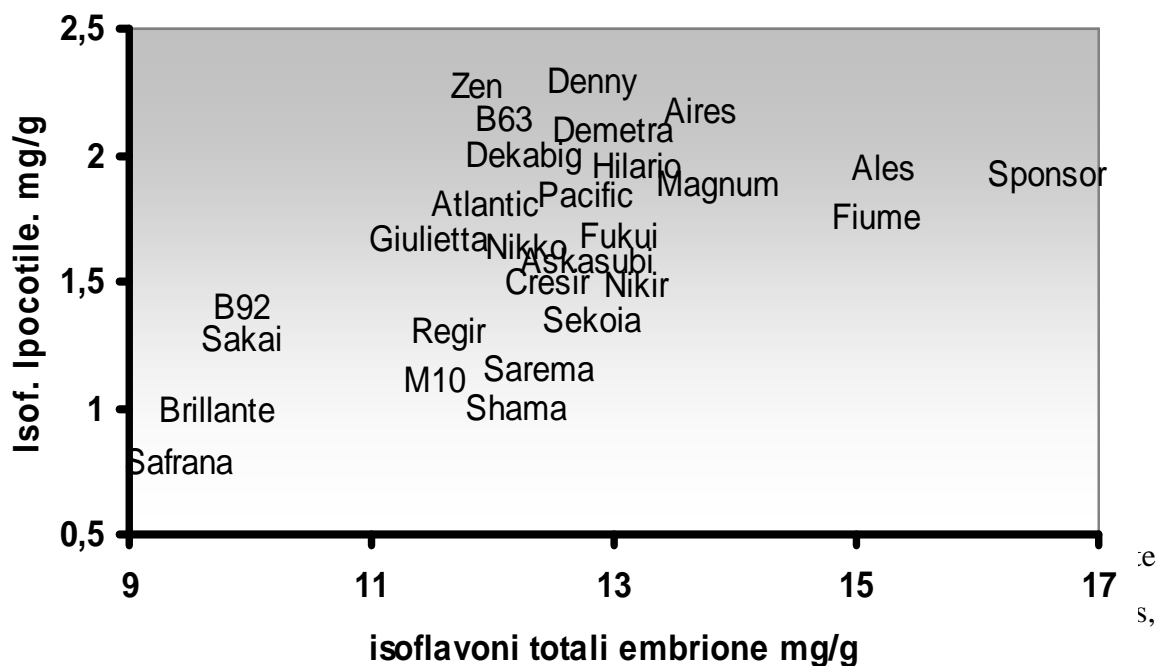


Figura 55 prod. I isoflavoni anno 2006

attitudine nutraceutica (produzione di isoflavoni). (Figura 45)

L'effetto del gruppo di maturazione nelle varietà prese in considerazione non è risultato significativo.

4.6 PROTEINA E ISOFLAVONI

Le varietà coltivate in condizione di agricoltura biologica hanno concentrato mediamente più proteina delle varietà coltivate in condizioni di agricoltura convenzionale (Fig. 46) mediamente +1,5% biologico vs convenzionale); La resa in proteina è risultata nei tre anni di sperimentazione migliore in coltivazione biologica una possibile spiegazione può essere cercata nella dotazione di sostanza organica del terreno di Pozzoveggiani che consentendo una migliore strutturazione favorisce una migliore aerazione dei noduli della pianta e quindi una più efficace nutrizione azotata. La resa proteica è stata mediamente

sempre elevata a Pozzoveggiani sia negli anni in cui ci sono stati stress (Estate 2006) sia in anni in cui la resa/ha è stata elevata (2005 e 2007).

Si visto che le varietà coltivate concentrano la proteina grezza con efficienza diversa in funzione del gruppo di maturazione, in entrambi gli ambienti di coltivazione il gruppo di maturazione 0+ è caratterizzato da rese in proteina grezza più elevate.

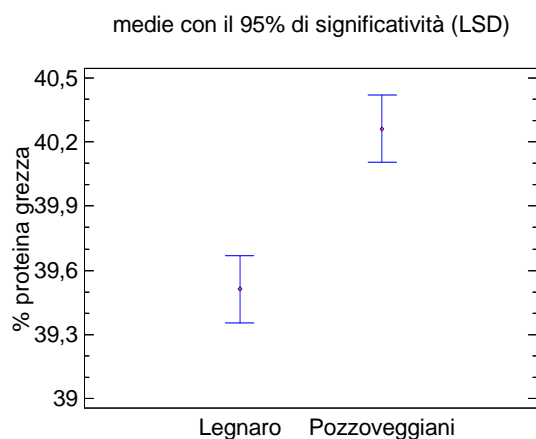


Figura 46. a pozzoveggiani sono state raggiunte rese in proteina superiori (medie 2005-2006)

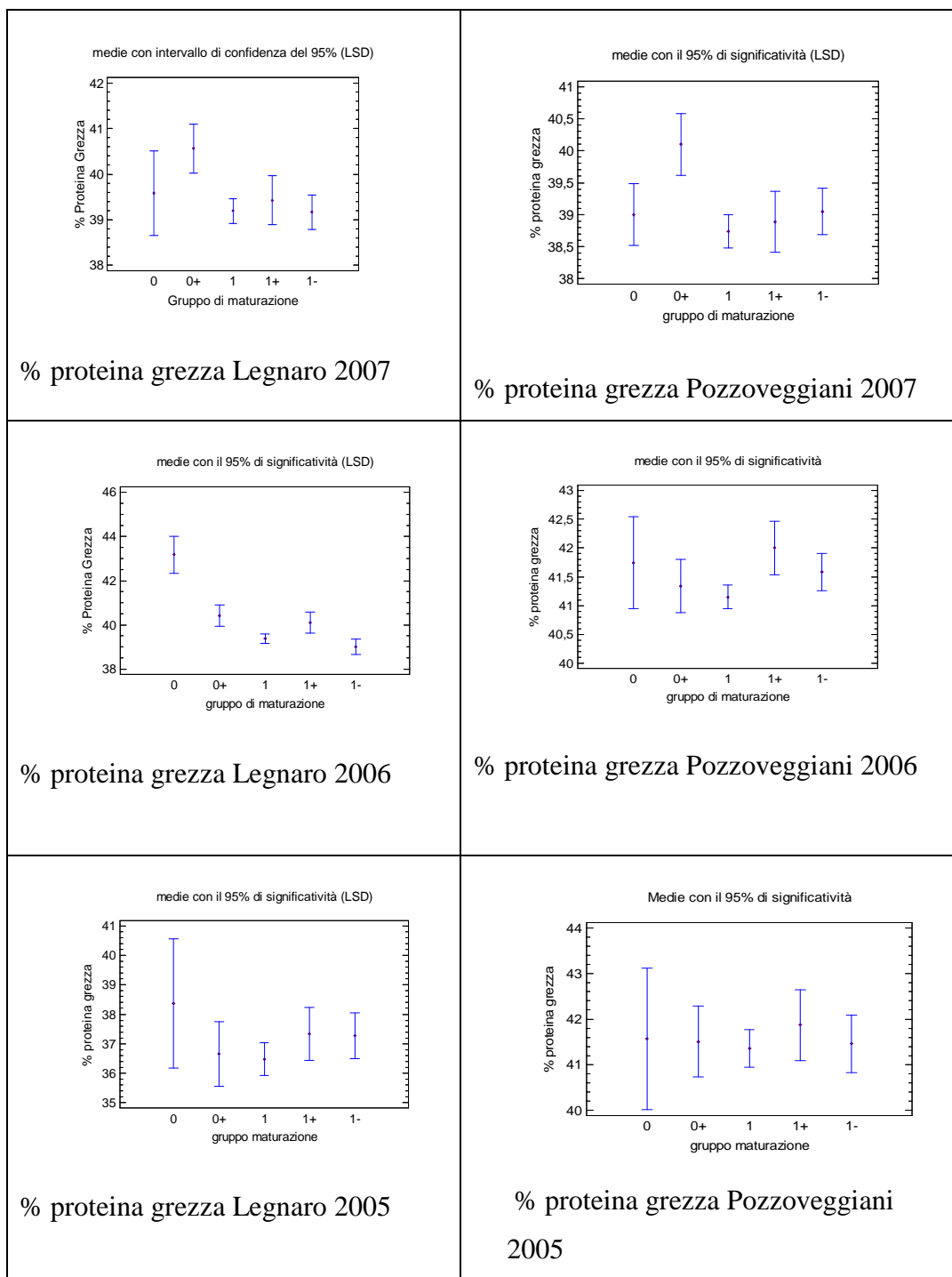


Figura 47. i gruppi di maturazione più produttivi sono stati quelli più tardivi con particolare riferimento alle varietà 1+ dati 2007

L'anno 2005 è stato caratterizzato da 4 forti grandinate che hanno defogliato quasi completamente la coltura nel periodo estivo, gli effetti delle grandinate sono stati particolarmente forti nella località Legnaro. In questo luogo si è avuta anche una parziale capitozzatura dei fusti. (Fig 47)

La prova a conduzione biologica nel 2006 ha sofferto di un breve periodo di stress idrico, il

<i>varietà</i>	<i>Media % P.G.</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Shama	41,9956	ab
B63	41,5589	bc
Sakai	41,5159	bcd
M10	41,4325	bcd
Safrana	41,3735	bcd
Nikko	41,1219	cde
Askasubi	41,1172	cde
Brillante	40,8536	cdef
Dekabig	40,8321	cdefg
Aires	40,8297	cdefg
Fukui	40,7545	defg
Giulietta	40,5622	efgh
Nikir	40,4357	efghi
Cresir	40,3716	efghi
Regir	40,1987	efghil
Sekoia	40,1518	efghil
Sponsor	40,1096	efghil
Atlantic	40,0636	efghil
Demetra	40,0339	ghil
Denny	39,866	hil
Hilario	39,7678	hilm
Magnum	39,7611	hilm
Zen	39,6854	ilmn
Pacific	39,6775	ilmn
B92	39,5084	lmn
Ales	38,9712	mn
Fiume	38,9042	n

Tabella 21. resa in P.G. anni 2006-2007

terreno di prova era terreno argilloso di riporto che ha perso velocemente la struttura creata con le lavorazioni

A meta luglio 2006 è stata necessaria una irrigazione di soccorso.

Lo stress colturale quando si è verificato ha omogeneizzato il comportamento dei vari gruppi di maturazione per quanto riguarda la resa in proteina.

Il biennio 2006-2007 è risultato tuttavia un periodo quasi privo di stress ambientali questi ultimi infatti quando si sono verificati sono stati di lieve entità.

Lo screening varietale per la produzione di proteina mediato negli anni 2006 e 2007 ha evidenziato la presenza di alcune varietà particolarmente produttive come Askasubi Giulietta, B63, Dekabig, M10, e Sakai queste varietà hanno avuto rese in proteina costantemente superiori al 40% e sono risultate essere poco influenzate dal metodo di coltivazione. Sakai, Shama, B63, M10 Safrana e Nikko si sono rivelate varietà molto produttive per la resa in proteina (>40%) e sensibili al metodo di coltivazione biologico (Tab. 21).

Queste ultime varietà si trovano infatti nella parte destra del grafico di fig. 48. sono varietà con una elevata interazione varietà*metodo di coltivazione*località. Alcune varietà come Indian, Cresir Sekoia e Sarema sono risultate atipiche rispetto ai risultati generali dell'esperienza, esse hanno tratto maggior beneficio dal metodo di conduzione convenzionale anche se hanno mostrato un basso livello di interazione con il metodo di coltivazione.

Le varietà Fiume, Ales, Regir e Pacific sono state quelle con resa proteica più modesta

pur evidenziando un buon incremento di resa in proteina grezza se coltivate con metodo biologico.

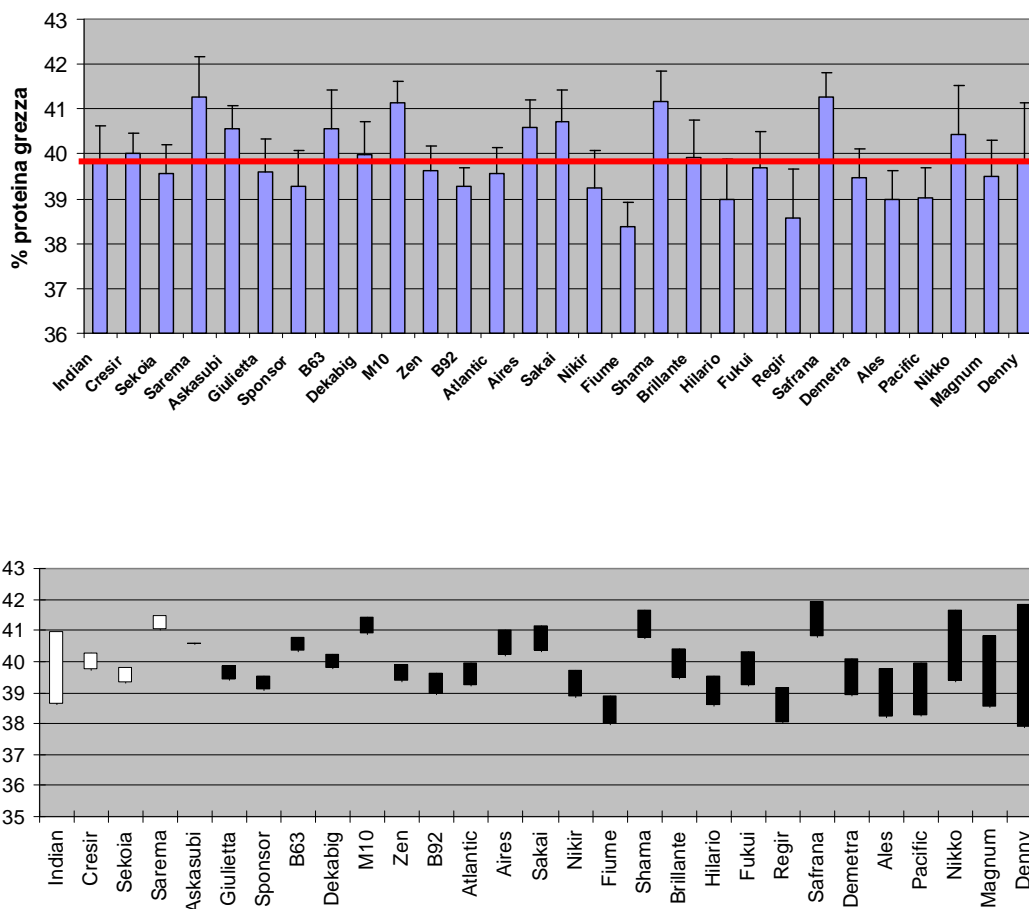
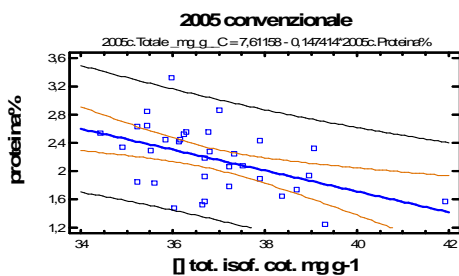
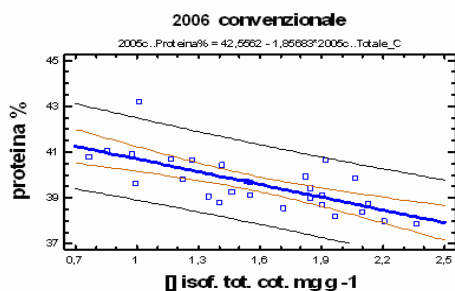


Figura 48 2006 resa in proteina negli anni 2006 e 2007, nel grafico in alto sono rappresentate le medie di % P.G. nel grafico in basso le differenze di %P.G. tra Biologico e convenzionale, le varietà sono ordinate Per differenza di resa proteica fra i due ambienti di coltivazione



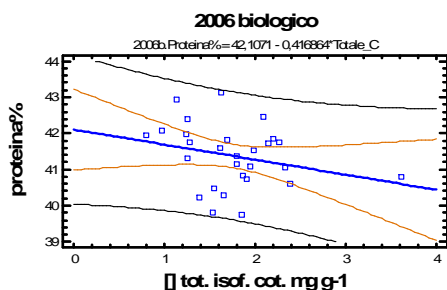
$$y = -1,5952x + 40,334$$

$$R^2 = 0,2352$$



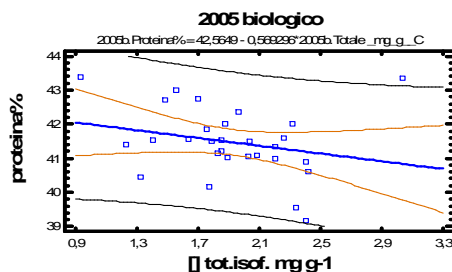
$$y = -1,8568x + 42,556$$

$$R^2 = 0,5007$$



$$y = -0,4169x + 42,107$$

$$R^2 = 0,0712$$



$$y = -0,5693x + 42,565$$

$$R^2 = 0,0606$$

Figura 49 correlazione tra \square di isoflavoni totali nel cotiledone e %P.G. del seme intero

La correlazione totale di Isoflavoni e resa proteica è risultata compresa tra il 7% ed il 50% in funzione del luogo e dell'anno di coltivazione (Fig. 49) i valori migliori di correlazione si sono ottenuti in condizione di coltivazione convenzionale in condizioni cioè in cui la resa proteica non ha raggiunto la sua massima espressione. E' verosimile che la correlazione tra queste due variabili aumenti solo quando la competizione per la

fenilalanina diventa critica. Se la pianta si trova in condizioni favorevoli alla produzione di proteina è verosimile che venga sintetizzata anche molta fenilalanina in questo modo la via degli isoflavoni e il processo di sintesi proteica non entrano in competizione.

La sintesi di composti strutturali utilizza anche la via dei fenilpropani, in una situazione in cui la pianta si trova in condizioni per cui la produzione di granella viene massimizzata essa destina una parte della sua energia (potere riducente) alla produzione di composti strutturali ad esempio Lignina. La quantità di fenilalanina potenzialmente disponibile per il processo di sintesi proteica e per la produzione di isoflavoni si riduce e il processo di sintesi degli isoflavoni potrebbe competere maggiormente con il processo di sintesi proteica.

4.7 EFFETTO DELL'IRRIGAZIONE

4.7 1 Produzione di isoflavoni totali

Dall'analisi statistica sono stati ottenuti risultati sempre altamente significativi: è stato riscontrato che Ales concentra più isoflavoni totali di Nikir, +23% e +27% rispettivamente sulle ramificazioni e sul fusto Ales vs Nikir, (Fig. 50). Le ramificazioni inoltre hanno prodotto seme con maggiori concentrazioni di isoflavoni, +27% in Ales ramificazioni vs fusto, +22% in Nikir rispettivamente ramificazioni vs fusto (Fig. 51).

L'irrigazione ha prodotto un effetto positivo sull'accumulo di isoflavoni, soprattutto sulle ramificazioni, +15% e +8,5% ramificazioni vs fusto, (Fig. 51). L'apporto di azoto tardivo ha comportato un abbassamento lieve del tenore in isoflavoni sia nel fusto principale che nel fusto laterale. Di circa il 5%. La molecola d'acqua è necessaria nella linea metabolica dell'acido scichimico (maffei) nella reazione di condensazione fra l'eritrosio-1-4-difosfato e il fosfoenolpiruvato per produrre il progenitore di uno dei due fenili necessari per formare una molecola di isoflavone. Un migliorato flusso floematico potrebbe inoltre trasportare dai noduli (in fase ormai di senescenza) una maggiore quantità di molecole di origine batterica prodotte solo con concentrazioni basse di azoto nel nodulo (espinosa e al) e in grado di stimolare la via biosintetica degli isoflavoni

Gli effetti di interazione maggiormente presenti fra le variabili allo studio sono quelli fra l'effetto dell'irrigazione e le ramificazioni

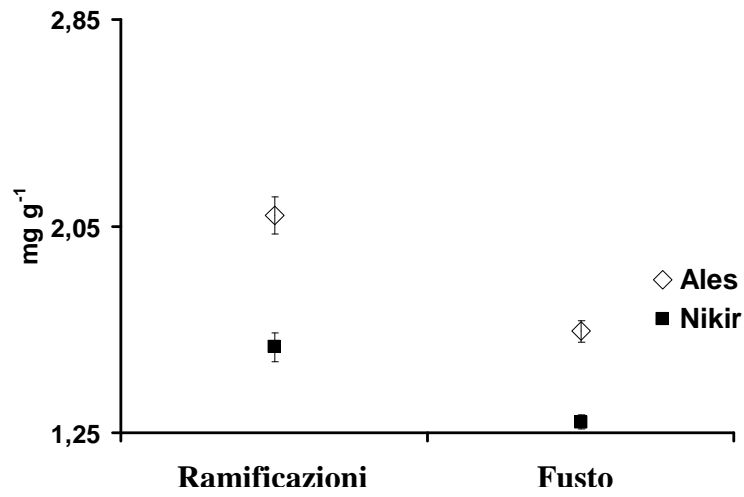


Figura 50 Ales e Nikir concentrazione di isoflavoni totali nel fusto e nelle ramificazioni

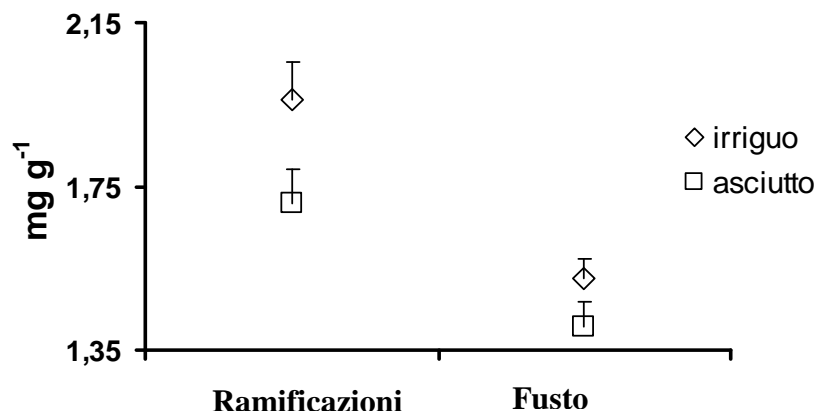


Figura. 51. effetto dell'irrigazione sulla [] isof. Totali nel cotiledone

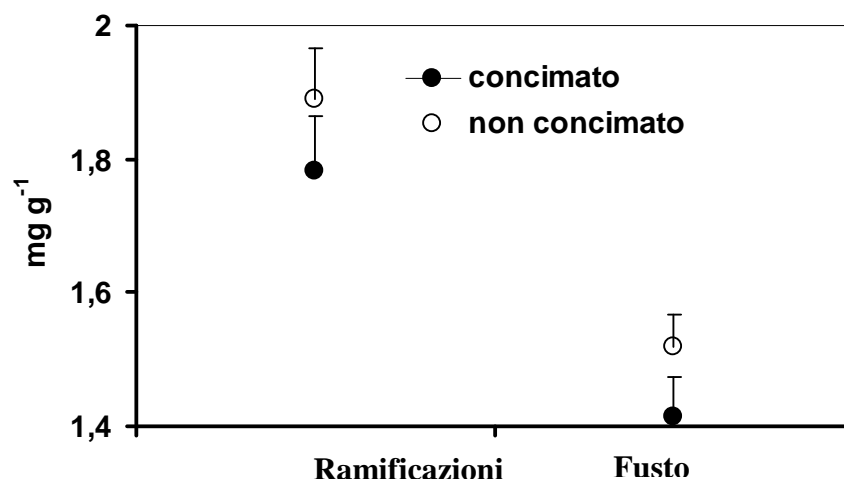


Figura 51.b. effetto della concimazione sulla [] isof. Totali nel cotiledone

l'effetto dell'irrigazione e della concimazione è rilevabile anche sulla composizione in isoflavoni dell'embrione e del cotiledone:

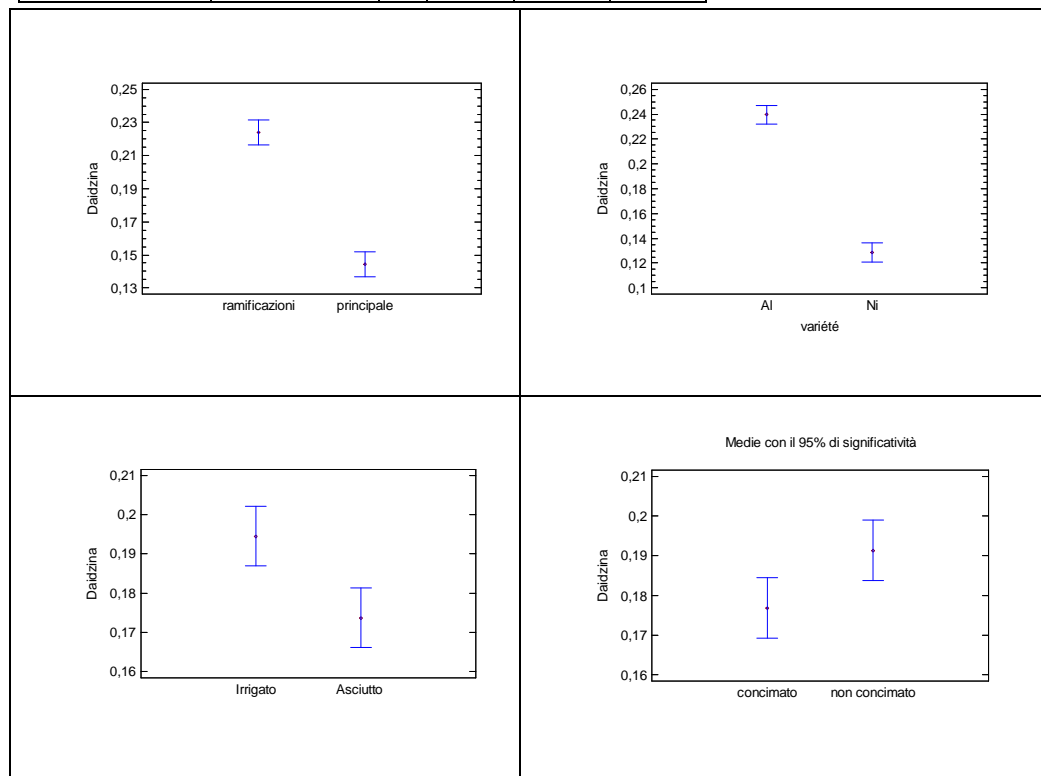
A livello cotiledonare si osserva che i fattori irrigazione e concimazione sono stati significativi nel far variare Anche le varie classi di isoflavoni. (composizione). Complessivamente le forme genistiche si sono mostrate più sensibili al fattore irrigazione mentre le forme daidziniche si sono mostrate sensibili sia al fattore concimazione che irrigazione.

Le molecole agluconiche si sono rivelate interessanti per discriminare le condizioni di irrigazione e concimazione, la daidzeina è infatti sensibile al fattore concimazione e non al fattore irrigazione, la genisteina è sensibile per contro solo al fattore irrigazione. La genisteina inoltre è variata in modo inverso rispetto a tutti gli altri tipi di isoflavoni, viene prodotta in concentrazioni maggiori in condizioni di stress.

Un'altra molecola interessante è stata la malonilgenisteina che è risultata variare solo in relazione al fattore irrigazione.

Cotiledone Daidzina

Fonti variabilità	Somma quadr.	gl		F	P
tra gruppi	0,3283	13	0,0252	27,47	0,00001
errore	0,0459	50	0,0009		
Totale	0,3743	63			

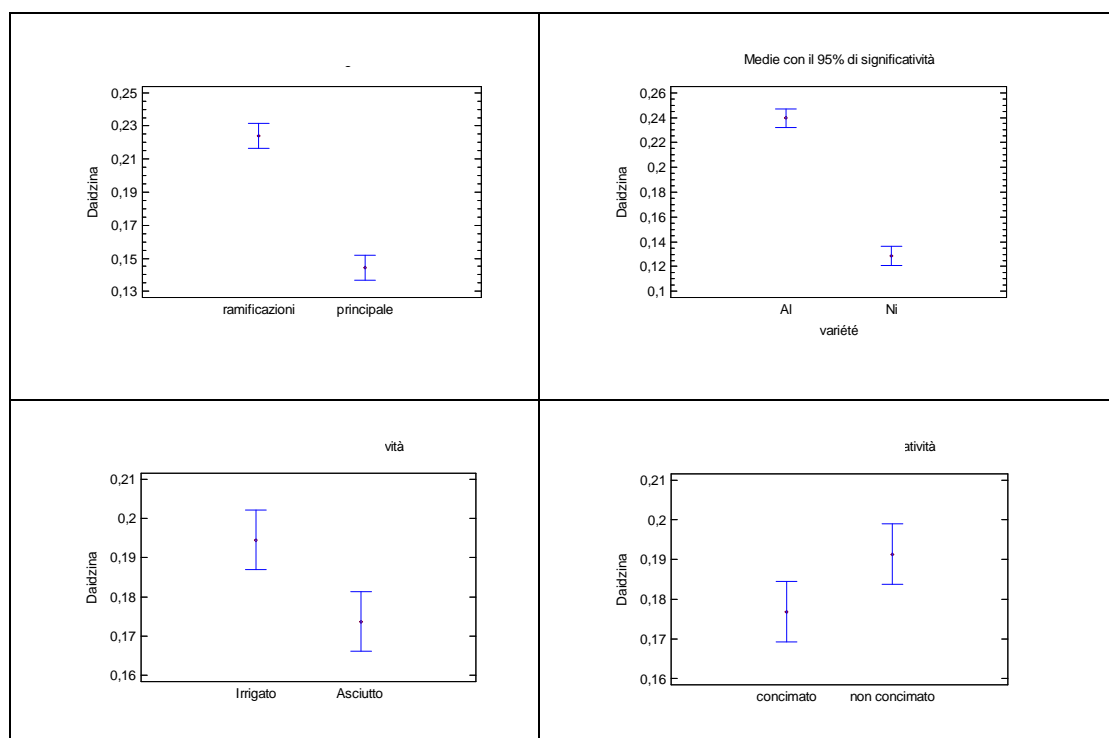


Fonti variabilità	Somma quadr.	gl	Media quadr.	F	P
fusto	0,1008	1	0,1008	109,61	0,0000
varietà	0,1969	1	0,1969	214,12	0,0000
irrigazione	0,0068	1	0,0068	7,49	0,0086
concimazione	0,0033	1	0,0033	3,66	0,0615
fusto*varietà	0,0122	1	0,0122	13,28	0,0006

Figura 52. risposta della daidzina nel cotiledone ad alcune variabili agronomiche: fusto, varietà, irr., conc. Sono stati mostrati solo i parametri significativi

Cotiledone M.Daidzina

Fonti variabilità	Fonti variab.	Somma quadr.	gl		F	P
tra gruppi	Model	1,4382	13	0,1106	22,99	0,0000
errore	Residual	0,2405	50	0,0048		
Total	Total (Corr.)	1,6788	63			

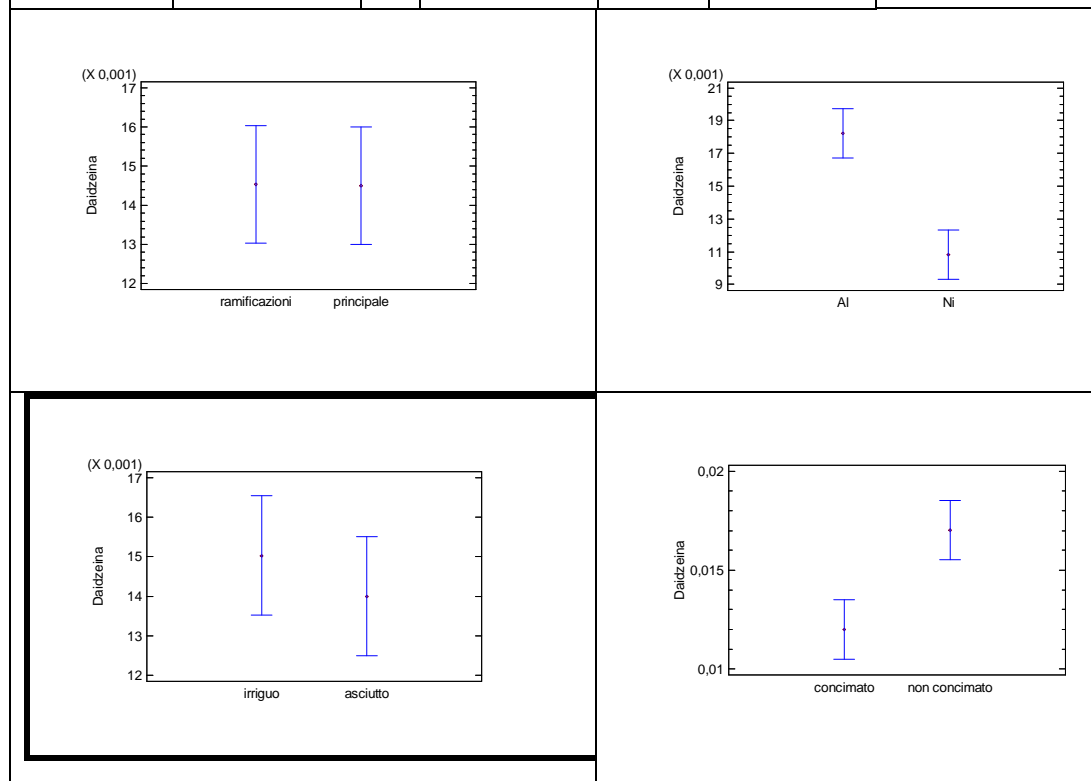


Fonti variabilità	Somma quadr.	gl	Media quadr.	F	P
fusto	0,2211	1	0,2211	45,96	0,0000
varietà	1,0110	1	1,0110	210,12	0,0000
irrigazione	0,0807	1	0,0807	16,79	0,0002
concimazione	0,0099	1	0,0099	2,07	0,1567
fusto*varietà	0,0239	1	0,0239	4,98	0,0302
fusto*irrig	0,0243	1	0,0243	5,06	0,0290
fusto*irrig*conc.	0,0407	1	0,0407	8,46	0,0054

Figura.53. risposta della M.daidzina nel cotiledone ad alcune variabili agronomiche: fusto, varietà, irr., conc. Sono stati mostrati solo i parametri significativi

Daidzeina

Fonti variab.	Somma quadr.	gl		F	P
tra gruppi	0,0020	13	0,000161	4,49	0,0001
errore	0,0017	50	0,000035		
Totale	0,0038	63			

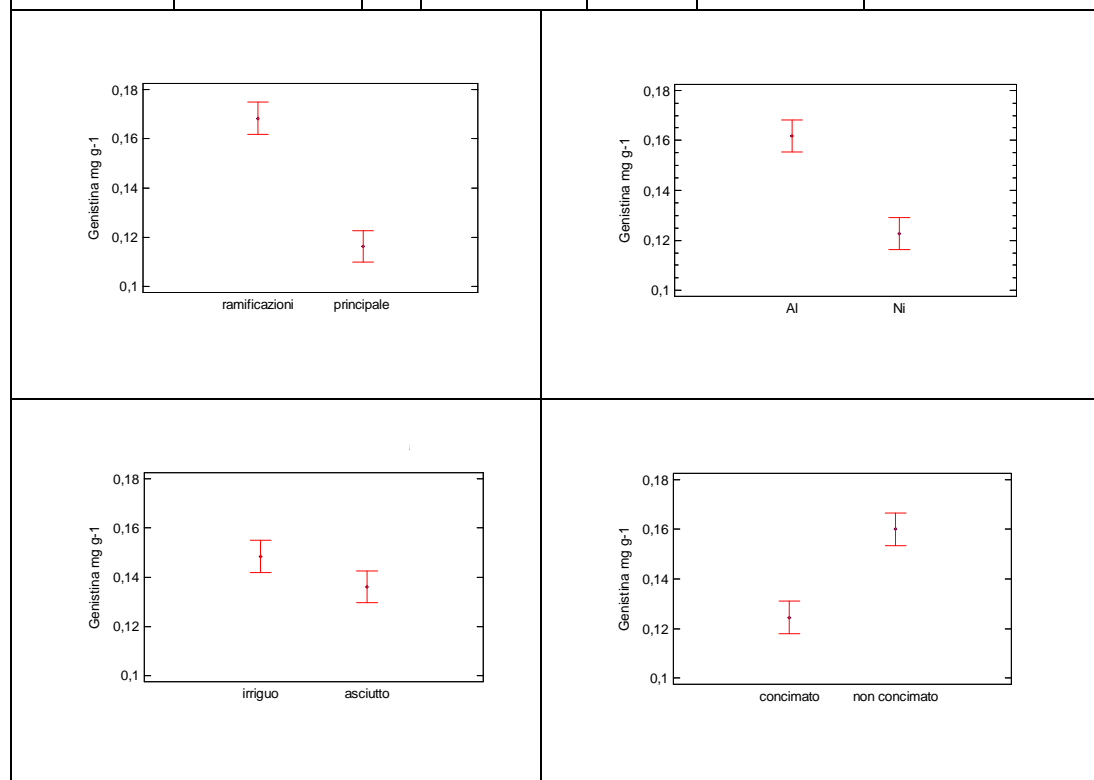


Fonti variabilità	Somma quadr.	gl	Media quadr.	F	P
tige	1,5625E-8	1	1,5625E-8	0,00	0,9834
fusto	0,00087	1	0,000877	24,44	0,0000
varietà	0,00001	1	0,000017	0,47	0,4944
irrigazione	0,00040	1	0,000405	11,28	0,0015
concimazione	0,00005	1	0,000050	1,41	0,2400
fusto*irrig	0,00041	1	0,000415	11,56	0,0013

Figura 54. risposta della Daidzeina nel cotiledone ad alcune variabili agronomiche: fusto, varietà, irr., conc. Sono stati mostrati solo i parametri significativi

Genistina

Fonti variab.	Somma quadr.	gl		F	P
tra gruppi	0,0950	13	0,00731	10,83	0,0000
errore	0,0337	50	0,00067		
Totale	0,1288	63			

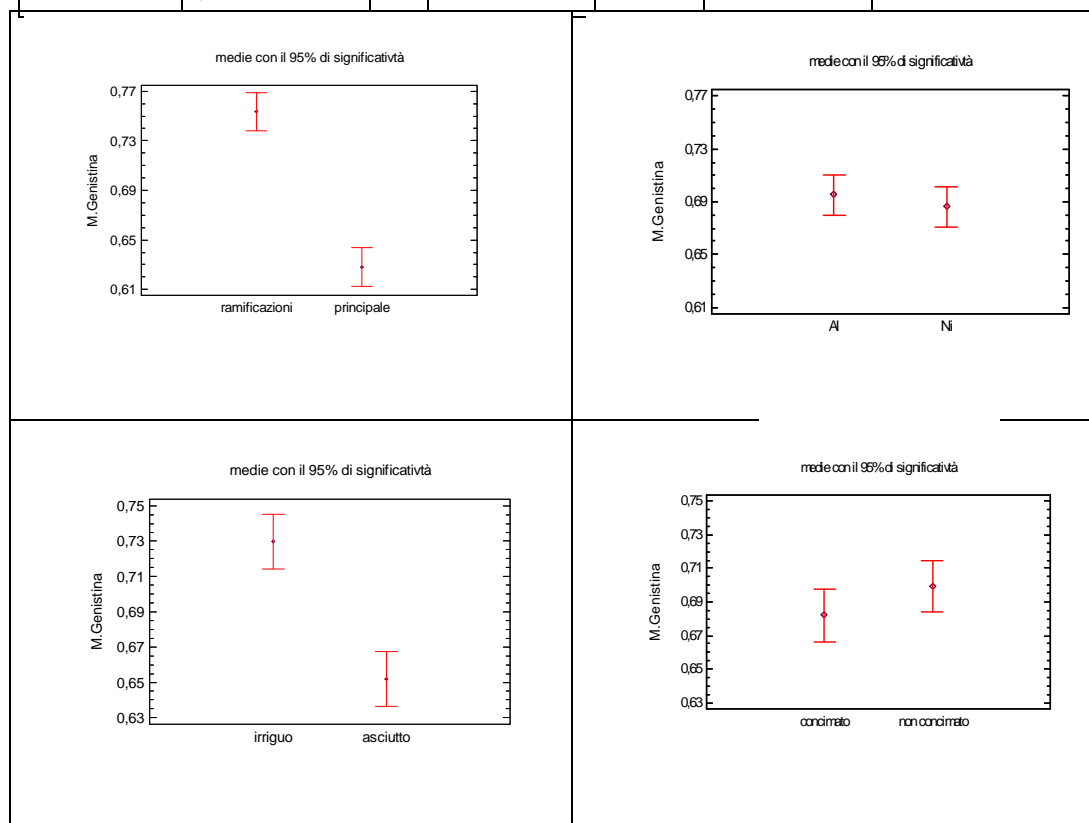


Fonti variabilità	Somma quadr.	gl	Media quadr.	F	P
fusto	0,0432	1	0,043212	63,97	0,0000
varietà	0,0243	1	0,024375	36,08	0,0000
irrigazione	0,0024	1	0,002437	3,61	0,0632
concimazione	0,0201	1	0,020199	29,90	0,0000
fusto*varietà	0,0026	1	0,002665	3,95	0,0525

Figura 55. risposta della Genistina nel cotiledone ad alcune variabili agronomiche: fusto, varietà, irr., conc. Sono stati mostrati solo i parametri significativi

M.Genistina

Fonti variab.	Somma quadr.	gl		F	P
tra gruppi	0,3820	12	0,0318	8,41	0,0000
errore	0,1931	51	0,0037		
Totale	0,5751	63			

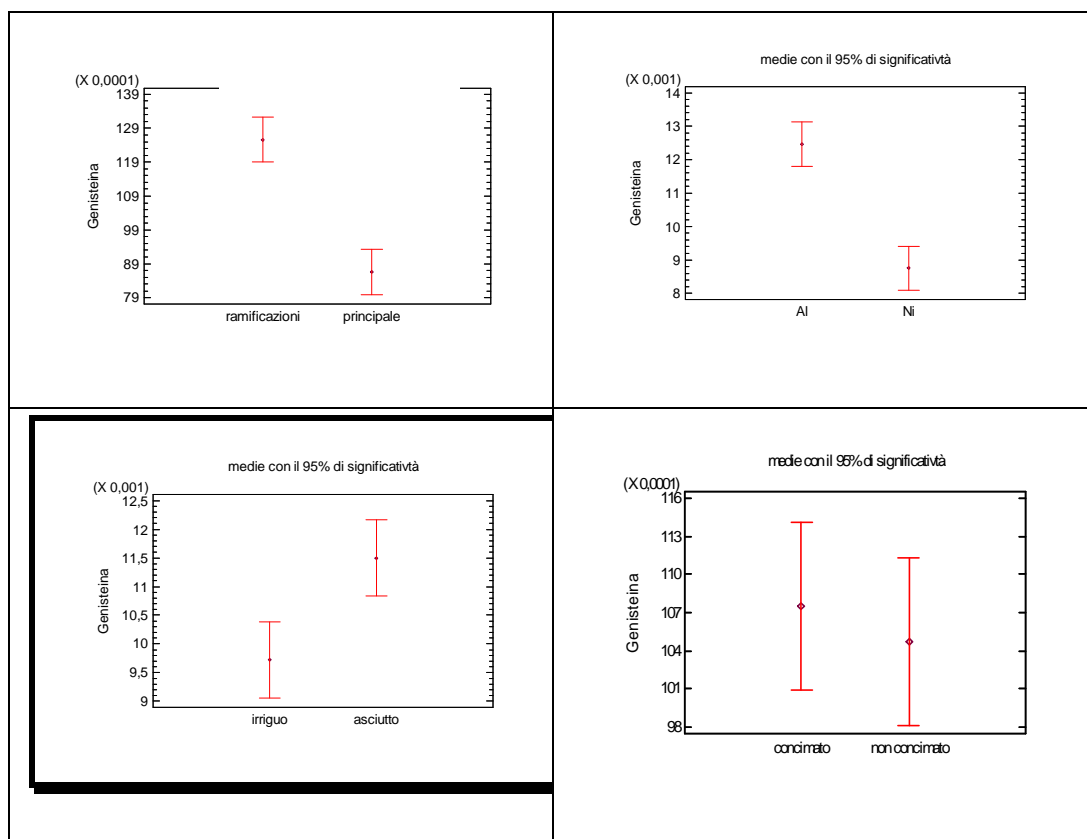


Fonti variabilità	Somma quadr.	gl	Media quadr.	F	P
fusto	0,25150	1	0,25150	66,41	0,0000
varietà	0,0012	1	0,00127	0,34	0,5639
irrigazione	0,0970	1	0,09703	25,62	0,0000
concimazione	0,0049	1	0,00493	1,30	0,2590
fusto*varietà	0,0001	1	0,00018	0,05	0,8241
fusto*irrig	0,0123	1	0,01232	3,25	0,0772

Figura 56. risposta della M.genistina nel cotiledone ad alcune variabili agronomiche: fusto, varietà, irr., conc. Sono stati mostrati solo i parametri significativi

Genisteina

Fonti variab.	Somma quadr.	gl		F	P
tra gruppi	0,00069	12	0,00005768	8,15	0,0000
errore	0,00036	51	0,00000707		
Totale	0,00105	63			



Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
fusto	0,000244	1	0,00024	34,49	0,0000
varietà	0,000221	1	0,00022	31,26	0,0000
irrigazione	0,000050	1	0,00005	7,17	0,0099
concimazione	0,000001	1	0,0000012	0,18	0,6742
fusto*varietà	0,000050	1	0,0000507	7,17	0,0099
fusto*irrig	0,000034	1	0,0000345	4,88	0,0318
irrigazione*conc.	0,0000345	1	0,0000345	4,88	0,0318

Figura 57. risposta della Genisteina nel cotiledone ad alcune variabili agronomiche: fusto, varietà, irr., conc. Sono stati mostrati solo i parametri significativi

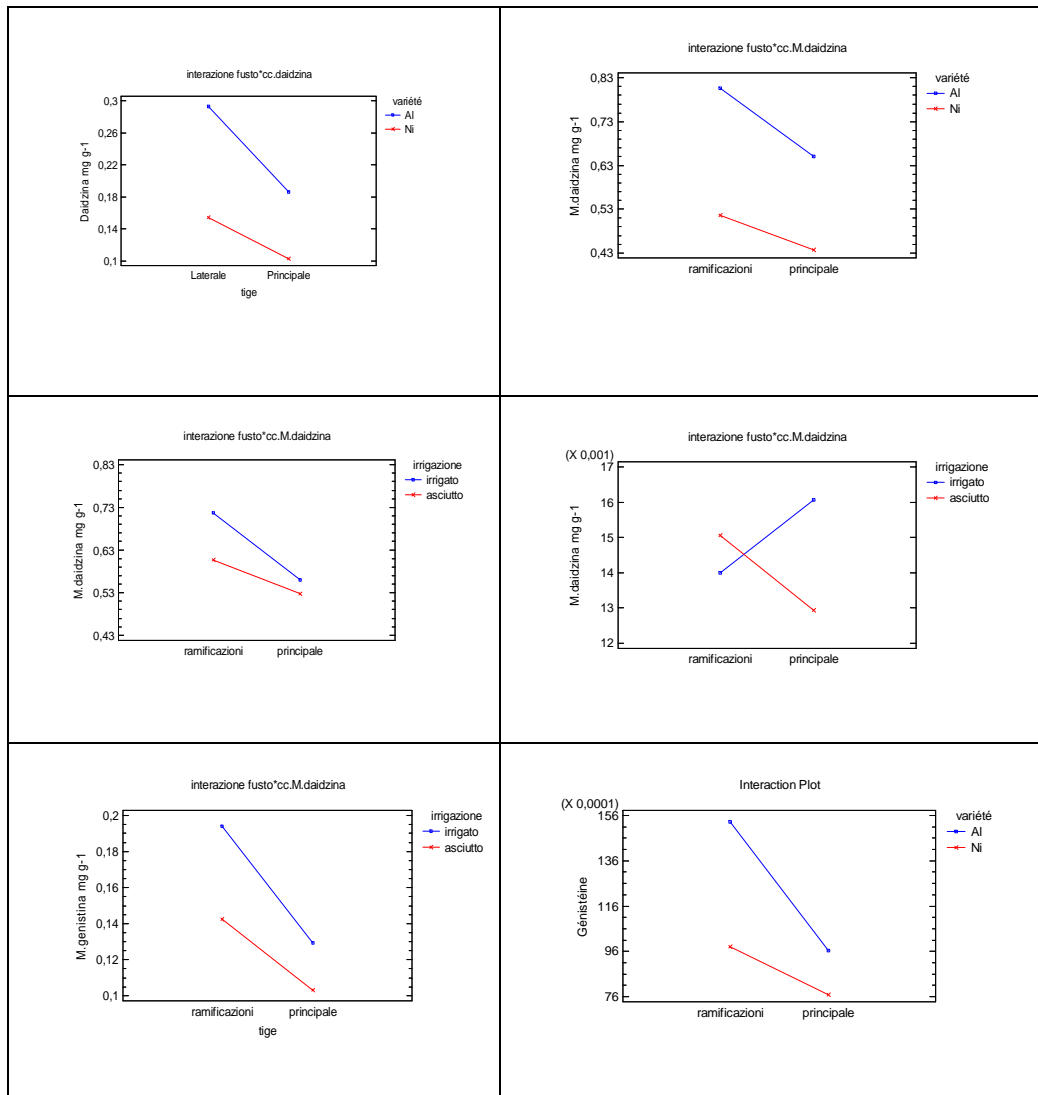


Figura 58. Split split plot: principali effetti di interazione

La composizione in isoflavoni dell’embrione nelle varietà Ales e Nikir è stata valutata con l’analisi della varianza, i risultati riportati nelle tabelle 22-24 sono relativi all’annata 2006.

tipo di isoflavone	Tipo di effetto	risultato
Daidzina	Fusto	laterale>principale ***
	Varietà	Nikir >Ales ***
	irrigazione	NS
	Concimazione	Concimato<non concimato ***

M.Daidzina	Fusto	laterale<principale***
	Varietà	Nikir<Ales***
	irrigazione	NS
	Concimazione	NS
Daidzeina	Fusto	NS
	Varietà	NS
	irrigazione	NS
	Concimazione	concimato<non concimato***

Tabella 22. risposta delle forme daidziniche dell’embrione ad alcune variabili agronomiche: fusto, varietà, irr., conc.

tipo di isoflavone	Tipo di effetto	risultato
Genistina	Fusto	NS
	Varietà	Ales>Nikir ***
	irrigazione	NS
	Concimazione	Concimato<non concimato ***
M.Genistina	Fusto	NS
	Varietà	NS
	irrigazione	Asciutto>irriguo ***
	Concimazione	Concimato<non concimato ***
Genisteina	Fusto	NS
	Varietà	NS
	irrigazione	Asciutto>irriguo ***
	Concimazione	concimato<non concimato***

Tabella 23. risposta delle forme genistinicche dell’embrione ad alcune variabili agronomiche: fusto, varietà, irr., conc.

tipo di isoflavone	Tipo di effetto	risultato
Glicitina	Fusto	Laterale>principale****
	Varietà	Ales>Nikir ***
	irrigazione	Irriguo>asciutto ***
	Concimazione	Concimato<non concimato ***
M.Glicitina	Fusto	NS
	Varietà	Ales>Nikir ***
	irrigazione	NS
	Concimazione	NS
Gliciteina	Fusto	NS
	Varietà	Ales>Nikir ***
	irrigazione	NS
	Concimazione	NS

Tabella 24. risposta delle forme glicitiche dell'embrione ad alcune variabili agronomiche: fusto, varietà, irr., conc.

Nell'embrione si osserva una maggiore incidenza dei fattori non significativi, i fattori allo studio sono meno capaci di far variare la concentrazione di isoflavoni in questa parte di pianta quando gli effetti sono significativi si osservano variazioni simili a quelle osservate nel cotiledone tranne in alcuni casi: Nikir sintetizza più malonildaidzina di Ales e soprattutto nei semi portati dal fusto e si è riscontrato un aumento di malonilgenistina in condizioni di assenza di irrigazione.

Analizzando i dati di coltivazione biennale del campo varietale alla luce delle variazioni osservate sulla prova d'irrigazione limitatamente alla composizione in isoflavoni del cotiledone si può vedere che nel 2005 la malonilgenistina (sensibile solo all'irrigazione nella prova d'irrigazione) ha una concentrazione più elevata rispetto al 2006, la daidzeina sensibile alla concimazione ha una concentrazione minore nell'ambiente di coltivazione biologico indicando potenzialmente una migliore dotazione di azoto del terreno. La genisteina che aumenta di concentrazione in condizioni di stress ha valori molto più elevati nella prova condotta in condizioni convenzionali rispetto alla prova condotta con metodo biologico. e valori più elevati nel 2005 rispetto al 2006. Queste due ultime situazioni vengono confermate come le situazioni di maggiore stress.

isoflavone	2006	2005	incremento	Signific.
Genistina	0,14	0,26	46%	***
Daidzina	0,16	0,25	36%	***
Malonilgenistina	0,66	0,81	19%	***
Malonildaizina	0,55	0,61	10%	***
Genisteina	0,0011	0,0032	66%	***
Daidzeina	0,0098	0,0260	62%	***
Totale	1,70	2,02	16%	***
isoflavone	Bio	Conv.	incremento	
Genistina	0,19	0,22	14%	***
Daidzina	0,19	0,22	14%	***
Malonilgenistina	0,72	0,76	5%	**
Malonildaizina	0,56	0,60	7%	**
Genisteina	0,0016	0,0028	43%	***
Daidzeina	0,0140	0,0220	36%	***
Totale	1,80	1,93	7%	***

Tabella 25. Cotiledone valori biennali di concentrazione di isof. Totali mg g-1

4.7.2 Analisi delle ureidi durante la fase del ciclo

Analizzando le ureidi fogliari (dati 2007) durante la fase del ciclo si è notato per le due varietà il classico andamento a sigmoide, solamente in fase R4 si ha una differenza statisticamente significativa fra le varietà nelle altre fasi non si notano differenze, si nota invece una differenza statisticamente significativa tra le tesi irrigate e le tesi non irrigate,

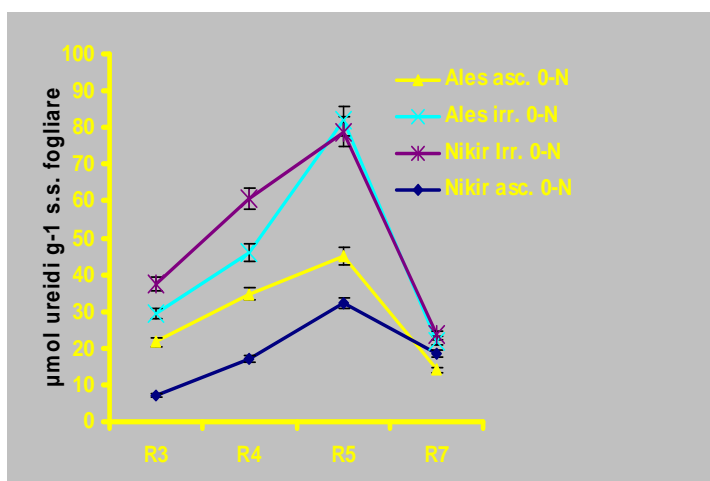


Figura 58.2 [ureidi] µmol g⁻¹ in funzione della fase del ciclo

l'irrigazione migliorando le condizioni pedoclimatiche stimola un aumento delle dimensioni della radice (maggiore attività del cambio) il flusso xilematico e floematico migliora e una maggiore concentrazione di ureidi vengono trasportati a livello delle foglie. Anche se in condizione di irrigazione non emergono differenze tra la concentrazione di Ureidi fogliari di Ales e Nikir è verosimile pensare che il flusso di Ureidi sia più veloce in Nikir rispetto ad Ales, Nikir infatti ha evidenziato diametri radicali maggiori in tutti gli orizzonti in condizioni di irrigazione (Fig. 62). la velocità del flusso in un condotto è proporzionale alla quarta potenza del raggio, (Legge di Poiseuille, Taiz. L Geiger E. 1991) il flusso xilematico è connesso al suo diametro (Génard M et Al) è strettamente connesso al flusso floematico. Nikir ha inoltre ha una maggiore propensione alla produzione di proteina (Fig.60) e dunque una maggiore "forza di sink metabolico" a livello dei semi.

L'analisi delle ureidi a livello dei noduli effettuata in fase R4 non ha evidenziato differenze tra tesi irrigue e non irrigue ma una forte differenza tra le varietà.

Ales ha prodotto dei noduli con una concentrazione media di ureidi inferiore a quella di Nikir. (I noduli di Nikir hanno una forza di "source" più elevata che in una prima fase si può vedere nella legge di Fick almeno due componenti dell'equazione di Fick (, Taiz. L Geiger E., 1991) son più alti nei noduli di Nikir rispetto ad Ales: concentrazione e carica.

Legge di Fick:

$$\mu_j = \mu_j^* + RT \ln C_j + Z_i F E + V_j P$$

Pot.std
carica

potenziale
Concentrazione
pressione

Legge di Poiseuille

$$velocità = \frac{\pi r^4 \Delta P}{8 \eta \Delta x}$$

Le analisi morfofisiologiche dell'apparato nodulare hanno mostrato in che Ales tende a produrre un numero inferiore di Noduli e di più grandi dimensioni mentre Nikir produce mediamente più noduli e di dimensioni più ridotte (Fig. 61 a,b), questi dati confermano quanto osservato dall'Analisi delle ureidi effettuate sui Noduli, (Fig. 59) un numero maggiore di noduli di ridotte dimensioni consente di avere una maggiore superficie

esposta all'aria e quindi presumibilmente una più efficace diffusione dell'N atmosferico all'interno del nodulo che comporta una più efficiente sintesi di ureidi. Riassumendo si può dire che Nikir sia un sistema più dinamico di Ales maggiormente in grado di rispondere alle variabili agronomiche,

Ci sono studi (Espinosa, Carrol et Al) che mostrano come alcuni trascritti genici in grado di attivare la via biosintetica degli isoflavoni aumentano al diminuire della concentrazione di azoto nel nodulo.

Una condizione di bassa efficienza dell'apparato nodulare ("maggiore primitività") potrebbe favorire da R6 in poi la produzione di molecole attive sulla via metabolica degli isoflavoni che dai noduli potrebbero essere trasferite alla parte aerea della pianta.

in Nikir il diametro radicale (μm) risulta maggiore in tutti gli orizzonti di terreno in condizioni irrigue (media dei valori: 266 μm) rispetto all'asciutto (media dei valori: 206 μm) (Fig. 62)

Nella varietà Ales i diametri radicali non risultano influenzati dalla tesi presa in esame, presentando valori quasi identici: diametro medio in asciutto 171 μm e in irriguo 212 μm , ad eccezione degli orizzonti centrali. (Fig. 63)

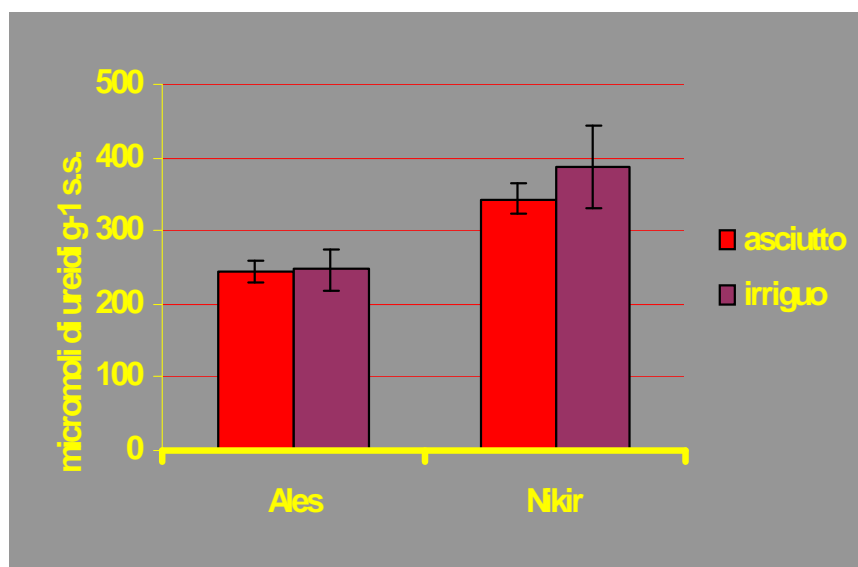


Figura 59. concentrazione di ureidi nei noduli Ales vs Nikir

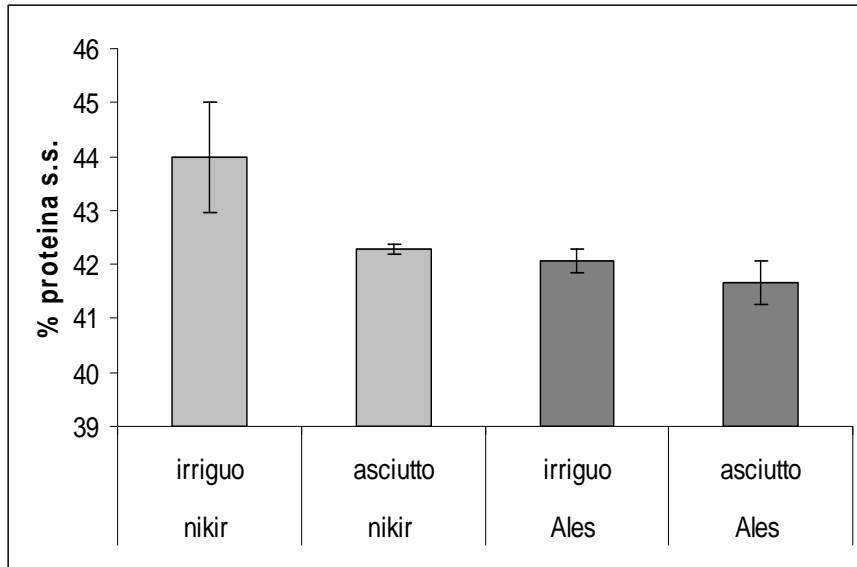


Figura 60. % di P.G. Ales vs Nikir

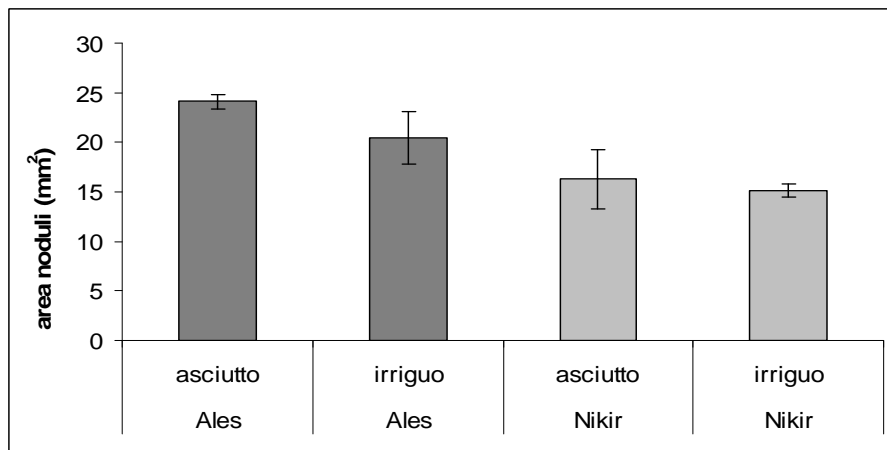


Figura 61a area media dei noduli Ales vs Nikir

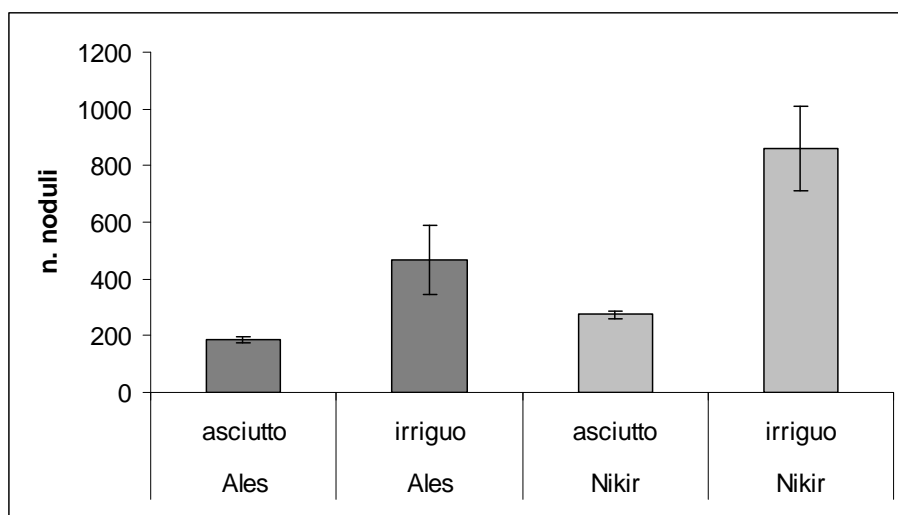


Figura 61. b) In basso n° dei noduli in 10 piante Ales vs Nikir

Nikir presenta in tutti gli orizzonti di terreno valori di RLD maggiori in condizioni di asciutto rispetto all'irriguo. La media dei valori di RLD in asciutto è infatti di 3,79 cm cm-3, mentre quella in irriguo è di 2,82 cm cm-3 (Fig. 64)

In Ales invece, ad eccezione del primo orizzonte di terreno, i valori di RLD si sono dimostrati indifferenti all'irrigazione: in condizioni di asciutto media dei valori di RLD uguale a: 3,17 cm cm-3 mentre in irriguo 3,61 cm cm-3. (Fig. 65)

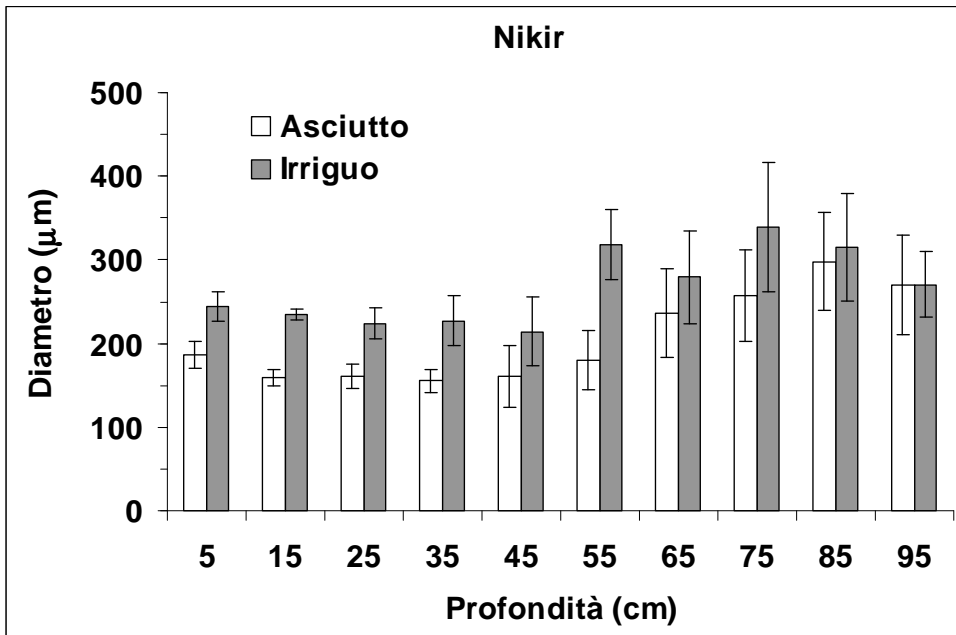


Figura 62. Diametri radicali di Nikir.

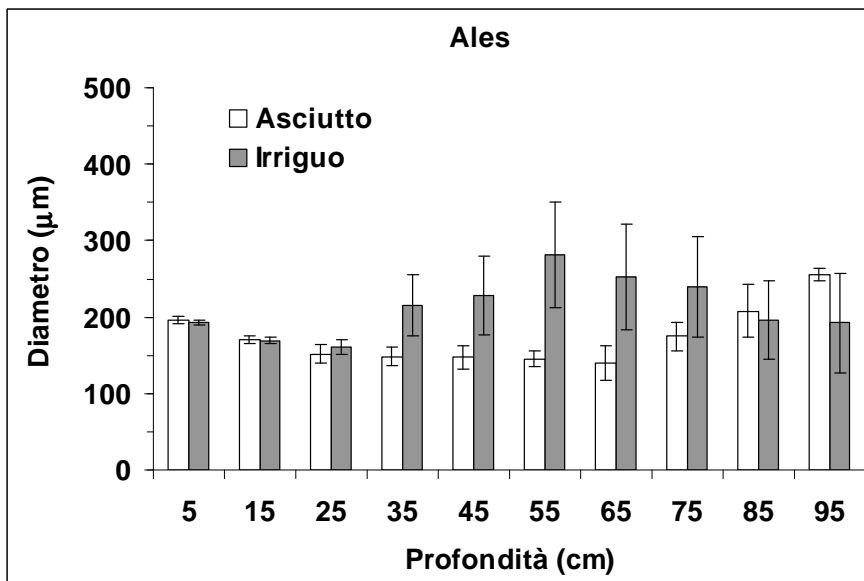


Figura 63. Diametri radicali di Ales

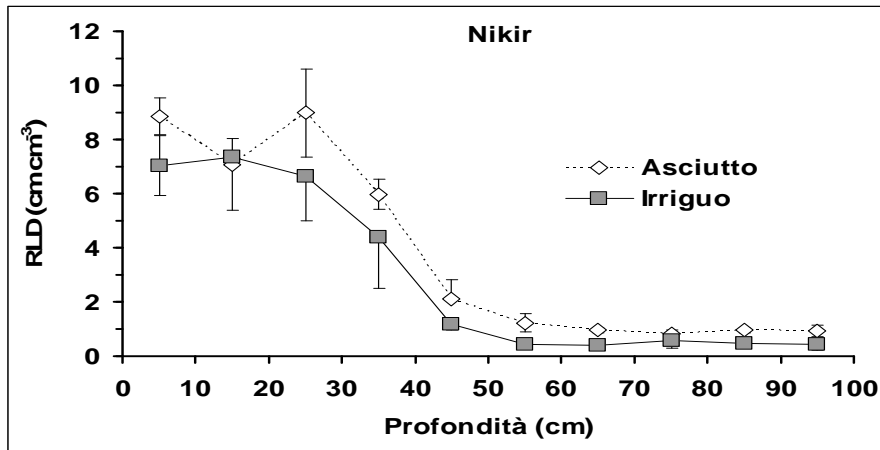


Figura 64. Nikir densità di lunghezza radicale

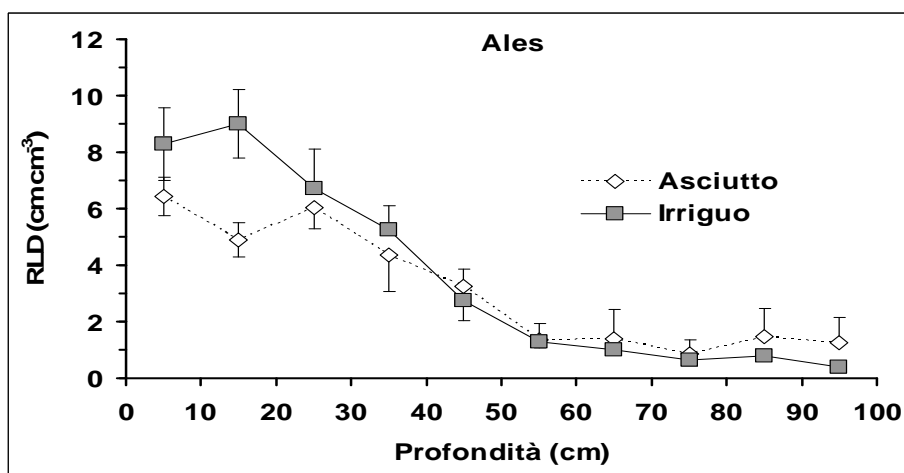


Figura 65. Ales densità di lunghezza radicale

4.8 COLORAZIONE DELL'ILO

L'analisi dell'intensità della colorazione dell'ilo nelle principali varietà coltivate nel 2005 e 2006. è stata effettuata in quanto si è scelto di valutare un carattere di "primitività" come la colorazione dell'ilo.

La colorazione del seme di soia è considerata una caratteristica ancestrale, anticamente molte leguminose avevano un seme di colore scuro che permetteva la mimetizzazione del seme dopo la deiscenza.

Si è cercato di vedere se era possibile trovare una correlazione tra il livello di espressione della colorazione del seme e la concentrazione totale di isoflavoni, Si è ottenuta una buona correlazione ($R^2=70\%$) tra l'intensità del grigio e il contenuto totale di isoflavoni nel cotiledone, (Fig. 66) la correlazione con il contenuto di isoflavoni totali nell'embrione non è risultata significativa.

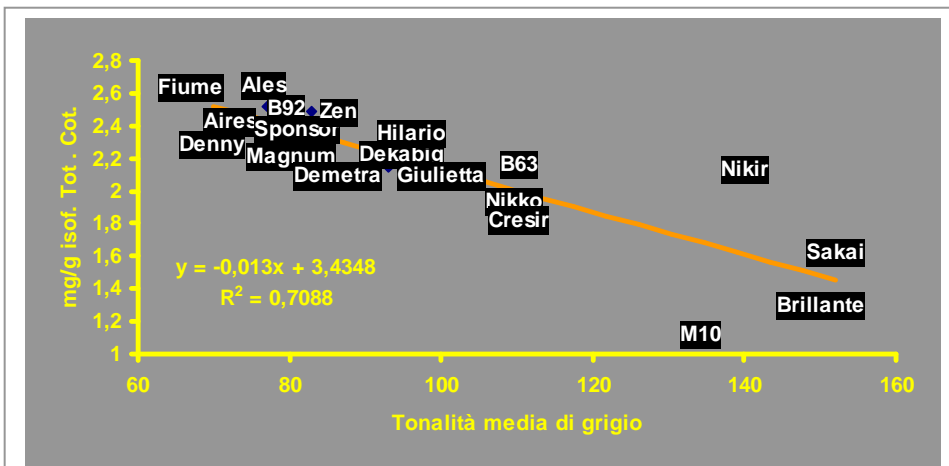


Figura 76. correlazione tra intensità del grigio e [isof.tot.] cotiledone

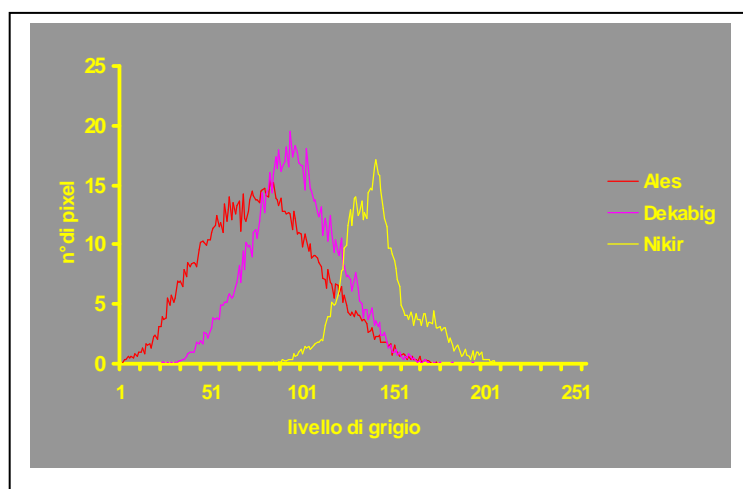


Figura 67. intensità di colorazione di grigio per tre diverse varietà

Le varietà ad ilo più scuro (ilo con un numero superiore di pixel intensamente colorat) contengono mediamente un tenore più elevato di isoflavoni nel cotiledone

4.9 EFFETTO DEL DIVERSO TIPO DI TERRENO

Dai dati di analisi degli isoflavoni della varietà Nikir coltivata su 4 tipi diversi di terreno differenze significative si sono riscontrate solamente nel contenuto totale di isoflavoni del cotiledone fra il terreno sabbioso e torboso nonostante la differenza sia stata minima ($0,3 \text{ mg g}^{-1}$) (Fig. 68). Il terreno sabbioso è un terreno in cui gli apparati nodulari soffrono condizioni di stress, il terreno torboso è invece un terreno che tende a rilasciare composti azotati e che come già notato con la concimazione azotata inibiscono la sintesi degli isoflavoni ,

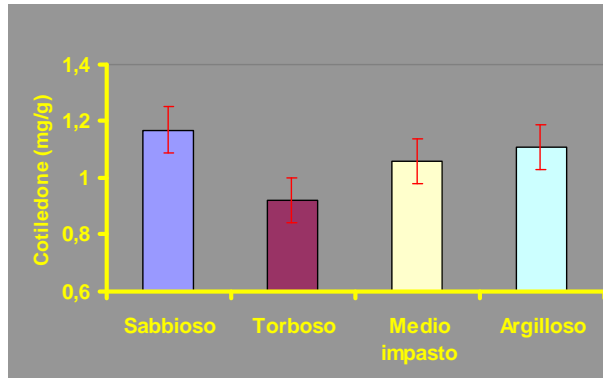


Figura 68. Nikir contenuto di isoflavoni totali nel cotiledone in 4 tipi di terreno.

Prendendo in considerazione invece la composizione dei singoli isoflavoni si vede come sia nell'embrione che nel cotiledone le forme agluconiche, gli isoflavoni cioè più attivi come fitoalessine (Genisteina, Daidzeina e Gliciteina) si concentrino maggiormente in terreni pesanti.

Il terreno di tipo argilloso normalmente è un terreno che trattiene di più l'umidità e che consente un più intenso sviluppo dei parassiti fungini, la pianta come meccanismo di difesa produce flavonoidi di tipo agluconico. (Tab. 26 e 27)

<i>Suolo</i>	<i>numero</i>	<i>Mg g-l</i>	<i>Gruppi om.</i>	<i>Suolo</i>	<i>numero</i>	<i>Mg g-l</i>	<i>Gruppi om.</i>
Mi	4	7,2945	a	Mi	4	3,417	a
Sa	4	6,9235	ab	Ar	4	3,233	b
Ar	4	6,881	b	Sa	4	3,212	b
To	4	6,6215	b	To	4	3,111	b
Malonil-daidzina E. LSD 0,397454				M.glicitina E. LSD 0,150423			
<i>Suolo</i>	<i>numero</i>	<i>Mg g-l</i>	<i>Gruppi om.</i>	<i>Suolo</i>	<i>numero</i>	<i>Mg g-l</i>	<i>Gruppi om.</i>
To	4	0,0545	a	Ar	4	0,007	a
Ar	4	0,052	a	To	4	0,007	a
Mi	4	0,051	ab	Sa	4	0,0065	a
Sa	4	0,0435	b	Mi	4	0,0045	b
Daidzeina E. LSD 0,00827282				Genisteina E. LSD 0,00188691			
<i>Suolo</i>	<i>numero</i>	<i>Mg g-l</i>	<i>Gruppi om.</i>				
Mi	4	0,033	a				
Ar	4	0,0325	a				
To	4	0,0265	ab				
Sa	4	0,0215	b				
Gliciteina LSD 0,0073215							

Tabella 26 isoflavoni dell'embrione che hanno mostrato differenze significative di concentrazione nella varietà Nikir coltivata in 4 terreni diversi, le tabelle in giallo rappresentano le forme agluconiche.

<i>Suolo</i>	<i>numero</i>	<i>Mg g-1</i>	<i>Gruppi om.</i>	<i>Suolo</i>	<i>numero</i>	<i>Mg g-1</i>	<i>Gruppi om.</i>
Sa	4	0,0955	a	Sa	4	0,418	a
Ar	4	0,082	b	Mi	4	0,3675	b
Mi	4	0,079	ab	Ar	4	0,349	b
To	4	0,069	c	To	4	0,3	c
Daidzina LSD 0,0104965				Malonil Daidzina LSD=0,0483878			
<i>Suolo</i>	<i>numero</i>	<i>Mg g-1</i>	<i>Gruppi om.</i>	<i>Suolo</i>	<i>numero</i>	<i>Mg g-1</i>	<i>Gruppi om.</i>
Ar	4	0,0085	a	Sa	4	0,543	a
Sa	4	0,0075	ab	Mi	4	0,5395	a
To	4	0,005	b	Ar	4	0,4825	b
Mi	4	0,0045	b	To	4	0,461	b
Daidzeina LSD 0,00329835				M.genistina			
<i>Suolo</i>	<i>numero</i>	<i>Mg g-1</i>	<i>Gruppi om.</i>				
Ar	4	0,005	a				
Mi	4	0,004	b				
Sa	4	0,004	b				
To	4	0,004	b				
Genisteina LSD 0,000889499							

Tabella 27. isoflavoni del cotiledone che hanno mostrato differenze significative di concentrazione nella varietà Nikir coltivata in 4 terreni diversi, le tabelle in giallo rappresentano le forme agluconiche.

Un ulteriore tipo di confronto è stato eseguito correlando i parametri delle analisi chimiche del terreno dei 4 lisimetri con la concentrazione di isoflavoni totali nell'embrione e nel cotiledone. Per ognuno dei 4 lisimetri sono stati correlati i dati provenienti dall'analisi del terreno con quelli provenienti dalle analisi degli isoflavoni sui semi prodotti dalle piante coltivate sul lisimetro stesso. Sono state eseguite due repliche di analisi di isoflavoni per ciascun lisimetro.

Dal confronto dei dati si è visto che le variabili chimiche del terreno sono in grado di influenzare solamente il contenuto di isoflavoni nel cotiledone. Complessivamente si è potuto riscontrare che terreni ricchi di elementi nutritivi di sostanza organica e con una elevata capacità di scambio cationico tendono a deprimere la sintesi di isoflavoni totali nel cotiledone.

Il terreno sabbioso dunque favorisce una più elevata concentrazione di isoflavoni totali nel cotiledone. I parametri del terreno che sono meglio correlati con la concentrazione di isoflavoni nel cotiledone sono: capacità di scambio cationico ($R^2 = 99,7\%$) (Fig. 69) contenuto di calcio scambiabile ($R^2 = 98,22\%$) (Fig. 70) contenuto totale di sostanza organica ($R^2 = 98,06\%$) (Fig. 71) e contenuto di azoto totale ($R^2 = 89,9841$) (Fig. 72) il parametro che meglio si correla con il contenuto di isoflavoni del cotiledone è la capacità di scambio cationico, una caratteristica che descrive le proprietà colloidali del terreno. Terreni con

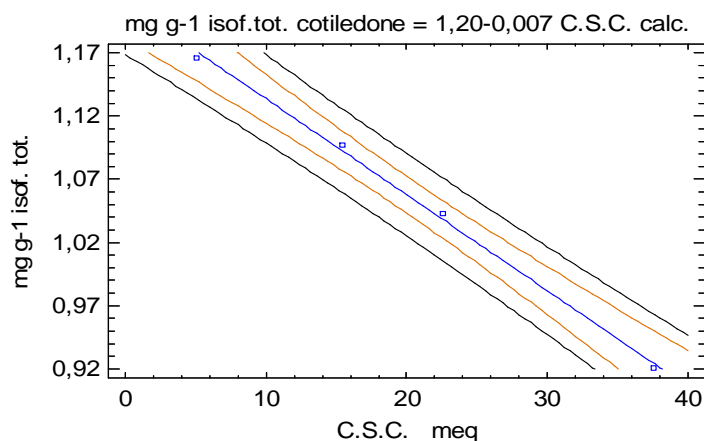


Figura 69. andamento della [isof.tot.cotiledonari] in funzione della C.S.C. del terreno i punti da sinistra a destra rappresentano rispettivamente il terreno sabbioso, medio impasto, argilloso e torboso)

elevate dotazioni colloidali sono meno adatti a coltivare soia per la produzione di isoflavoni, la capacità colloidale del terreno permette alla pianta di ricevere con gradualità e regolarità gli elementi nutritivi in funzione delle varie fasi, se la frazione colloidale del terreno è poco efficiente il rifornimento regolare di elementi nutritivi alla pianta è impedito e la pianta più facilmente può incorrere in situazioni di stress.

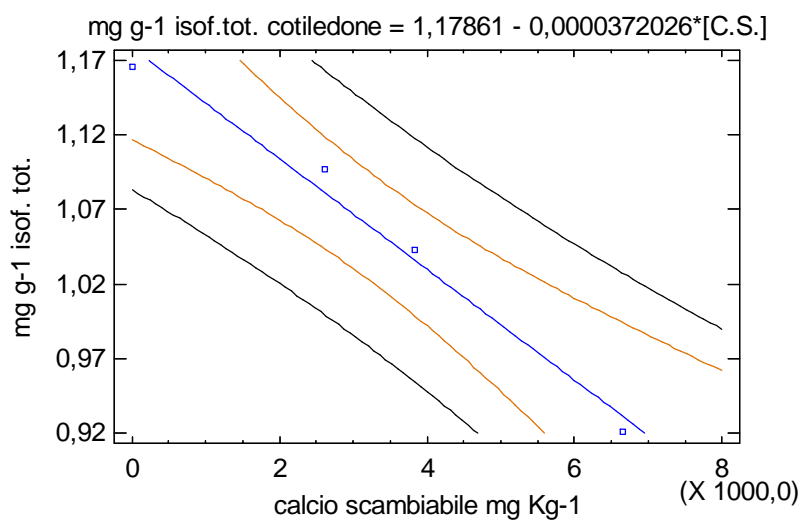


Figura 70. andamento della [isof.tot.cotiledonari] in funzione del calcio scambiabile del terreno i punti da sinistra a destra rappresentano rispettivamente il terreno sabbioso, medio impasto, argilloso e torboso)

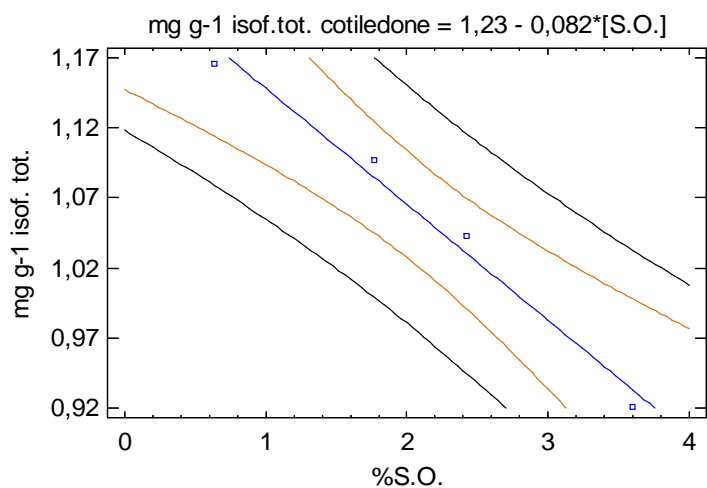


Figura 81. andamento della [isof.tot.cotiledonari] in funzione della % S.O. del tereno i punti da sinistra a destra rappresentano rispettivamente il terreno sabbioso, medio impasto, argilloso e torboso)

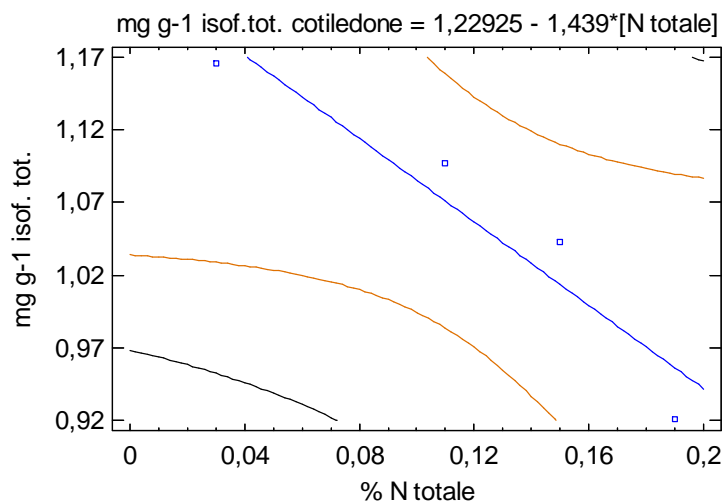


Figura 72, andamento della [isof.tot.cotiledonari] in funzione della % N totale del terreno i punti da sinistra a destra rappresentano rispettivamente il terreno sabbioso, medio impasto, argilloso e torboso)

I parametri del terreno che esprimono la dotazione di elementi nutritivi (azoto totale, fosforo totale, potassio solubile, magnesio scambiabile) hanno una percentuali di correlazione inferiori con la concentrazione di isoflavoni nel cotiledone.

5 Conclusioni

Le strutture più efficaci nell'accumulo degli isoflavoni sono i cotiledoni e i semi portati dalle ramificazioni inoltre la concentrazione di isoflavoni nel cotiledone è sensibile ad alcune importanti variabili climatiche (temperatura e precipitazioni) e agronomiche (es. irrigazione e concimazione N, capacità di scambio cationico, calcio scambiabile e dotazione di sostanza organica);

La coltivazione in terreni sfruttati con bassi tenori in sostanza organica e con bassi valori di capacità di scambio cationico è auspicabile al fine della produzione di isoflavoni nel seme, la pratica di coltivazione convenzionale

Sembra dunque adattarsi meglio alla coltivazione della soia per la produzione di isoflavoni.

Il panorama varietale italiano ha evidenziato una discreta variabilità per la capacità di concentrare isoflavoni, suggerendo che la scelta varietale può risultare fondamentale per nuovi obiettivi di qualità;

Caratteri di "primitività" della coltura (scurezza dell'ilo, incapacità di risposta ad input agronomici, apparato nodulare poco efficiente) sembrano associati ad una buona produzione di Isoflavoni nel cotiledone

Le varietà di soia che rispondono peggio agli input agronomici difficilmente hanno elevate rese in Proteina nonostante questo il basso grado di correlazione tra la resa in proteina e la resa in isoflavoni permette di conservare il buon tenore proteico della semente come uno degli obiettivi da tenere in considerazione a livello produttivo.

Non essendo possibile effettuare una raccolta mirata dei palchi laterali si suggerisce di ridurre la densità di semina per aumentare la ramificazione della pianta.

La possibilità di simulare un danno da grandine con mezzi meccanici al fusto potrebbe essere un'ipotesi oggetto di futuri studi.

Sono auspicabili ulteriori studi che circa il rapporto intercorrente tra le variabili del terreno e la capacità della pianta di soia a concentrare isoflavoni.

6 Bibliografia

- 1..GRIFFITHS LA, BARROWS A (1972). Metaboiism of flavonoid compounds in germ-free rats. *Biochem /*, 130 :1161 - 2117.
Agric Food Chem, 41 : 1961-1967.
- 2.ALDERCRUTZ H, HON]A H, HIGASHI A, et al. 1991. Urinary excretion of lignans and isoflaronoid phytoestrogens in |apanese men and women consuming a traditional Japanese diet. *Am j Clin Nutr*, 54 : 1093 -1100.
- 3.ANDERSON B, GARNER SC 1997. The effects of phytoestrogens on bone. *Nutr Rei*, 17:1617-1632.
- 4.ARJMANDI BH, GETLINGER M, GOYAL NV 1998. Role of soy protein with normal or reduced isoflavone content in reversing bone loss induced by ovarian hormone deficiency in rats. *Am j Clin Nutr*, 68 : SI 358-363.
- 5.AUSSENAC T, LACOMBE S, DAYDE J (1998). Quantification of isoflavone by capillary zone electrophoresis in soybean seeds : effects of variety an environment. *AmjClin Nutr*, 68 : S1480-5.
- 6.BEAGLEHOLE R. (1990). International trends in coronary heart disease mortality, morbidity, and riskfactors. *Epidemiology Rev*, 12 :1-15.
- 7.BERGER, M. ; ARTAL, J. ; THEODOROU, V. ; NEPVEU, F. ; DAYDÉ, J. 2002. Facteurs de variation de la teneur en isoflavones du soja. Symposium Aliment Sante. Toulouse, 25 Avril 2002.
- 8.BODWELL, C.E., AND HOPKINS, D.T. 1985. Nutritional Characteristics of Oilseed Proteins, in *New Protein Foods: Seed Storage Proteins*, Vol. 5, p311-312 Altschul, A.A., and Wilcke, H.L., Academic Press, Orlando.
- 9.BOULET M, ODDENS B, LEHERT P, VEMER HM, VISSER A 1994. Climacteric and menopause in seven south-east Asian countries. *Maturitas* 19:157-76.
10. BOUNIOLS A, DAYDE J, MONDIES M, TALLEUX L, DALBIN N 1994. Correlations between genotypic and cultural factors on protein and oil content and fatty acids composition of soybean seeds. *World Soybean Research Conference V*, Chiang Mai, Thailand, Feb. 20-26.
11. BOWEN R, BARNES S, WANC Y (1995). Antioxidant and anti-promotional effects of the soybean isoflavone genistein. *PSEBM*, 208 :124-30.

12. BRECKWOLDT M, KECK C, KARCK U 1995. Benefits and risks of hormone replacement therapy (HRT). / *Steroid Biochem Motec Biol*, 53 : 205-8.
13. BROUGHTON, W. J. ; HANG, F. ; FERREI, X. ; STAEHELIN, C. 2003. Signals exchanged between legumes and Rhizobium: agricultural uses and perspectives. *Plant and Soil* 252(1): 129-137.
14. BROUGHTON, W. J. ; JABBOURI, S. ; FERREI, X. 2000. Keys to symbiotic harmony. *American Society For Microbiology*. 182: 5641-5652
15. BROWN P. (1988). Hydrolysis of glycosides and esters. In : ROWLANG IR, ed. *Role of the gut flora in toxicity and cancer*. San Diego : Academic press : 109-44.
16. CALDWELL, M. M. ; ROBBERECHT, R. ; FLINT, S. 1983. Internal filters: prospects for UV-acclimation in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 58: 445-450.
17. CARROLL KK, KUROWSKA EM 1995. Soy consumption and cholesterol reduction : review of animal and human studies. *Nutr*, 125 : 5594-7.
18. CASSIDY A, BINGHAM S, SETCHELL K (1994). Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavone on the menstrual cycle of premenopausal women. *Am J Clin. Nutr.*, 60:333-40.
19. CETIOM (1999). *Le soja en 99 : le contexte économique, les techniques culturale**. Cetiom ; 16 p.
20. CHEFTEL JC, LORIENT D (1985). Protéines du soja. In : *Protéines alimentaires*, Tech & Doc. Lavoisier : 223-239.
21. CHEN, L. J. ; ZHAO, X. ; PLUMMER, S. ; TANG, J. ; GAMES, D. E. 2005. Quantitative determination and structural characterization of isoflavones in nutrition supplements by liquid chromatography-Gas spectrometry. *Journal of Chromatography*, 1082 1: 60-70.
22. COOPER C, CAMPION G, MELTON JL 1992. III. Hip fractures in the elderly : a world wide projection. *Osteoporosis I*, 2 : 285-9.
23. CULLIMORE, J. V. ; RANJEVA, R. ; BONO, J. 2001. Perception of lipochitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends in Plant Sciences*, 6: 24-30.
24. DANG, Z. C. and LOWIK, C. 2005. Dose-dependent effects of phytoestrogens on bone. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 5: 207-213.

25. DAVID F. HERRIDGE, MARK B. Peoples (1990). Ureide Assay for Measuring Nitrogen Fixation By Nodulated Soybean Calibrated by ¹⁵N Methods. New South Wales Agriculture e Fisheries, Plant Phisiol. 93, 495-503.
26. DAYDE J (1994). Transferts de l'azote et qualité protéique des graines de soja : interaction géno-type-conduite culturale. Les rencontres annuelles du Cetiorn ; Paris, 29 nov. 1994 ; 4 p.
27. DAYDE J, LACOMBE S (1995). Optimisation de la qualité protéique des graines de soja en réponse aux besoins de l'aval industriel Purpan, 176 :134-139.
28. ELDRIDGE AC, KWOLEK F (1983). Soybean isoflavones : effect of environ ment and variety on composition. I Agric Food Chem, 31 : 394-396.
29. FISHER, R. F. LONG, S. R. 1993. Interactions of NodD at the nodbox: NodD binds to two distinct sites on the same face of the helix and induces a bend in the DNA. Journal of Molecular Biohgy, 233: 336-348.
30. GENARD M., FISHMAN S., VERCAMBRE G. , HUGUET JG, BUSSI C., BESSET J.,
31. HABIB R. A Biophysical Analysis of Stem and Root Diameter Variations in Woody Plants. 2001. Plant Physiol. 126: 188-202.
32. GILLIGAM DM, QUYYUMI AA, CANNON RO 1994. Effects of physiological levels of estrogen on coronary vasomotor function in postmenopausal women. Circutation, 89 : 2545-51.
33. Glycine max. Proceedings ofthe National Academy of Sciences ofthe USA, 84: 7428-7432.
34. GRAHAM, M. Y. ; GRAHAM, PARK, D.S. ; LANDOMI, S T. L. 2002. Induced defence potentiation against Phytophthora sojae in soybean. Physiological and Molecular Plant Pathology,60:293-3W.
35. HARRIS KS, WANG H], MURPHY PA, HENDRICH S 1995. Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. J. Nutr., 125 : 2307-15.
36. HERRIDGE D.F. 1982. Relative Abundance of Ureides and Nitrate in Plant Tissue of Soybean as a quantitative assay of Nitrogen Fixation. Plant Phisiol 70: 1-6.
37. HOMORÉ EK, WILLIAMS JK, ANTONY MS, CLARKSON TB 1997. Soy isoflavones enhance coronary vascular reactivity in atherosclerotic female macaques. Fertil Sterlityi!, 67:148-54.

38. HUBERT, J.; BERGER, M.; DAYDE, J. 2005. Use of a simplified HPLC-UV Analysis for soyasaponin B determination: Study of saponin and isoflavone variability in soybean cultivars and soy-based health food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 10: 3923-3930.
39. IRVING, H. R. ; BOUKLI, N. M. ; KELLY, M. N. ; BROUGHTON, W. J. 2000. Nod-factors in symbiotic development of root hairs. In *Root Hairs: Cell and Molecular Biology*. Eds. R. W. Ridge and A. M. Emons. Springer, Tokyo, Japan. pp 241-265.
40. JOSEPH G.ENDRES (2001) *Soy Protein Products Characteristics, nutritional aspects, and utilization* AOCS press, Soy Protein Council: p 1-51.
41. KELLY GÈ, JOANNOU GÈ, NELSON C, REEDER AY, WARING MA (1993). Metabolites of dietary (soya) isoflavones in human urine. *Clin Chim Acta*, 223 :9-22.
42. KIM H, PETERSON GT, BARNES S. (1998). Mechanism of action of the soy isoflavone genistein : emerging role for its effects via transforming growth factor b signaling. *Am j Clin Nutr*, 68 : S1418-30.
43. KING RA (1998). Daidzein conjugates are more bioavailable than genistein conjugates in rats. *AmjClin Nutr*, 68 : S1496-1499.
44. KITAMURA K, AGATE K, KICHUCHI A, KUDOU S, OKUBO K (1991). Low isoflavone content in early maturing cultivars, so called summer-type soybeans (Clycine max (i) MerrilJ. *Ipj Breeding*, 41 :651-654.
45. KNIGHT DC, EDEN A 1996. A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstet Gynecology*, 87 : 897-904.
46. KOSSLAK, R. M. ; BOOKLAND, R. ; BARKEI, J. ; PAARENN, H. ; APPELBAUM, E. R. 1987. Induction of *Bradyrhizobium Japonicum* common nod genes by isoflavone isolated from
47. LACOMBE S, AUSSENAC T, LA DROITTE P, DAYDE 1 (1999). Effects of environmental factors on isoflavone content and composition in soybean seeds. In *Proceedings of the World soybean research conference VI, Chicago, Illinois, USA*.
48. LEE HP, GOURLEY L, DUFFY SW, ESTEVE), LEE, DAY NE 1991. Dietary effects on breast cancer risk in Singapore. *Lancet*, 337 : 1197-200.
49. LOVATI MR, MANZONI C, AGOSTENELLI P, CIAPELLANO S. Manicci L., Sirtori CR (1991). Studing of the mechanism of the cholesterol lowering activity of soy protein. *Nutr Metab. Cardiovasc. Dis*. 1: 18-24.

50. LU LjW, ANDERSON KE (1998). Sex and long term soy diets affect the metabolism and excretion of soy isoflavones in humans. *Am J din. Nutr.*, 68 : SI 500-501.
51. MAFFEI M., 1999. *Biochimica Vegetale*. Piccin Editore (Padova): 273-276.
52. MESSINA M, BARNES S (1991). The role of soy products in reducing risk of cancer. *I Nati Cancer Inst*, 83 : 541 -6.
53. MIKLASHEVICH S, E.; ROHRIG, H.; SCHELL J., J. 2001. Perception and signal
54. MOLteni A, BRIZIO-MOLDENI L, PERSKY V 1995. In vitro hormonal effects of soybean isoflavones. *Nutrition*, 125 :S751-6.
55. MOSCA G., 1984 (A). La soia e le sue prospettive. *Giornale di Agricoltura*: 48-49.
56. MOSCA G., 1984 (B). La coltivazione della soia: aspetti di tecnica agronomica. In *La soia-prospettive colturali ed economiche per l'agricoltura padana*. Atti del convegno-Verona, 9 Febbraio 1984:69-89:
57. potentiation against *Phytophthora sojae* in soybean. *Physiological and Molecular Plant Pathology*,60:293-3W.
58. POTTER SM 1995. Overview of proposed mechanism for the hypocholesterolemic effect of soy. / *Nutr*, 125 : S606-11.
59. POTTER SM 1996. Soy protein and serum lipids. *Curr.Opin Lipidol*, 7 : 260-4.
60. PRICE KR, FENWIRK GR (1985). Naturally occurring estrogens in foods : a review. *FoodAddit Contarli*, 2 : 73-106.100.LU L)W, ANDERSON KE (1 998). Sex and long term soy diets affect the meta-bolism and excretion of soy isoflavones in humans. *Am / Clin Nutr.*, 68 : S1500-1503.
61. RICKARD SE, THOMPSON LU (1997). Phytoestrogens and lignans : effects on reproduction and chronic disease. In *antinutrients and phytochemicals in food*. Am Chemical Society, 662 ; 273-93.
62. SCHARFF AM, EGSGAARD H, HANSEN P.E., ROSENDAHL L. 2003 Exploring Symbiotic Nitrogen Fixation and Assimilation in Pea Root Nodules by in Vivo ¹⁵N Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry *Plant Phisiol*. 131: 367-378.
63. SCHIJLEN, E. G. W. ; DE VOS, C. H. R. ; VAN TUNEN, A. J. ; BOVY, A. G. 2004. Modificata offlavanoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry*, 65 (19): 2631-2648.

64. SETCHELL KDR, BORRIELLO SP, NUME P, KIRK DN, AXELSON M 1984. Non steroidal estrogens of dietary origin : possible roles in hormone dependent disease. *Nutr*, 40 : 569-78.
65. SEVERSON RK, NOMURA AMY, GROVE JS, STEMMERMAN GN 1989. A prospective study of demographics, diet and prostate cancer among men of Japanese ancestry in Hawaii. *Cancer Res* 49 : 1857-60.'
66. SINGHAM SA, ATKINSON C, LIGGINS I, BLUCK L, COWARD A 1998. Phytoestrogens : where are we now ? *Nutt*, 79 : 393-406.
67. SKURRAY G, CUNICH J, CARTER O (1980). HARADA K, HOSSAIN KG (1990). effect of different varieties and calcium concentration on the quality of tofu. *Food. Chem.* 6: 89-95.
68. SNYDER HE, KWON TW (1987). *Soybean utilizations* . New York ; Van Nostrand Reinhold Company; P.346.
69. TAIZ L.ZEIGER L. 1991 *Fisiologia Vegetale*. pp: 165-179.
70. TONIOLO L. E MOSCA G., 1986. *La soia*. Reda (Padova): 104 pp.
71. transduction of rhizobial Nod factors. *Critical Reviews in Plant Science*, 20: 373-394.
72. TSUKAMOTO C., SHIMADA S, IGITA K, et al. (1995). Factors affecting isoflavone content in soybean seeds : changes in isoflavones, saponins composition of fatty acids at different temperatures during the seeds development. / *Agric Food Chem*, 43 : 1184-1192.
73. VAN BERKUM P., SLOGER C., WEBER D.F., CREGAN P.B.,KEYSER H Relationship between Ureide N and N₂ Fixation, Aboveground N Accumulation, Acetylene Reduction, and Nodule Mass in Greenhouse and Field Studies with *Glycine max L. (Merr)*. 1985 *Plant Physiol* 77: 53-58.
74. WANG HJ, Murphy PA (1994b). Isoflavone content in commercial soybean foods diets. j
75. WANG HJ, MURPHY PA 1994. Isoflavone composition of American and Japanese soybean in Iowa : effects of variety, crop year, and location. / *Agric food Chem*, 42 : 1674-7.

76. WANG HJ, MURPHY PA, COOK L, HENDRICH SA 1994. Daidzein is more bioavailable soymilk isoflavone than is genistein in adult women. *J Nutr*, 126:871-7.
77. WILCOX J.R, KINNEY AJ, 1999. Advances in change seed composition. Proceeding of the World Soybean, Research conference, VI, Chicago, U.S.A. August 4-7: 134-138.
78. ZHANG, F. and SMITH, D. L. 1997. Application of genistein to inoculate and soil to overcome low spring soil temperature inhibition of soybean nodulation and nitrogen fixation. *Plant and Soil*, 192: 141-151.