



UNIONE EUROPEA  
Fondo Europeo Agricolo  
per lo Sviluppo Rurale



Regione Emilia-Romagna

L'Europa investe nelle zone rurali

## TIPO DI OPERAZIONE

**16.1.01 - Gruppi operativi del partenariato europeo per la produttività e la sostenibilità dell'agricoltura**

**DELIBERAZIONE DELLA GIUNTA REGIONALE N. 1098 DEL 01/07/2019**

**FOCUS AREA ■ 2A  4B**

**RELAZIONE TECNICA  INTERMEDIA ■ FINALE**

**DOMANDA DI SOSTEGNO N. 5149434**

**DOMANDA DI PAGAMENTO N. 5683271; 5667531; 5683397; 5691708; 5692494;**

Titolo Piano	<b>CAnapa TEssile per la Produzione di aLimenti funzionali e di biomAsse pRoteiche per l'alimentazione animale</b>	
Ragione sociale del proponente (soggetto mandatario)	Open Fields srl.	
Partner del GO	Open Fields srl; Azienda Agricola Cà d'Alfieri; Società agricola Pedrazzi; CREA Consiglio per la ricerca in agricoltura e le analisi dell'economia agraria; Azienda Agraria Sperimentale Stuard Scrl; Naturfibre srl; SITEIA-Università di Parma UNIPR; Agriform Scrl.	

Durata originariamente prevista del progetto (in mesi)	24	
Data inizio attività	27/04/2020	
Data termine attività (incluse eventuali proroghe già concesse)	23/09/2023	

Relazione relativa al periodo di attività dal	1/09/2021	Al 23/09/2023
Data rilascio relazione	16/10/2023	

Autore della relazione	Vita Maria Cristiana Moliterni		
telefono		email	<a href="mailto:vitamariacristiana.moliterni@crea.gov.it">vitamariacristiana.moliterni@crea.gov.it</a>

## 1 - DESCRIZIONE DELLO STATO DI AVANZAMENTO DEL PIANO

Le attività sperimentali previste dal Piano si sono concluse a maggio 2023.

L'attività di **esercizio della cooperazione** ha assicurato il coordinamento, la corretta collaborazione tra i vari gruppi, il controllo delle operazioni, il mantenimento delle relazioni con l'area Innovazione, formazione e consulenza del Settore Competitività delle imprese e sviluppo dell'innovazione della Regione Emilia-Romagna - Direzione generale agricoltura, caccia e pesca (OPEN FIELDS, CREA, STUARD).

L'azione **studi necessari alla realizzazione del piano** ha previsto la rilevazione dei costi, l'analisi di mercato dei prodotti a base di canapa industriale e la valutazione della sostenibilità economico - finanziaria della filiera, grazie ad indagini ed interviste ad operatori del settore. E' stato possibile effettuare simulazioni di scenari economico-finanziari per una azienda agricola che produce canapa industriale e dare indicazioni per l'ottimizzazione della filiera (OPEN FIELDS, NATURFIBRE).

**L'azione 1** prevedeva prove in campo di coltivazione di canapa industriale in due aziende agricole a regime biologico site in zone interne in area D (Az. Pedrazzi e Ca D'Alfieri) e presso l'Az. Stuard per due stagioni culturali. Le prove si sono svolte nei tempi della domanda di pagamento intermedio (STUARD, AZ. AGRICOLE). Successivamente le attività hanno riguardato l'esecuzione di operazioni post-raccolta e la preparazione e gestione di campioni.

**L'azione 2**, che riguardava la pulizia, stoccaggio e spremitura dei semi di canapa industriale è stata completata con il collaudo del sistema di preriscaldamento del seme di canapa finalizzato ad aumentare la resa di spremitura senza alterare le proprietà organolettiche dell'olio. In questa azione è stato predisposto un documento di progettazione del prototipo di spremitrice sulla base dei risultati ottenuti dalle prove e collaudo (NATURFIBRE, CREA, STUARD).

Le prove di macerazione e pulitura della fibra di canapa con larve di *Hermetia illucens*, previste **nell'azione 3** si sono svolte nel periodo interessato dalla domanda di pagamento intermedio (STUARD). Successivamente le attività hanno riguardato la preparazione e gestione dei campioni per le caratterizzazioni previste nelle azioni 4 e 5.

**Nell'azione 4** sono state effettuate da SITEIA-UNIPR e dal CREA-GB tutte le analisi di laboratorio ed in particolare: analisi della fibra di canapa (CREA); caratterizzazione del profilo nutrizionale dell'olio di canapa (UNIPR-SITEIA); caratterizzazione della frazione proteica della farina di canapa (UNIPR-SITEIA); caratterizzazione del profilo nutrizionale della biomassa larvale (UNIPR-SITEIA); valutazione tecnologica e sensoriale di nuovi formulati per alimenti funzionali (UNIPR-SITEIA); analisi metagenomica del liquido di macerazione (CREA).

**Nell'azione 5** sono stati studiati e ottenuti alimenti arricchiti in farina di canapa (pane, con e senza glutine) e idrolizzati proteici ricchi in peptidi bioattivi destinati all'industria mangimistica, partendo dalla biomassa larvale. Per quel che riguarda il pane con e senza glutine, è stata determinata la percentuale di farina di canapa ottimale, che riuscisse a bilanciare aspetti tecnologici, nutrizionali e organolettici del prodotto. Gli idrolizzati proteici ottenuti dalla biomassa larvale hanno mostrato la presenza di diversi peptidi interessanti per la loro bioattività (antiossidante, anti-ipertensiva, ecc.) dimostrata tramite analisi in silico. L'olio di canapa non è stato impiegato in panificazione, poiché ricco in acidi grassi  $\omega 3$  che possono facilmente ossidarsi o degradarsi in seguito a trattamenti termici. E' stato ipotizzato che per mantenere intatte le proprietà nutraceutiche e organolettiche esso debba essere consumato tal quale. **L'azione 6** era dedicata alla raccolta ed elaborazione dei dati di tutte le prove sperimentali mentre **l'azione 7** alla redazione di linee guida per la produzione di seme e fibra dalla canapa industriale e linee guida per la spremitura del seme e la produzione di formulati per panificazione fortificati con farina di canapa (allegati).

Nell'azione **divulgazione** sono stati realizzati: sito internet di progetto in Italiano ed Inglese, pagina web sul sito internet dei partner, materiale divulgativo (leaflet, roll-up), un video di progetto e altri video divulgativi per Expo-Dubai, pubblicati su youtube e mediante il sito e la pagina Facebook® di Open Fields e sul sito Innovazione dell'Assessorato Agricoltura, Caccia e Pesca, realizzazione di un Open Day, preparazione di articoli divulgativi, partecipazione a convegni internazionali e nazionali, conferenze tecniche e scientifiche. Infine è stato organizzato un convegno finale presso l'Università di Parma. Articoli peer-review sono in preparazione.

L'azione **formazione** ha visto la realizzazione di due corsi online. Gli agricoltori che hanno frequentato

la prima edizione del corso sono stati invitati all'Open Day.

## 1.1 STATO DI AVANZAMENTO DELLE AZIONI PREVISTE NEL PIANO

Azione	Unità aziendale responsabile	Tipologia attività	Mese inizio attività previsto	Mese inizio attività effettivo	Mese termine attività previsto	Mese termine attività effettivo
Esercizio della cooperazione	Open Fields Srl.	Coordinamento e gestione del piano	1	1	24	42
Studi necessari alla realizzazione del piano	Open Fields Srl.	Business planning ed analisi di fattibilità	1	1	24	30
Azione 1	Stuard Srcl.	Prove agronomiche	1	1	21	25
Azione 2	Naturfibre Srl.	essiccazione, stoccaggio e spremitura sementi	7	7	24	36
Azione 3	Stuard Srcl.	Macerazione e pulitura fibra con larve	7	7	21	25
Azione 4	CREA; UNIPR	Analisi di laboratorio	4	7	24	36
Azione 5	UNIPR	Sviluppo di nuovi formulati per alimenti funzionali ed additivi per l'industria mangimistica	4	18	24	36
Azione 6	CREA	Raccolta dati	4	4	24	36
Azione 7	CREA	Redazione report e linee guida	4	4	24	40
Divulgazione	Stuard Srcl.; Open Fields Srl.	Divulgazione attività e risultati	1	1	24	42
Formazione	Agriform	Formazione alle aziende agricole	7	7	24	32

## 2 - DESCRIZIONE PER SINGOLA AZIONE

### 2.1 ATTIVITÀ, RISULTATI E COSTI

Azione	<b>ESERCIZIO DELLA COOPERAZIONE</b>
Unità aziendale responsabile	Open Fields Srl.

<p>Descrizione delle attività</p>	<p>L'azione ha previsto lo svolgimento delle attività necessarie all'attivazione (inclusa la preparazione e registrazione dell'ATS), gestione e funzionamento del gruppo operativo (GO). Il monitoraggio delle attività, delle tempistiche e la comunicazione interna sono stati assicurati attraverso l'organizzazione ed esecuzione di riunioni generali e tra il capofila ed i singoli partner, visite ai partner, raccolta dati e documentazione tecnica.</p> <p>L'azione è stata condotta da Open Fields e dal CREA-GB con la collaborazione di tutti i partner in funzione del proprio ruolo nel piano.</p> <p>(Open Fields) e (CREA-GB), responsabile scientifico, si sono relazionate durante tutto il progetto per garantire il raggiungimento degli obiettivi ed una efficace cooperazione tra i partner. I partner sono stati supportati nella pianificazione delle attività e nell'analisi dei risultati.</p> <p>I partner si sono riuniti in meeting generali, nella maggior parte dei casi svoltisi in videoconferenza con piattaforma webex. Oltre al Kick off meeting, tenutosi il 25/06/2020; le riunioni si sono tenute nelle seguenti date: 21/10/2020; 24 e 25/02/2021; 19/11/2021; 6/12/2021; 5/04/2022, 5/05/2022; 23/01/2023; 12/04/2023.</p> <p>Dopo ogni riunione è stato condiviso con i partner del GO un report delle principali tematiche discusse e delle azioni da intraprendere.</p> <p>Open Fields ha condotto, come previsto, un monitoraggio delle registrazioni dei contratti e delle fatture relative alle attività di progetto in relazione alla conformità con le diverse voci di spesa. Open Fields ha supportato i partner nella preparazione dei documenti necessari alla rendicontazione intermedia e a saldo e nell'utilizzo del SIAG.</p> <p>Open Fields ha predisposto ed inviato le richieste di proroga necessarie a completare le attività previste.</p> <p>Le aziende agricole Cà D'Alfieri e Pedrazzi e Naturfibre S.r.l non presentano domanda di rendicontazione a saldo in quanto tutte le spese sono state sostenute nel periodo entro la rendicontazione intermedia. Di questo le tre aziende sopra citate danno comunicazione mediante una lettera che il capofila Open Fields ha caricato sul SIAG all'interno della propria domanda di pagamento a saldo, come da accordi intrapresi con l'area Innovazione, formazione e consulenza del Settore Competitività delle imprese e sviluppo dell'innovazione della Regione Emilia-Romagna - Direzione generale agricoltura, caccia e pesca.</p> <p>Durante tutto il progetto, Open Fields ha garantito la comunicazione con l'area Innovazione, formazione e consulenza del Settore Competitività delle imprese e sviluppo dell'innovazione della Regione Emilia-Romagna - Direzione generale agricoltura, caccia e pesca.</p>
<p>Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate</p>	<p>Gli obiettivi sono stati pienamente raggiunti. Vi è stato uno scostamento significativo tra la durata del progetto indicata sul Piano e quella effettiva.</p> <p>La durata del progetto era stata indicata sul Piano del GO in 24 mesi. Tuttavia, a causa del contesto globale (COVID-19) in cui il piano si è trovato ad operare nelle annualità 2020 e 2021, alcune attività, tra cui la formazione, hanno avuto un rallentamento. Per completare le attività progettuali dunque, oltre ai 30 mesi massimi previsti da bando regionale (DGR n. 1098 del 01/07/2019), sono state richieste una proroga di 90 giorni che ha prorogato il termine del progetto al 23/12/2022 (approvata con DETERMINAZIONE Num. 12752 del 01/07/2022) ed una ulteriore proroga di 9 mesi, con termine al</p>

23/09/2023, come previsto dalla Delibera Num. 833 del 23/05/2022 (approvata con DETERMINAZIONE Num. 16795 del 07/09/2022).

Le variazioni tecniche e finanziarie rispetto al Piano di lavoro sono state descritte nelle varianti approvate con DETERMINAZIONE Num. 13993 del 23/07/2021 e DETERMINAZIONE Num. 15257 del 04/08/2022.

Tali varianti, dovute in larga parte all'emergenza COVID-19, in particolare hanno riguardato:

- variazioni di bilancio CREA-GB nell'ambito dell'azione 4 per sostituzione della borsa di studio annuale inerente allo studio della composizione proteica della farina di canapa con l'acquisto reagenti di laboratorio finalizzati all'analisi di proteine della canapa e DNA microbico del liquido macerante;

- riduzione del budget di Naturfibre per mancato acquisto del prototipo, dopo aver ottenuto l'autorizzazione a variare il fornitore, e conferma dell'impegno di Naturfibre a completare lo studio di progettazione del prototipo (azione 2).

Segnaliamo che la trasferta presso la ditta Tecnoimpianti per il collaudo del prototipo è stata rendicontata nell'ambito dell'azione esercizio della cooperazione in quanto attività svolta come in collaborazione con Naturfibre in qualità di referente scientifico e non avendo previsto costi per trasferte e personale nell'ambito dell'azione 2.

## COSTI ESERCIZIO DELLA COOPERAZIONE

### PERSONALE

Cognome e nome	Mansione/ qualifica	Attività svolta nell'azione	Costo orario	Ore	Costo totale
SILVIA FOLLONI - OPEN FIELDS SRL	impiegato TI per anno 2021-2022 / quadro da anno 2023	gestione attività di progetto	€ 27 per anno 2021-2022 / € 43 da anno 2023	101,50	€ 3.300,50
STEFANO GUIDI - OPEN FIELDS SRL	impiegato TI part time 80%	attività amministrative relativa alla cooperazione	€ 27,00	73,50	€ 1.984,50
ILARIA MAZZOLI - OPEN FIELDS SRL	impiegato TI part time 80%	gestione attività di progetto	€ 27,00	5,00	€ 135,00
ROBERTA ROSSETTI - AZ. STUARD	imp. Agrario 3° categoria - tempo indeterminato	attività amministrative relativa alla cooperazione	€ 27,00	18,00	€ 486,00
ANTONIO ROSSETTI - OPEN FIELDS SRL	impiegato TI	gestione attività di progetto	€ 27,00	29,50	€ 796,50
VITA MARIA CRISTIANA MOLITERNI - CONSIGLIO PER LA RICERCA IN AGRICOLTURA E L'ANALISI DELL'ECONOMIA AGRARIA	impiegato TI part time 80%	coordinamento scientifico	€ 33,00	45,00	€ 1.485,00
Totale:					€ 8.187,50

## TRASFERTE

nome e cognome	Descrizione	Costo
	Collaudo prototipo macchina spremitura realizzato dalla ditta Tecnoimpianti srl - 16/06/2022	€ 35,50
Totale:		€ 35,50

Azione	<b>STUDI NECESSARI ALLA REALIZZAZIONE DEL PIANO</b>
Unità aziendale responsabile	Open Fields srl. con il supporto di CREA, UNIPR, STUARD
Descrizione delle attività svolte	<p>Azioni 2.1 e 2.3 - Rilevazione dei costi e raccolta delle informazioni su costi e benefici del Piano</p> <p>Sono state portate avanti le seguenti attività:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Riunioni con i partner del progetto (in particolare Naturfibre), per la definizione delle catene del valore associate al progetto, i costi e i ricavi potenziali</li> <li>• Interviste a potenziali clienti (si veda il punto 2.2 seguente)</li> </ul> <p><u>Azione 2.2. Disamina del mercato</u></p> <p>Sono state portate avanti le seguenti attività:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Raccolta ed organizzazione di materiale esistente per la definizione del mercato potenziale</li> <li>• Interviste a potenziali clienti, per comprenderne le esigenze nei confronti dei fornitori, oltre che identificare i potenziali concorrenti con relativi punti di forza e debolezza. In particolare, sono stati intervistati i seguenti soggetti, organizzati per settore:</li> </ul> <p><b>COSTRUZIONI</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Senini: azienda lombarda che produce elementi di canapa per l'edilizia (mattoni, intercapedini)</li> <li>• Calcecanapa: azienda piemontese che commercializza prodotti per l'edilizia a base di canapa (calce),</li> <li>• Edilcanapa, Mosciano S. Angelo (TE) di Metalineasrl</li> </ul> <p><b>TESSILE -ABBIGLIAMENTO</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Azienda Parramatta-ICOMAS srl, Terre Roveresche (PU)</li> <li>• Toscano 100x100 srl, Agliana (PI)</li> <li>• Tessitura La Colombina, Eredi Colombo, Badoere di Morgano (TV)</li> <li>• Davifil, Benna (BI)</li> <li>• Francesca Tronca, Casorate Sempione (VA),</li> <li>• Maekotessuti, Milano,</li> <li>• Opera Campi, Parma (PR)</li> </ul> <p>Parallelamente, sono stati portati avanti contatti in grado di fornire concrete prospettive di sviluppo alle innovazioni sviluppate a livello progettuale. Il team di progetto ha infatti interagito</p>

strettamente con diversi interlocutori interessati ai suoi sviluppi, tra i quali citiamo principalmente:

- La testata giornalistica Lampoon (<https://www.lampoon.it/sostenibilita/canapa/>), impegnata a porsi come "catalizzatore" nel perseguimento della produzione di filati italiani di alta qualità;
- Safilin (<https://www.safilin.fr/>), contatto attivato con la prospettiva di attivare una relazione di collaborazione tra Italia e Francia. Si tratta di uno storico produttore di filati naturali di alta qualità, con una base particolarmente ampia di aziende agricole, potenziale acquirente di fibra lunga anche sottoposta alla sola fase di macerazione.
- Salewa – Oberalp (<https://www.salewa.com/it-it>), espressione dell'interesse dell'area trentina per la produzione di prodotti in canapa. Da alcuni anni l'azienda realizza vestiario tecnico realizzato in canapa. Ecco alcune notizie molto recenti riguardanti quest'azienda:

#### Azioni 2.4 e 2.5 – valutazione della sostenibilità economico – finanziaria e indicazioni per l'ottimizzazione della filiera

Nell'ambito dell'analisi svolta, la sfida è stata quella di modellizzare un'intera filiera, tenendo conto di un aspetto molto importante: sul fronte economico-organizzativo (ma anche di conseguimento del know-how necessario ad ottimizzare ciascuna fase), è sostanzialmente non fattibile la costruzione e gestione, da parte di un singolo operatore, di una filiera di valorizzazione della canapa che parta dalla fase agricola e pervenga fino al mercato finale, diramandosi, per di più, nelle singole sotto-filiere necessarie alla valorizzazione di tutti i prodotti.

Ciò a causa della complessità delle apparecchiature necessarie per la lavorazione, delle economie di scala che determinano il dimensionamento minimo degli impianti e delle competenze tecnologiche e relazionali che costituiscono fattori critici di successo nell'accesso ai mercati.

La modellizzazione del conto economico realizzata, pertanto, tiene conto di questo aspetto e prevede che:

- l'azienda agricola (o meglio, un insieme di aziende agricole) arrivi alla produzione di semi (filiera olio-farine) e steli (per le filiere tessile ed edile), eventualmente ricorrendo al conto lavorazione per ottenere l'olio dai propri semi;
- operatori successivi concentrino gli acquisti in impianti dotati di sufficiente efficienza per rendere i prezzi sostenibili e procedano alle fasi di lavorazione successive (spremitura per la produzione di olio e farina; stigliatura, macerazione, tessitura per l'ottenimento della fibra, dei filati e/o dei materiali per l'edilizia...).

Per la costruzione di scenari relativi alla catena del valore della filiera si è, pertanto, impiegato un foglio di calcolo che ha considerato separatamente le diverse fasi.

#### I PRODOTTI E IL QUADRO COMPETITIVO

Riguardo all'accesso al mercato, ricordiamo che la recente pronuncia della Corte di Giustizia dell'Unione Europea (CJE) nella causa C-663/18 del 19.11.2020, che conferma la natura di prodotto agricolo della cannabis sativa L., con La Legge Regionale Piemonte n. 12 del 28 maggio 2021, pubblicata nel BUR in data 3 giugno 2021, è a tutti gli effetti entrata a far parte dell'Ordinamento italiano. Il Governo, infatti

– come da deliberazione del Consiglio dei ministri del 29.07.2021 – la norma non è impugnata, non essendo rilevati elementi eccedenti la competenza regionale né contrasti con la normativa gerarchicamente sovraordinata. La Regione Piemonte risulta in linea con il progetto di legge recentemente trasmesso a Bruxelles dalla Francia ove si consente l'utilizzo della pianta di canapa nella sua interezza (fiori e foglie compresi) per le varie finalità industriali, in attuazione delle indicazioni fornite dalla sentenza della CJE.

A partire dalla fattibilità "normativa" dello sviluppo delle filiere della canapa, occorre che siano sviluppati robusti modelli di business affinché il prodotto raggiunga i suoi diversi mercati (B2B e B2C) in modo efficiente, anche in relazione con i relativi prodotti sostitutivi.

Il report finale (febbraio 2021) dell'EIP-AGRI Focus Group Sustainable industrial crops individua alcuni spunti interessanti, a partire dalla considerazione chiave secondo la quale per l'adozione sostenibile delle colture industriali è fondamentale la presenza di un forte modello di business e mercato. Gli esperti del focus group europeo hanno compilato una tabella di inventario delle potenziali opportunità di mercato per le colture industriali e ne hanno evidenziato i benefici, considerando gli aspetti sociali, economici e ambientali. Tra le sei vie commerciali più promettenti per le colture industriali nel report figurano: la canapa per prodotti farmaceutici / integratori / cosmetici; la fibra di canapa per tessili e carta, le colture da fibra per materiali da costruzione (canapa/lino/kenaf).

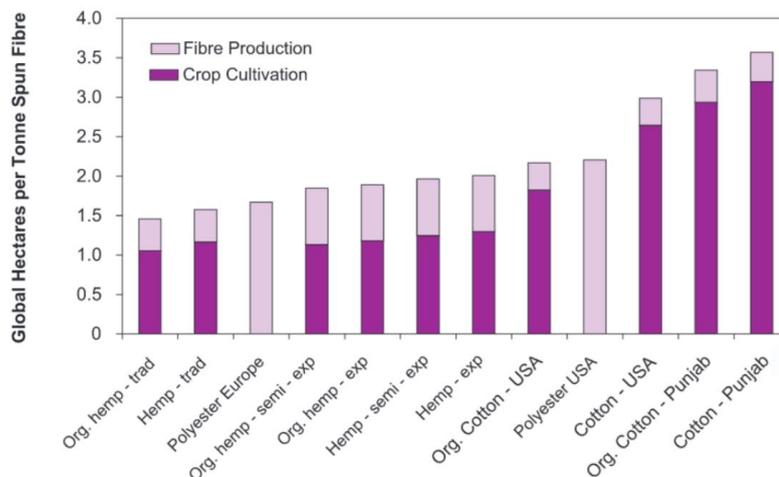
Sul fronte delle esternalità, il report evidenzia come colture come il salice, la canapa, la camelina, le piante aromatiche e il miscanto richiedano una minore lavorazione del terreno, quindi causino minore disturbo dell'habitat, rispetto alla maggior parte dei seminativi regolari. Tali colture tendono inoltre ad aver bisogno di meno erbicidi e pesticidi. Inoltre, colture come la canapa hanno una stagione di fioritura complementare che garantisce la disponibilità di polline quando c'è una scarsità da altre colture.

Dal focus group sono emersi, in uno schema organizzato per colture industriali, una serie di spunti riguardanti la canapa, organizzati nella tabella che segue, che abbiamo integrato con nostre considerazioni (in azzurro). La tabella comprende solo alcune delle possibili applicazioni, tuttavia è interessante il metodo applicato nell'analisi, che classifica gli impatti della coltivazione non solo sul piano economico, ma anche sociale ed ambientale.

Vanno sottolineate, nel caso della canapa, le considerazioni legate al tema, oggi centrale nelle scelte strategiche aziendali, dello stoccaggio del carbonio (Report finale dell'EIP Agri focus group "Sustainable Industrial crops"). La biomassa prodotta corrisponde a un potenziale di stoccaggio del carbonio: la canapa cresce rapidamente, in 4-5 mesi, fino ad un'altezza di 5 metri e si radica in profondità fino a 3 metri. Una tonnellata di steli di canapa contiene 0,7 tonnellate di cellulosa (contenuto di carbonio: 45%), 0,22 tonnellate di emicellulosa (48%) e 0.06 tonnellate di lignina (40%), quindi 0.445 tonnellate di carbonio assorbito dall'atmosfera (44,46% dello stelo s.s.). Moltiplicando per 44/12 per convertire il dato sul carbonio in anidride carbonica, si ottengono 1.6 tonnellate di CO<sub>2</sub> assorbita per tonnellata di canapa. A una resa di 5,5-8 tonnellate per ettaro corrispondono da 9 a 13 tonnellate di CO<sub>2</sub> assorbita.

Questo aspetto può assumere crescente rilevanza con il progressivo configurarsi di un mercato europeo dei crediti di carbonio, sempre meno imperniato su compensazioni in ambito internazionale e sempre più sull'adozione di pratiche agricole in prossimità dei luoghi dove

avvengono le emissioni.



IMPRONTA ECOLOGICA DELLA PRODUZIONE DI 1 TONNELLATA DI FIBRE FILATE IN DIVERSI CASI STUDIATI (CHERRETT ET AL., 2005)



BIOMASSA FOGLIARE CHE RIMANE A TERRA  
LA RACCOLTA: 2,5-3,0 t/ha



BIOMASSA RADICALE CHE RIMANE NEL TERRE  
LA RACCOLTA: 2,5-3,5 t/ha

BIOMASSA TOTALE CHE RIMANE NEL TERRE  
LA RACCOLTA: 5,0-6,5 t/ha

Fonte: Tommaso Maggiore, "Il ruolo della canapa nei sistemi colturali: passato e futuro", che cita Cherret et al., 2005

#### AZIONE 2.2 – DISAMINA DEL MERCATO

Ritornando al progetto Caterpillar in particolare, la valorizzazione della pianta monoica perseguita si focalizza:

- sugli usi alimentari dei prodotti (olio e farina da seme, formulati per la panificazione contenenti farina e olio di canapa);
- sugli usi tessili della fibra;
- grazie alla particolare procedura per la pulitura della fibra macerata, sulla realizzazione di additivi per l'industria mangimistica.

L'analisi dei prodotti sostitutivi e della fattibilità economica si basa

sullo schema stesso del progetto.

Troviamo, pertanto, utile sintetizzare in una tabella (vedi pagine successive) i prodotti ottenibili, i mercati e segmenti di riferimento, i fattori critici di successo in tali segmenti, i principali prodotti sostitutivi (competitor a parità di funzione d'uso ed occasione di utilizzo) e gli elementi chiave della proposta di valore del prodotto derivante dalla canapa rispetto al benchmark.

L'analisi dei mercati di sbocco relativa all'azione Studi è stata effettuata in sinergia con l'azione di Formazione, in modo da poter fornire agli allievi indicazioni sulle esigenze degli operatori ed eventualmente alcuni contatti utili.

In particolare, si sono sondati i seguenti segmenti di mercato:

- tessile - abbigliamento;
- costruzioni.

Come sopra riportato, le interviste hanno coinvolto diversi soggetti, articolati per settore. Inoltre, sono stati portati avanti contatti in grado di fornire concrete prospettive di sviluppo alle innovazioni sviluppate a livello progettuale. Il team di progetto ha infatti interagito strettamente con diversi interlocutori interessati ai suoi sviluppi.

Di seguito si riportano alcuni dati relativi alle rese dei principali prodotti ottenibili dalla pianta di canapa ed esempi di impieghi:



## CALCECANAPA®

CalceCanapa® è un biocomposto completamente naturale, che si ottiene dalla mescolanza della calce e della canapa.

Calce Piasco, in collaborazione con La Banca della Calce Srl e I.V.A.S. Spa, ha messo a punto una linea di prodotti funzionali, di facile applicazione e totalmente eco-compatibili a base di calce magnesiaca e canapulo (parte legnosa della canapa).  
I vantaggi sono numerosi:  
CalceCanapa® apre le porte a una nuova bioedilizia sostenibile, fortemente innovativa.





I contatti attivati e le relative riflessioni sul mercato hanno posto in evidenza i seguenti elementi:

#### **A) Mercato della fibra tessile e del tessile - abbigliamento**

- Gli operatori del settore sono convinti del potenziale di mercato, ma evidenziano nel presente alcune difficoltà nel conseguire il posizionamento desiderato su un segmento di popolazione sufficientemente ampio. Questo fatto non viene considerato come un limite permanente, bensì un elemento di una fase transitoria nella quale occorre continuare a procedere nel far aumentare l'awareness della clientela nei confronti dei plus del prodotto.
- Per quanto riguarda la produzione di filati derivanti da filiere nazionali (molti filati arrivano, infatti, attualmente dall'estero e spesso da paesi extraeuropei), è necessario un investimento ampio e complesso per la ricostituzione, su nuovi standard di qualità ed efficienza, della filiera produttiva della fibra, soprattutto ai fini dell'ottenimento di una fibra lunga e regolare. Si tratta, pertanto, di recuperare una competitività nei confronti di concorrenti, soprattutto asiatici, che offrono un prodotto già standardizzato a per il quale hanno sviluppato economie di scala.
- Va tuttavia osservata, da parte degli operatori, un intenso potenziale interesse della filiera tessile nei confronti della disponibilità di fibra italiana, importante, viste le elevate distanze attualmente percorse da questa materia prima, anche per quanto riguarda i temi della sostenibilità.

#### **B) Mercato dei prodotti per l'edilizia**

- Il materiale edile a base di canapa viene considerato un inerte a tutti gli effetti, che dev'essere fornito rispettando precisi e costanti parametri tecnologici qualitativi. Le sfide da cogliere da parte delle nascenti filiere nazionali riguardano pertanto il raggiungimento di volumi di fornitura continui e regolari, anche sul piano delle caratteristiche del prodotto.

Nella tabella che segue si riportano i prodotti, il mercato di riferimento ed i principali elementi competitivi:

Prodotto output del progetto	Mercato di riferimento	Principali fattori critici di successo	Principali prodotti sostitutivi	Elementi della Value Proposition
Dal seme: olio	Alimenti funzionali <ul style="list-style-type: none"> <li>• omega 3, 6, 9</li> <li>• aminoacidi</li> <li>• antiossidanti</li> </ul>	Sviluppo di distintività rispetto alla vasta gamma di prodotti in commercio Impiego sia B2C che B2B (ingrediente), allo scopo di sviluppare massa critica e capacità di comunicazione Disponibilità di letteratura commerciale con solidi fondamenti scientifici	Altri ingredienti ed integratori in grado di fornire analoghi apporti nutrizionali (non solo a livello intrinseco ma anche e soprattutto a livello percepito)	Il prodotto può rispondere all'esigenza del consumatore di alimenti funzionali in grado di migliorare l'apporto di sostanze nutritive, preferibilmente ottenuti da filiera nazionale caratterizzate da sostenibilità ambientale.
Dal seme: pannello e quindi farina	Alimenti per celiaci e intolleranti al glutine	Caratterizzazione nutrizionale ed evidenziazione dei fattori nutrizionali principali	Altre farine prive di glutine con un buon profilo nutrizionale	Gli alimenti per persone celiache o intolleranti al glutine necessitano un miglioramento continuo sul piano nutrizionale, ad esempio dal punto di vista dell'indice glicemico, del tenore proteico e dell'apporto di fibre
Dal processo di pulitura post-macerazione: biomassa larvale e quindi pannelli di biomassa larvale	Additivi per alimentazione animale	Apporto proteico, disponibilità, conservabilità, prezzo accessibile (a regime)	Altri alimenti proteici per animali	Filiera nazionale / locale (evitamento del ricorso ai mercati internazionali)
Fibra tessile	Tessile - abbigliamento	Prodotti naturali ad alta resistenza: il mercato del tessile - abbigliamento va, e deve andare a causa dell'impatto ambientale (ad esempio per quanto riguarda le microplastiche), verso l'opposto di quello attuale, caratterizzato da capi a basso costo "usa e getta". Il capo in canapa è naturale, duraturo, privo di plastiche e proviene da una filiera che impiega un minor quantitativo di input (acqua, fertilizzanti ...) rispetto ad altre fibre tessili naturali.	Capi di alta qualità ottenuti da altre filiere naturali (con la variabile "impatto ambientale" come fattore competitivo di rilievo)	L'esigenza di compiere scelte sostenibili tende a diffondersi presso tutte le fasce di popolazione. Naturalmente, il fattore costo rimane rilevante per alcuni segmenti di mercato.
Canapulo	Edilizia (pannelli isolanti e fonoassorbenti)	Materiale naturale, da coltivazione sostenibile, che rappresenta uno stoccaggio di carbonio significativo.	Altri prodotti edili con analoghe funzionalità	L'orgoglio di un'abitazione più sostenibile, anche perché ben coibentata
Canapulo	Edilizia: intonaci, cappotti isolanti, biomattoni	Materiale naturale, da coltivazione sostenibile, che rappresenta uno stoccaggio di carbonio significativo.	Altri prodotti edili con analoghe funzionalità	L'orgoglio di un'abitazione più sostenibile, anche perché ben coibentata

## AZIONI 2.1, 2.3, 2.4, 2.5 SIMULAZIONE DI COSTI, RICAVI E SOSTENIBILITÀ: L'OTTIMIZZAZIONE DELLA FILIERA

Data la complessità di un prodotto che, più di molti altri, ha la caratteristica di declinarsi in un ventaglio di filiere, richiedendo una serie di decisioni strategiche, ciascuna implicante significativi investimenti, è naturale che diverse realtà si siano impegnate nella realizzazione di studi e simulazioni. Citiamo, in particolare due modelli di calcolo relativi soprattutto alle fasi produttive agricole, uno elaborato dall'Università del Missouri (<https://extension.missouri.edu/publications/g669>) e l'altro dall'Università del Kentucky (<http://agecon.ca.uky.edu/budgets>).

## LA CATENA DEL VALORE E LA SOSTENIBILITÀ DELLA FILIERA: LE PREMESSE

Nell'ambito del progetto Caterpillar, tuttavia, ci si è impegnati a modellizzare un'intera filiera, tenendo conto di un aspetto molto importante: sul fronte economico-organizzativo (ma anche di conseguimento del know-how necessario ad ottimizzare ciascuna fase), è sostanzialmente non fattibile la costruzione e gestione, da parte di un singolo operatore, di una filiera di valorizzazione della canapa che parta dalla fase agricola e pervenga fino al mercato finale, diramandosi, per di più, nelle singole sotto-filieri necessarie alla valorizzazione di tutti i prodotti.

Ciò a causa della complessità delle apparecchiature necessarie per la lavorazione, delle economie di scala che determinano il dimensionamento minimo degli impianti e delle competenze tecnologiche e relazionali che costituiscono fattori critici di successo nell'accesso ai mercati.

L'analisi dei mercati di sbocco e la modellizzazione del conto economico, pertanto, tengono conto di questo aspetto e prevedono che:

- l'azienda agricola (o meglio, un insieme di aziende agricole) arrivi alla produzione di semi (filiera olio-farine) e steli (per le

filiera tessile ed edile), eventualmente ricorrendo al conto lavorazione per ottenere l'olio dai propri semi;

- operatori successivi concentrino gli acquisti in impianti dotati di sufficiente efficienza per rendere i prezzi sostenibili e procedano alle fasi di lavorazione successive (spremitura per la produzione di olio e farina; stigliatura, macerazione, tessitura per l'ottenimento della fibra, dei filati e/o dei materiali per l'edilizia...).

Per la costruzione di scenari relativi alla catena del valore della filiera si è, pertanto, impiegato un foglio di calcolo che consideri separatamente le principali fasi.

Nello scenario considerato, in primo luogo si è considerato un dimensionamento minimo della filiera, che preveda circa mille ettari di produzione. E' possibile, pertanto, inserire nella tabella delle rese: 500 ha, 1000 ha, e poi dimensioni superiori, con incrementi di 100 ettari, fino a 2.500 ettari. Con tale dimensionamento, non si ha, pertanto, presente, una sola azienda agricola, bensì un insieme di aziende (ad esempio in uno dei molti distretti che stanno provando a prendere avvio), che immette la propria produzione di mercato in forma consorziata. Questa scelta risponde alla constatazione dell'esistenza di economie di scala nel processo (a partire dai necessari investimenti in strumentazioni dedicate), tali da rendere opportuno ragionare su un dimensionamento minimo.

E' quindi stata realizzata una prima tabella che mostra la struttura delle rese per l'insieme dei prodotti derivati dalla canapa nell'ambito del progetto Caterpillar. Naturalmente, le rese considerate fanno riferimento ad una campagna "media", priva di problematiche. Essendo tuttavia possibili, come in tutte le produzioni agricole, fluttuazioni nelle rese, al riguardo va considerato come i costi di produzione agricola, a parità di filiera, possano rimanere fissi, perché sostenuti prima del verificarsi di eventuali calamità, con la diminuzione delle rese che ne farebbe aumentare l'incidenza a livello di costi unitari. Nelle fasi successive della filiera, invece, buona parte dei costi risulterebbe variabile, in relazione ai volumi di materia prima lavorata.

## LA CATENA DEL VALORE E LA SOSTENIBILITÀ DELLA FILIERA: LA SIMULAZIONE E LE SUE IMPLICAZIONI

Il prospetto delle rese, ipotizzando una superficie coltivata complessiva di mille ettari, è riportato nella tabella seguente:

		PARAMETRI					
	Ettari dedicati alla coltura	ha	1000				
	Resa complessiva canapa	t/ha	8,00				
	<b>RESE FASE AGRICOLA</b>	%		t/ha	check	tonnellate totali	
TOTALE	Resa semi essiccati e vagliati	%; t/ha	10%	0,80		800,00	
	Resa steli	%; t/ha	80%	6,40		6.400,00	
	Residui della mietitura	%; t/ha	10%	0,80		800,00	
	di cui						
	canapulo	% degli steli; t/ha	65%	4,16		4.160,00	
	fibra	% degli steli; t/ha	25%	1,60	check	1.600,00	
	polveri	% degli steli; t/ha	10%	0,64	0%	640,00	
	<b>RESE LAVORAZIONE</b>				kg		
Lav. dei semi	Resa olio spremuto a vite	% dei semi raccolti e puliti e t/ha	15%	0,12	kg: 120	120,00	
	Scarto	% dei semi raccolti e puliti e t/ha	5%	0,04	check	40,00	
	Resa pannello greggio	% dei semi raccolti e puliti e t/ha	80%	0,64	0%	640,00	
	di cui						
	farina tipo semola	% del pannello e t/ha	50%	0,32		320,00	
	polvere proteica fine (50 micr)	% del pannello e t/ha	20%	0,13	check	128,00	
	crusca (uso zootecnico)	% del pannello e t/ha	30%	0,19	0%	192,00	
Lav. degli steli	Resa canapulo	% dello stelo; t/ha	60%	3,84		3.840,00	
	Resa fibra grezza ante lavoraz.	% dello stelo; t/ha	25%	1,60		1.600,00	
	di cui: fibra tessile macerata e pettinata	% della fibra grezza; t/ha	35%	0,56		560,00	
	di cui: filo	% della fibra macerata	30%	0,17			
	Resa polveri	% dello stelo; t/ha	5%	0,32	check	320,00	
	Scarti da biomassa	% dello stelo; t/ha	10%	0,64	0%	640,00	

E' stata, successivamente, inserita una tabella nella quale sia possibile valutare l'impatto degli investimenti. Tale tabella è strutturata per l'intera filiera, pur nella consapevolezza che le spese saranno affrontate in modo separate dagli operatori di ciascuna fase della filiera (e di ciascun segmento di mercato, a seconda che si tratti dei prodotti alimentari, dei prodotti per l'alimentazione animale, dei prodotti per l'edilizia o di quelli per l'industria tessile). Nella tabella è possibile inserire il tempo in anni nel quale si desidera di poter "ammortizzare" l'investimento (payback): ciò dà luogo alla quota annua di investimento da sottrarre come "ammortamento" dal conto economico.

**Data l'elevata complessità di questa filiera, si è optato per la massima semplificazione possibile: un aspetto di cui è indispensabile tenere conto in caso di valutazioni più mirate ed accurate.** Si è, pertanto, ipotizzato che tutti gli investimenti siano affrontati nel primo anno di attività, evitando anche di tener conto di tassi d'interesse e dell'inflazione. Sotto queste ipotesi semplificatrici, la tabella degli investimenti risulta come segue. Il suo scopo è quello di permettere una valutazione di tipo "make or buy" (ad esempio ricorrendo, nei primi anni di attività, alla produzione presso terzi in conto lavorazione e la scelta tra l'acquisto di apparecchiature nuove oppure usate.

Gli investimenti previsti (i dati inseriti sono puramente indicativi e fanno riferimento all'ipotesi di un payback in 10 anni) sono indicati nella seguente tabella:

<b>Totale investimenti</b>			<b>€ 1.556.000,00</b>	<b>€ 155.600,00</b>
<b>Coltivazione</b>				
<b>Essicazione</b>	Essicatoio	si	€ 50.000,00	€ 5.000,00
<b>Raccolta (semi, steli)</b>				
	Deve poter operare efficacemente in funzione della altezza delle piante, della densità della coltivazione e del prodotto da raccogliere (steli, semi, ma è possibile, anche se non considerato nel presente modello, che si vogliono raccogliere anche cime)	si	€ 100.000,00	€ 10.000,00
<b>Macchina per la</b>				
<b>Stigliatura (liberazione fibre dal nucleo legnoso)</b>				
	Impianto che piega ripetutamente gli steli e separa la porzione midollare dei fusti dalle fibre	si	€ 1.000.000,00	€ 100.000,00
<b>Apparecchiatura</b>				
<b>Macerazione</b>				
<b>Bioreattore</b>		si	€ 200.000,00	€ 20.000,00
<b>Pulitura dopo macerazione</b>				
	Attrezzatura da specificare	si	€ 100.000,00	€ 10.000,00
<b>Cardatura, pettinatura</b>				
	Attrezzatura da specificare	si	€ 50.000,00	€ 5.000,00
<b>Filatura</b>				
	Attrezzatura da specificare	no	€ 3.000,00	
<b>Pressatura seme per ottenere olio</b>				
	Estrattore	si	€ 20.000,00	€ 2.000,00
<b>Imbottigliamento olio</b>				
	Confezionatrice	si	€ 3.000,00	€ 300,00
<b>Macinazione seme per produrre farine</b>				
	Apparecchiatura per macinazione	si	€ 10.000,00	€ 1.000,00
<b>Confezionamento farine</b>				
	Confezionatrice	si	€ 3.000,00	€ 300,00
<b>Vagliatura del canapulo</b>				
	Cippatore	si	€ 20.000,00	€ 2.000,00

Vi sono ulteriori avvertenze di cui tenere conto per quanto riguarda gli investimenti. Un caveat importante è quello secondo il quale, in caso di acquisto di un'apparecchiatura, il costo delle operazioni possa risultare, in fase iniziale, significativamente maggiore di quello del conto. Si ipotizza, infatti, che esista una curva di apprendimento tale per cui il terzista potrebbe essere più veloce nelle operazioni, o affrontare costi minori per la maggiore scala di acquisto dei diversi

input, o ancora saper ottimizzare al meglio l'uso delle macchine, oppure ancora ottenere rese maggiori grazie alla propria abilità. L'acquisto di macchinari renderebbe, inoltre ancora più complessi i calcoli, questa volta relativi ai ricavi, nel momento in cui si voglia ipotizzare tra le fonti di reddito anche eventuali servizi verso terzi in conto lavorazione, attivati allo scopo di massimizzare l'intensità di utilizzo della capacità produttiva.

L'analisi economica è stata effettuata in un'ottica di "catena del valore": si sono, pertanto, considerati i costi, i ricavi e la voce "ricavi meno costi" di possibili filiere.

Per quanto riguarda una fase agricola finalizzata alla produzione di semi e steli, una possibile tabella dei costi potrebbe essere la seguente, che evidenzia una stima, nello scenario considerato, di circa 2.500 euro per ettaro. Le celle in arancione sono quelle in cui vanno inseriti i dati per effettuare la simulazione. Anche in questo caso, si è scelto di semplificare inserendo un dato in condizioni "normali", per intenderci anteriori a quelle attuali di tensioni e volatilità relative ai costi degli input: è comunque possibile effettuare simulazioni introducendo anche questi aspetti.

Possibili costi della fase agricola sono analizzati nella seguente tabella:

COSTI				
Voce di costo	Unità di misura	Valore iso o variabile		
A) FASE AGRICOLA		COSTO PER ETTARO (€/HA)	F o V	COSTO TOTALE
Affitto del terreno	€/ha	€ 800,00	F	€ 800.000,00
Lavorazione del terreno	€/ha	€ 200,00	F	€ 200.000,00
Aratura	€/ha	€ 80,00		€ 80.000,00
Estirpatura	€/ha	€ 30,00		€ 30.000,00
Rotante	€/ha	€ 50,00		€ 50.000,00
Vibrocolter	€/ha	€ 40,00		€ 40.000,00
Trattamenti	€/ha	€ 340,00	F	€ 340.000,00
Input occorrente	kg/ha	€ 50,00		€ 50.000,00
Costo input medio	€/kg	€ 6,00		€ 6.000,00
Costo della distribuzione	€/ha	€ 40,00		€ 40.000,00
Semina	€/ha	€ 475,00	F	€ 475.000,00
Seme occorrente	kg/ha	50,00		€ 50.000,00
Costo del seme	€/kg (NB)	€ 8,00		€ 8.000,00
Distribuzione del seme (costo contoterzista)	€/ha	€ 75,00		€ 75.000,00
Concimazione				€ 0,00
Costo del contoterzista (che acquista anche il prodotto)	€/ha	€ 100,00	F	€ 100.000,00
Raccolta (costo del contoterzista)	€/ha	€ 630,00	F	€ 630.000,00
Mieti-trebbiatura del seme	€/ha	€ 250,00		€ 250.000,00
Essicazione / vagliatura	€/ha	€ 200,00		
Falcia-andanatura (ranghinatura) steli	€/ha	€ 60,00		€ 60.000,00
Raccolta ed imballaggio	€/ha	€ 120,00		€ 120.000,00
<b>TOTALECOSTO FASE AGRICOLA</b>	€/ha	<b>€ 2.545,00</b>		<b>€ 2.545.000</b>

Nello scenario ipotizzato, gli agricoltori che dispongono di 1000 ettari possono commercializzare gli steli, a 80-100 euro a tonnellata per un totale di 6.400 tonnellate a 80 euro a tonnellata = 512000 euro, e i semi prodotti circa 800 tonnellate per 1000 ettari, ad un prezzo di circa 1.700 euro a tonnellata = 1360000 euro. Il totale, pari a 1872000 euro risulterebbe in questo caso inferiore ai costi di produzione. Tuttavia, qualora i produttori si dotassero di un impianto di spremitura e di macinazione, oppure ricorressero all'esecuzione di queste fasi da parte di terzi, commercializzando poi il proprio olio, essi potrebbero aggiudicarsi una quota decisamente più significativa di valore aggiunto. Essi infatti commercializzerebbero sempre gli steli (circa 500 mila euro), ma aggiungerebbero, nel caso fossero in grado di gestire adeguatamente la commercializzazione, anche i ricavi derivanti da olio.

farine, crusche e persino biomasse residue che, con i volumi ed i prezzi stimati (sempre considerando 1000 ettari messi a produzione), darebbero luogo ad un ricavo di 6.9 milioni di euro. La differenza tra costi e ricavi generata, in questo caso positiva e superiore a 3 milioni di euro, potrebbe, fatte le debite valutazioni, coprire sia la quota di payback di un investimento in un impianto di spremitura, macinazione e confezionamento.

I ricavi a confronto e le ipotesi di costo sono riportati nelle seguenti tabelle:

<b>RICAVI</b>				
<b>Output, prodotto o co-prodotto</b>	<b>Volume ottenuto da commercializzazione</b>	<b>Possibile prezzo di vendita (che sia dettaglio o ingrosso, quello che conta è il prezzo inserito)</b>		<b>Ric</b>
	<b>tonnellate</b>	<b>€/t</b>		
<b>a) Da semi e steli</b>				
Steli	6.400,00	€ 80		512.0
Semi essiccati e vagliati, per la trasformazione alimentare	800,00	€ 1.700		1.360.0
<b>TOALE DA SEMI E STELI</b>				<b>1.872.0</b>
<b>B) Con la lavorazione dei semi (in proprio o da terzi)</b>				
Prodotti della lavorazione dei semi				
Dai semi: olio spremuto a vite	120,00	€ 30.000		3.600.0
Dai semi: farina	320,00	€ 5.000		1.600.0
Dai semi: polvere proteica	89,60	€ 12.000		1.075.2
Dai semi: crusca	134,40	€ 150		20.1
Scarti da biomassa, residui della mietitura, polveri	2.080,00	€ 30,00		62.4
<b>Totale da olio e farina</b>				<b>6.357.7</b>
<b>Steli</b>	<b>6400</b>	<b>80</b>	<b>0</b>	<b>512.0</b>
<b>TOTALE STELI, OLIO E FARINA</b>				<b>6.869.7</b>

<b>COSTI DI TRASFORMAZIONE DEI SEMI, IN PROPRIO SE SI DISPONE DEI MACCHINARI, OPPURE IN CONTO LAVORAZIONE</b>				
<b>PREPARAZIONE DEL SEME (COMUNE SIA A OLIO CHE A FARINA)</b>				
Attività	Dettaglio	Costo per tonnellata di materiale introdotto in lavorazione	Materia prima introdotta	Costo totale (€)
Essiccazione		30	Semi prodotti	34.28
Vagliatura e imballo		30	Semi vagliati	38.09
				<b>72.38</b>
<b>SEME: PRODUZIONE OLIO</b>				
Pressatura	Spremitura dei semi	600	Semi essiccati e va	336.00
Altre operazioni su olio?	Filtraggio?	2	Olio ottenuto da sp	16
Confezionamento	Confezionamento, i	3	Olio pronto da con	25
<b>TOTALE COSTI</b>				<b>336.42</b>
<b>SEME: PRODUZIONE FARINA</b>				
Attività	Dettaglio	Costo per tonnellata di materiale introdotto in lavorazione	Materia prima introdotta	Costo totale (€)
Frangitura seme		500	semi essiccati	320.00
Molitura pannello		400	panello	256.00
varie ed imballaggi		100	prodotti finiti	22.40
<b>TOTALE COSTI</b>				<b>598.40</b>
<b>COSTI COMPLESSIVI SOSTENUTI DAGLI AGRICOLTORI PER LA PRODUZIONE DI SEMI E STELI</b>				
<b>TOTALE</b>				<b>2.545.00</b>
<b>COSTI COMPLESSIVI SOSTENUTI DAGLI AGRICOLTORI CON LA PRODUZIONE DI OLIO E FARINA</b>				
<b>TOTALE COSTI DI PRODUZIONE</b>				<b>3.479.82</b>
<b>ACQUISTO DELL'IMPIANTO DI SPREMITURA E MACINAZIONE</b>				<b>36.00</b>
<b>Totale</b>				<b>3.515.82</b>
<b>RICAVI MENO COSTI</b>				
A) Vendita dei soli semi e steli				-673.00
b) Vendita di steli più olio e farina				3.353.94

Prendiamo ora in considerazione una fase successiva della filiera, che va dall'acquisto degli steli (dallo stesso gruppo di agricoltori, 6400 tonnellate a 80 euro la tonnellata, per un totale di 512 mila euro) alla produzione della fibra macerata e del canapulo per l'edilizia.

Questi operatori affronterebbero, nello scenario ipotizzato, oltre 12.5 milioni di euro di costi, a fronte, tuttavia, dei ricavi significativi derivanti da un prodotto ad elevato valore aggiunto, tanto più alto quanto più derivante da sistemi produttivi locali, efficienti e sostenibili, in grado di garantire la costante ed elevata qualità desiderata. I ricavi previsti, superiori a 19 milioni di euro, potrebbero, nello scenario considerato, coprire anche i costi di acquisto degli impianti e quelli relativi ad una decisa e articolata attività commerciale, che comprende scambi, relazioni, trasporti, controllo qualità.

I costi per l'ottenimento della fibra macerata e pettinata sono i seguenti:

COSTI DI PRODUZIONE DELLA MACERATA				
Voce di costo				
FIBRA: PRODUZIONE DELLA FIBRA TESSILE MACERATA E PETTINATA				
Attività	Dettaglio	Costo per tonnellata di materiale introdotto in lavorazione, €/t	Materia prima introdotta	Costo totale
Acquisto degli steli	Dagli stessi agricoltori	80 €	Steli	512.000 €
Stigliatura	Conto lavorazione	200 €	steli	1
Trasporto fibra verso impianto di macerazione	Trasporto da parte di terzi	20 €	fibra greggia andata	
Trasporto fibra da impianto di macerazione	Trasporto da parte di terzi	20 €	fibra macerata ritorno	
Macerazione	Conto lavorazione	2.000 €	fibra greggia	3
Ammorbidatura, cardatura, filatura	Operazione svolta da terzi	4.000 €	fibra macerata	6
<b>TOTALE COSTI</b>				<b>11</b>
CANAPULO: PRODUZIONE INPUT PER EDILIZIA				
Attività	Dettaglio	Costo per tonnellata di materiale introdotto in lavorazione	Materia prima introdotta	Costo totale
Stigliatura		0 €	canapulo raccolto	
Vagliatura		50 €	canapulo cippato	
<b>TOTALE COSTI</b>				<b>12</b>
I ricavi potenziali della produzione della fibra macerata e pettinata sono i seguenti:				
RICAIVI				
	Volume ottenuto da commercializzare	Possibile prezzo di vendita (che sia dettaglio o ingrosso, quello che conta è il prezzo inserito)		
Fibra tessile macerata e pettir	560 €	250 €		
Canapulo per l'edilizia	3.840 €	5.000 €		
<b>TOTALE RICAIVI</b>				
INDICAZIONI PER L'OTTIMIZZAZIONE ECONOMICA DELLA FILIERA				
La presente tabella evidenzia le direzioni opportune per un efficientamento della filiera, con il relativo grado di rilevanza di ciascun aspetto (* = basso; **=medio; ***=alto).				
Massimizzazione della sostenibilità ambientale della coltivazione e lavorazione della canapa per rafforzare il posizionamento del prodotto e il conseguimento di crediti di carbonio				***
Facilitazione dell'accesso, da parte della fase agricola, alla produzione e soprattutto commercializzazione di prodotti alimentari come l'olio e la farina				***
Valutazione e comunicazione del valore nutrizionale dei prodotti alimentari e dell'impatto sulla salute, al fine del conseguimento di prezzi di mercato più elevati				**
Supporto alla valorizzazione della filiera tessile della canapa anche in comparazione con altre filiere tessili naturali e sintetiche (abbigliamento duraturo, non usa e getta)				***
Filiera dei prodotti per l'edilizia: valorizzazione non solo del potere coibentante ma anche dello stoccaggio di carbonio				***
Processi di validazione e certificazione del prodotto italiano				***
Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate	Nonostante la complessità del tema, si è strutturata una modellizzazione della filiera, si sono eseguite alcune simulazioni pervenendo ad alcune utili indicazioni, che hanno costituito la base per la costruzione di altri progetti complementari.			

## COSTI – STUDI NECESSARI ALLA REALIZZAZIONE DEL PIANO

## PERSONALE

Cognome e nome	Mansione/qualifica	Attività svolta nell'azione	Costo orario	Ore	Costo totale
	impiegato TI part time 80%	analisi di mercato / costi	€ 27,00	157,50	€ 4.252,50
	impiegato TI part time 80%	analisi di mercato / costi	€ 33,00	30,00	€ 990,00
Totale:					€ 5.242,50

Azione	<b>AZIONE 1: PROVE AGRONOMICHE IN CAMPO IN AREE D E SPERIMENTAZIONE PARCELLARE IN AZIENDA AGRICOLA SPERIMENTALE</b>
Unità aziendale responsabile	AZ. STUARD Hanno collaborato: Az. Agr. Ca' D'Alfieri, Az. Agricola Pedrazzi
Descrizione delle attività	Le prove di confronto varietale presso l'Azienda Agraria Sperimentale Stuard e i campi varietali presso le Aziende Agricole Ca' D'Alfieri (Bardi, PR) e Pedrazzi (Pellegrino P.se, PR) nelle due annate colturali 2020 e 2021, nonché i risultati ottenuti dai campionamenti nelle aree di saggio, sono stati descritti nella relazione tecnica annessa alla domanda di pagamento intermedio. Successivamente sono state svolte le lavorazioni di campo post raccolta e il seme e la fibra sono stati preparati per le lavorazioni successive attraverso una serie di operazioni quali la creazione dei fasci, l'essiccazione in serra, la sgranatura dei panicoli, la pulizia del seme, l'invio della fibra alla stigliatura, lo stoccaggio di semi e fibra. I campioni necessari per le caratterizzazioni previste nell'azione 4 sono stati preparati e conferiti ad UNIPR e CREA-GB.
Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate	Gli obiettivi erano stati raggiunti. Come già descritto nella relazione tecnica legata alla domanda di pagamento intermedio, nel piano del GO il costo standard di Mario La Giglia è stato erroneamente indicato a 19,5 euro/ora (operaio agricolo) mentre il livello aziendale è di impiegato fascia bassa (27 euro/ora). Il saldo risulta comunque invariato.

## COSTI AZIONE 1

## PERSONALE

Cognome e nome	Mansione/qualifica	Attività svolta nell'azione	Costo orario	Ore	Costo totale
	imp. Agrario 3° categoria - tempo indeterminato	attività coordinamento	€ 27,00	9,50	€ 256,50
	o t d qualificato - tempo indeterminato	preparazione campioni	€ 19,50	14,00	€ 273,00
	o t d qualificato - tempo determinato	preparazione campioni	€ 19,50	14,00	€ 273,00
	imp. Agrario 4° categoria - tempo indeterminato	preparazione / consegna campioni	€ 27,00	10,00	€ 270,00
	imp. Agrario 1° categoria - Quadro	attività coordinamento	€ 43,00	4,00	€ 172,00
	imp. Agrario 1° categoria - Quadro	attività coordinamento	€ 43,00	7,00	€ 301,00
Totale:					€ 1.545,50

Azione	<b>AZIONE 2: ESSICAZIONE, STOCCAGGIO E SPREMITURA SEMENTI</b>
Unità aziendale responsabile	NATURFIBRE, collaborano STUARD, UNIPR
Descrizione delle attività	<p>Per effetto della DETERMINAZIONE 13993 del 23/07/2021 e della DETERMINAZIONE N. 15257 del 04/08/2022 le attività previste per il completo raggiungimento degli obiettivi dell'azione 2 erano le seguenti:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. collaudo del sistema di preriscaldamento del seme di canapa finalizzato ad aumentare la resa di spremitura, mantenendo inalterate le proprietà organolettiche dell'olio;</li> <li>2. predisposizione di un documento di progettazione del prototipo sulla base dei risultati ottenuti dalle prove.</li> </ol> <p>A tale scopo, l'Azienda Agr. STUARD ha provveduto all'acquisto di 120 kg di seme di canapa da spremitura (un mix di varietà, già adoperato per spremitura dal venditore, con una resa in olio del 24-26%) e presso la ditta Tecnoimpianti s.r.l., sotto la supervisione scientifica del CREA, il personale Naturfibre ha effettuato il collaudo del sistema di preriscaldamento attraverso alcune le prove di spremitura, secondo le indicazioni della ditta Naturfibre.</p> <p><b>1) COLLAUDO SISTEMA PRERISCALDAMENTO</b>  <b><i>Il sistema di preriscaldamento</i></b></p> <p>Il sistema realizzato da Tecnoimpianti su indicazione di Naturfibre è costituito da una coclea rotante alloggiata in un tubo della lunghezza di metri 3 complessivi. Il tubo è riscaldato in 6 punti distribuiti regolarmente lungo i tre metri, con resistenze di 500 W ciascuna. La temperatura può essere impostata dall'esterno ed è regolata da un termostato in dotazione che lavora in un range di temperature da t. amb. a 250 °C, con una precisione di controllo di <math>\pm 3-5^{\circ}\text{C}</math>. Il motore della coclea è impostato a 1400 giri/min con un regolatore 1/10 che porta i giri a 140/min. Il motore lavora in continuo caricando all'interno del tubo di preriscaldamento tutto il seme disponibile nella tramoggia di alimentazione.</p> <p>Il seme preriscaldato viene convogliato nella tramoggia di alimentazione della spremitrice attraverso un tubo lungo 50-70 cm, alla cui estremità è collocata una sonda per la misurazione della temperatura del seme, che viene riportata su un display, assieme alla temperatura attuale del tubo. La zona di spremitura non è riscaldata (spremitura a freddo). La testata da cui vengono estrusi gli scarti della spremitura (panello) è riscaldata ad una temperatura di 100°C</p> <p>La temperatura di preriscaldamento del seme prima della spremitura dipenderà da:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- temperatura impostata nel tubo</li> <li>- velocità di progressione del seme nel tubo (N. giri coclea/min)</li> <li>- tempo di permanenza nel tubo preriscaldato</li> <li>- tempo di svuotamento della tramoggia della macchina spremitrice.</li> </ul> <p><b><i>Prove di settaggio e collaudo sistema preriscaldamento</i></b></p> <p>Le prove sperimentali sono servite a collaudare il sistema di preriscaldamento e attraverso l'analisi dei campioni, a definire quali sono le migliori condizioni per ottenere un aumento della resa preservando le proprietà organolettiche dei prodotti. Sono state allestite prove di spremitura a temperature differenti del tubo di preriscaldamento e registrati i valori di temperatura impostata e rilevata, rispettivamente di:</p>

1. seme nella tramoggia a monte del sistema di preriscaldamento
2. tubo di preriscaldamento
3. seme in uscita dal tubo di preriscaldamento
4. seme nella tramoggia della spremitrice
5. olio all'uscita dalla spremitrice
6. olio a ½ del condotto di raccolta
7. olio all'ingresso del contenitore di raccolta finale

Le temperature T2 e T3 sono state rilevate dagli strumenti del dispositivo di preriscaldamento; tutte le altre, con un termometro ad infrarossi di tipo commerciale (Fig. 1).

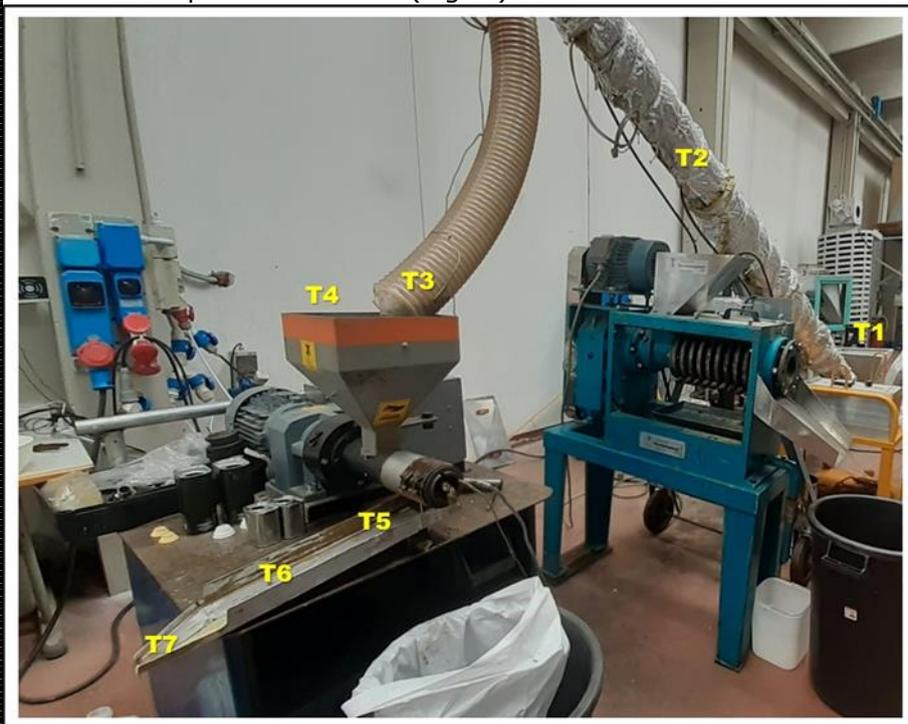


Fig. 1 Veduta del sistema di preriscaldamento, alimentazione e spremitura del seme di canapa allestito presso la ditta Tecnoimpianti. Le lettere indicano i punti in cui è stata misurata la temperatura durante le prove di collaudo.

### Prova 1

Poiché non si conosceva la capacità di riscaldamento del seme di canapa il Responsabile della Ditta Tecnoimpianti ha settato lo strumento secondo la propria esperienza, a 190°C. In queste condizioni le temperature rilevate erano:

ESPERIMENTO 190°C								
T1	T2 (set)	T3	T4	T5	T6	T7	prelievo olio	prelievo pannello
25°C	190	65	-	-	42-45	-	prelievo 1	prelievo 1
ESPERIMENTO 120°C								
T1	T2 (set)	T3	T4	T5	T6	T7	prelievo olio	prelievo pannello
25°C	120	65			62		prelievo 1	prelievo 1
ESPERIMENTO 150°C								
T1	T2 (set)	T3	T4	T5	T6	T7	prelievo olio	prelievo pannello
25°C	152	74	72		65		prelievo 1	prelievo 1

Tab. 1 schema delle tre prove di spremitura, delle temperature registrate e dei campioni di olio e pannello prodotti. Le colonne T1-T7 riportano le temperature rilevate nei diversi punti dell'impianto (vedi

foto 1)

NOTE:

- Sono stati prelevati circa **100 ml di olio** e circa **200g di pannello** per ciascuna di queste prove
- Il pannello prodotto da queste tre prove è stato nuovamente spremuto in una pressa a caldo molto potente per estrarre l'olio residuo. L'olio residuo (Olio spremitura pannello) e il pannello di seconda spremitura, sono stati prelevati per analisi.

#### **OSSERVAZIONI**

1. E' necessario abbassare la temperatura di preriscaldamento sotto i 100 °C per evitare l'eventuale alterazione delle proprietà nutrizionali dei prodotti
2. E' necessario concertare lo spostamento del seme nella coclea con il tempo di svuotamento della tramoggia della spremitrice per favorire un omogeneo preriscaldamento del seme ed il mantenimento della temperatura raggiunta.
3. Il seme fermo nella tramoggia tende a raffreddarsi e questo fattore risulta determinante durante l'inverno, quando le temperature dell'ambiente sono decisamente inferiori a 25°C.

Sulla base delle osservazioni, si decide di effettuare nuove prove cercando di impostare la temperatura del tubo di preriscaldamento in modo tale che il seme non superi gli 80°C.

Si allestiscono 4 prove con le seguenti temperature della coclea:

- 1) Temp ambiente (no preriscaldamento, circa 30°C)**
- 2) Temp coclea 60°C**
- 3) Temp. coclea 80°C**
- 4) Temp. coclea 150 °C**

Per ciascuna prova vengono registrate tutte le temperature e prelevati N. 3 campioni da 100 ml di olio e N.3 campioni di pannello da 250-300 g.

Le prove hanno generato i campioni di olio e pannello riportati nella tabella 2

ESPERIMENTO T ambiente								
T1	T2 (set)	T3	T4	T5	T6	T7	prelievo olio	prelievo pannello
25°C	-	-	25	67	54	37	prelievo 1	prelievo 1
25°C	-	-	25	67	55	41	prelievo 2	prelievo 2
25°C	-	-	25	60	53	41	prelievo 3	prelievo 3
T1	T2 (set)	T3	T4	T5	T6	T7	prelievo olio	prelievo pannello
25°C	55	36,7		77	58	51	-	-
25°C	53	36,8		77	55,5	45,5	-	-
25°C	52	36,9		71	55	50	-	-
25°C	52	40		64,8	57		-	-
25°C	50	41		73		45	-	-
25°C	50	38		-	50,3	45	-	-
T1	T2 (set)	T3	T4	T5	T6	T7	prelievo olio	prelievo pannello
25°C	72	37	36,9	71	-	46,4	-	-
25°C	75	37	38,8	69	-	45,8	-	-
25°C	75	37	38,8	72	-	45,5	-	-
ESPERIMENTO 60°C								
T1	T2 (set)	T3	T4	T5	T6	T7	prelievo olio	prelievo pannello
25°C	58	37	36	-	60	49	prelievo 1	prelievo 1
25°C	57	37	38	-	64	48,3	prelievo 2	prelievo 2
25°C	62	37	37	-	61,6	52,7	prelievo 3	prelievo 3
ESPERIMENTO 80°C								
T1	T2 (set)	T3	T4	T5	T6	T7	prelievo olio	prelievo pannello
27°C	80	41	-	-	68	48	prelievo 1	prelievo 1
27°C	82	41	-	-	69,9	56,5	prelievo 2	prelievo 2
27°C	77	40	-	-	67,5	57	prelievo 3	prelievo 3
ESPERIMENTO 150°C								
T1	T2 (set)	T3	T4	T5	T6	T7	prelievo olio	prelievo pannello
27°C	150	-	64		-	42-45	prelievo 1	-
27°C	150	-	53,5		67	-	prelievo 2	-
27°C	150	74	72		65	-	prelievo 3	-

Tab. 2 schema delle quattro prove di spremitura, delle temperature registrate e dei campioni di olio e pannello prodotti. Le colonne T1-T7 riportano le temperature rilevate nei diversi punti dell'impianto (vedi foto 1)

### PROVA DI RESA IN SPREMITURA

La prova di resa in spremitura è stata effettuata ad un'unica temperatura di preriscaldamento della coclea (72°C), adoperando 19 kg di seme (20 kg, purezza misurata con vaglio pari al 95%). I dati sono riportati nella tabella 3

ESPERIMENTO RESA SPREMITURA								
T1	T2 (set)	T3	T4	T5	T6	T7	olio 1 (kg)	panello 1 (kg)
27°C	72	42	44	58	-	54	4,916	14,5

## 2. PREDISPOSIZIONE DOCUMENTO DI PROGETTAZIONE

Al termine delle prove di collaudo del sistema di preriscaldamento il responsabile tecnico di Tecnoimpianti e di Naturfibre concordano sulla necessità di apportare al sistema le seguenti modifiche:

1. Riduzione della portata del tubo di preriscaldamento per assecondare la velocità della pressa;
2. Sostituzione del termostato per ottenere regolazione più fine della temperatura ( $\pm 1^\circ\text{C}$ );
3. Riduzione del numero di resistenze da 500W da N.6 a N.3
4. Possibilità di differenziare l'accensione e lo spegnimento delle tre resistenze, secondo necessità
5. Riduzione del N. di giri del motore della coclea. Attualmente il motore effettua 1400 giri, con un regolatore 1/10 (140 giri/min; 50 Hz); bisognerebbe portarlo a 600-700 giri/min, con un regolatore 1/30 per poter ottenere 1-2 giri/min (10 Hz)

Queste modifiche permetterebbero una regolazione più fine della

	temperatura di pre-riscaldamento ed una riduzione del consumo energetico.
Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità	Le molteplici criticità sorte in corso d'opera, tanto da richiedere 2 variazioni del Piano d'Azione e del relativo bilancio, hanno imposto una rimodulazione delle attività previste da questa azione, pertanto le prove di spremitura e di resa della spremitura sono state effettuate con un mix di varietà di seme canapa e con un numero ridotto di repliche sperimentali. Tuttavia, le azioni correttive intraprese e l'impegno dei partner e dei collaboratori ha comunque consentito la definizione di un progetto per la realizzazione di un sistema di preriscaldamento del seme di canapa, in grado garantire un aumento della resa in spremitura ed una produzione uniforme di olio, indipendentemente dalla temperatura esterna.

## COSTI - AZIONE 2

### COSTI PERSONALE

Cognome e nome	Mansione/ qualifica	Attività svolta nell'azione	Costo orario	Ore	Costo totale
	o.t.d. qualificato - tempo indeterminato	gestione semi e campioni	€ 19,50	27,00	€ 526,50
	o.t.d. qualificato - tempo determinato	gestione semi e campioni	€ 19,50	18,00	€ 351,00
Totale:					€ 877,50

Azione	<b>AZIONE 3: MACERAZIONE E PULITURA FIBRA CON LARVE</b>
Unità aziendale responsabile	AZ. STUARD Collaborano: CREA, NATURFIBRE
Descrizione delle attività	Le prove di macerazione, descritte nella relazione tecnica annessa alla domanda di pagamento intermedio, sono state condotte nel bioreattore dotato di sistema di insufflazione forzata di aria e di un sistema di ricircolo del liquor di macerazione sviluppato nel progetto Misura 16.1 5D denominato Scarabeo. Anche le prove di pulitura della fibra con l'uso di larve del dittero <i>Hermetia illucens</i> alimentate per tre giorni su fibra di canapa macerata sono state precedentemente descritte. Queste prove hanno portato alla produzione di biomassa larvale che è stata conferita ad UNIPR per le caratterizzazioni previste nelle azioni 4 e 5.
Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate	Come riportato nella relazione tecnica intermedia alla domanda di pagamento intermedio, gli obiettivi sono stati raggiunti. Nel piano del GO il costo standard di _____ è stato erroneamente indicato a 19,5 euro/ora (operaio agricolo) mentre il livello aziendale è di impiegato fascia bassa (27 euro/ora). Il saldo risulta comunque invariato.

## COSTI - AZIONE 3

### COSTI PERSONALE

Cognome e nome	Mansione/ qualifica	Attività svolta nell'azione	Costo orario	Ore	Costo totale
	imp. Agrario 4° categoria - tempo indeterminato	supporto tecnico	€ 27,00	12,00	€ 324,00
	impiegato TI part time 80%	coordinamento scientifico	€ 33,00	17,00	€ 561,00
				Totale:	€ 885,00

<b>Azione</b>	<b>AZIONE 4: ANALISI DI LABORATORIO</b>
<b>Unità aziendale responsabile</b>	CREA, UNIPR-SITEIA Collaborano: STUARD, NATURFIBRE
<b>Descrizione delle attività</b>	<p><b>ANALISI DELLA FIBRA DI CANAPA (CREA)</b></p> <p>La qualità della fibra prodotta nell'impianto di macerazione è stata valutata dopo la macerazione e la pulizia della fibra con metodo convenzionale (lavatrice) o con larve di <i>H. illucens</i>, mediante lo stelometro. Lo stelometro è uno strumento in cui vengono misurate ST-length (resistenza alla trazione) ed EL-ongation (capacità di allungamento) della fibra; di qui il nome STELOmetro. La resistenza alla trazione e la capacità di allungamento dei fasci di fibre sono fattori che determinano la tenacia di una fibra. Lo stelometro generalmente viene utilizzato sia in campo commerciale che nella ricerca per verificare se un determinato metodo di estrazione o un trattamento può aver danneggiato la fibra. Poiché la fibra naturale appena estratta può essere estremamente eterogenea, solitamente questo tipo analisi si esegue su un numero molto elevato di campioni, adottando piattaforme strumentali HVI (High Volume Instrument) in cui le misurazioni vengono fatte in parallelo ed automatizzate, fornendo un valore medio delle migliaia di resistenze misurate.</p> <p>Per le analisi su piccola scala, come nel nostro caso, si utilizza uno stelometro semplice, basato sul principio del pendolo (Figura 10). Su questo strumento viene analizzato un campione alla volta e viene misurata la forza necessaria alla rottura (su scala graduata da 0 a 7 kPa) e il grado di allungamento delle fibre al punto di rottura (elasticità, su scala graduata da 0% a 50%).</p> <div data-bbox="764 1462 1114 1883" data-label="Image"> </div> <p>Figura 10: Stelometro disponibile presso l'Az. Agr. Sperimentale STUARD</p> <p>L'analisi viene fatta prelevando una porzione dal campione di fibra e riordinandola in modo che i fasci di fibra siano paralleli. Quindi, la fibra viene pettinata con un pettine a denti larghi e successivamente con un</p>

pettine a denti stretti in modo da rimuovere eventuali nodi o residui. Si ottiene così un "fascio" di fibre che viene bloccato sullo strumento mediante due morsetti, e si eliminano eventuali porzioni di fibra sporgenti. I morsetti vengono inseriti all'interno dello strumento, precedentemente calibrato con un campione di fibra di cotone a tenacia e forza di rottura note, fornito in kit dalla ditta produttrice dello strumento; quindi, si procede con l'applicazione di una tensione all'estremità dei morsetti. Quando il fascio di fibre bloccato tra i due morsetti si rompe a metà, lo stelometro misura la forza necessaria per ottenere la rottura. Per risalire alla tenacia del fascio di fibre è necessario conoscere il peso della fibra analizzata; quindi, al termine dell'analisi si preleva il campione di fibra dallo strumento e si pesa con una bilancia analitica di precisione (5 cifre decimali). Mediante un semplice calcolo, essendo noti la lunghezza delle fibre del fascio e il peso del fascio, la forza di rottura può essere convertita in resistenza alla tensione (tenacia):

$$\text{Tenacia} = \text{Forza di rottura (N)} \times 1.50 \text{ peso campione (mg)}$$

Sono stati condotti 5 esperimenti indipendenti di macerazione adoperando fibra della stessa varietà, proveniente dai campi sperimentali del progetto. Dopo la macerazione sono state allestite 3 vasche da 1kg di fibra per la pulitura con *H. illucens* e 1 kg di fibra macerata di controllo è stato lavato in lavatrice. In totale sono stati analizzati 20 campioni di fibra (5 con metodo convenzionale e 15 con *H. illucens*) e per ciascun campione è stata misurata la resistenza alla tensione.

#### CARATTERIZZAZIONE DEL PROFILO NUTRIZIONALE DELL'OLIO DI CANAPA (UNIPR-SITEIA)

L'olio ottenuto dalla spremitura a freddo delle sementi da parte di Naturfibre nell'Azione 2 è stato caratterizzato, seguendo protocolli disponibili nella letteratura scientifica (Caligiani et al. 2010), riguardo a:

- **profilo in acidi grassi,**
- **profilo della frazione insaponificabile**
- **distribuzione delle classi lipidiche**
- **la stabilità ossidativa**
- **contenuto in polifenoli totali.**

#### **Profilo in acidi grassi dell'olio di canapa:**

Il profilo in acidi grassi dell'olio di canapa è stato indagato tramite tecnica GC-MS, previo trattamento del campione, al fine di ottenere i metil-esteri degli acidi grassi. I campioni sono stati analizzati su di un gas cromatografo TRACE 1300 interfacciato con uno spettrometro di massa ISQ (Thermo scientific), utilizzando una colonna capillare ZB-5MS (Phenomenex). I diversi acidi grassi presenti nel campione sono stati identificati sulla base del loro spettro di massa caratteristico, andando a confrontare questo con spettri presenti nella libreria strumentale (NIST). Grazie allo standard interno (acido tricosanoico metil-estere) è stato possibile semi-quantificare i composti identificati. Il profilo ottenuto permette di risalire alla percentuale di acidi grassi saturi e insaturi presenti.

#### **Profilo della frazione insaponificabile dell'olio di canapa:**

La frazione insaponificabile è stata caratterizzata tramite tecnica GC-MS, previo trattamento del campione, con opportuni solventi e reagenti

per la derivatizzazione degli analiti di interesse (KOH 2.2N in Etanolo/Acqua, N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamide o BSTFA e 5-alfa-colestan-3-beta-olo come standard di riferimento). La caratterizzazione è stata eseguita tramite un gas cromatografo TRACE 1300 interfacciato con uno spettrometro di massa ISQ (Thermo scientific), utilizzando una colonna capillare ZB-5MS (Phoemenex). Le molecole che costituiscono la frazione insaponificabile sono state identificate sulla base del loro spettro di massa, usando come riferimento gli spettri di massa presenti in libreria (NIST). Questo tipo di analisi è utile per capire se siano presenti steroli vegetali e quale sia la loro concentrazione.

#### **Stabilità ossidativa dell'olio di canapa:**

Ai fini di indagare la stabilità ossidativa dell'olio di canapa, partendo dal presupposto che i maggiori componenti sono l'acido linoleico e oleico, sono stati determinati due parametri utili come l'acidità percentuale e l'indice di perossido (IP).

L'acidità, data dalla quantità di acidi grassi liberi non esterificati con il glicerolo, è stata ottenuta tramite titolazione acido-base e si esprime in % di acido oleico; si ottiene titolando l'olio solubilizzato con NaOH 0.1 N.

Il numero di perossidi viene ottenuto tramite titolazione per ossido-riduzione. Esso esprime in milliequivalenti (mEq) di ossigeno attivo, la quantità di perossidi in 1Kg di olio, che corrispondono ai mEq di iodio liberato da reazione con ioduro di potassio (KI), per 1000 g di olio. Si ottiene tramite dissoluzione del campione, reazione con soluzione satura di ioduro di potassio e titolazione con tiosolfato di sodio 0.01 N. I dati ottenuti, se in linea con la letteratura, permettono di valutare la stabilità del prodotto in esame.

#### **Distribuzione delle classi lipidiche dell'olio di canapa:**

Al fine di valutare quale fosse la distribuzione delle classi lipidiche dell'olio di canapa è stata applicata la tecnica dell'<sup>1</sup>H-NMR. A questo scopo un'aliquota di campione (10 - 50 mg) è stata dispersa in un solvente idoneo per l'analisi (cloroformio deuterato) e sottoposta a risonanza magnetica nucleare a 400 MHz.

#### **Determinazione della quantità di polifenoli dell'olio di canapa:**

Il saggio di Folin-Ciocalteu è stato impiegato per determinare il contenuto in polifenoli totali dell'olio di canapa. Il test prevede l'utilizzo di uno standard di acido gallico (retta di calibrazione nel range 10 - 100 ppm) e la misurazione dell'assorbanza a 760 nm tramite spettrofotometro (JASCO).

### CARATTERIZZAZIONE NUTRIZIONALE DELLA FARINA DI CANAPA (UNIPR-SITEIA)

Al fine di caratterizzare le proprietà nutrizionali della farina di canapa prodotta nell'Azione 2 dalla macinatura e setacciamento del pannello, sottoprodotto della spremitura del seme, sono stati determinati parametri come: **umidità, ceneri, proteine, lipidi, polifenoli totali, fibra e carboidrati.**

**Umidità:** Il contenuto di umidità è stato determinato per via gravimetrica, previo riscaldamento in stufa ventilata a 105°C per 24 ore (o fino a peso costante), a pressione atmosferica.

**Ceneri:** il contenuto in ceneri viene determinato per via gravimetrica dopo incenerimento in muffola a 500°C.

**Proteine:** per determinare il contenuto di proteine della farina di canapa viene utilizzato il metodo Kjeldahl che permette di estrarre, recuperare e quantificare il contenuto di azoto all'interno del campione, determinando di conseguenza il contenuto di proteine (AOAC, 2006).

**Lipidi:** per la determinazione del contenuto lipidico viene usato il metodo di Soxhlet usando etere dietilico per l'estrazione (AOAC, 2006).

**Polifenoli totali:** per la determinazione del contenuto in polifenoli totali della farina di canapa viene utilizzato il saggio di Folin-Ciocalteu. Il test prevede l'utilizzo di uno standard di acido gallico (retta di calibrazione nel range 10 - 100 ppm) e la misurazione dell'assorbanza a 760 nm tramite spettrofotometro (JASCO) (Dall'Asta et al. 2013).

**Fibra e carboidrati:** La fibra è stata determinata tramite la metodica ufficiale AOAC (metodo 991.43) che prevede un trattamento enzimatico del campione, una dissoluzione utilizzando acqua e etanolo e una successiva precipitazione. Con questo metodo è possibile ottenere sia la percentuale di fibra solubile che quella insolubile, tramite determinazioni di differenze in termini gravimetrici.

Una volta determinata la % di umidità, grassi, proteine e fibra sul campione, la % di carboidrati viene determinata per differenza.

#### CARATTERIZZAZIONE DELLA FRAZIONE PROTEICA DELLA FARINA DI CANAPA (CREA)

La frazione proteica della farina di canapa è stata caratterizzata mediante elettroforesi monodimensionale su gel di poliacrilammide denaturante. E' stato necessario mettere a punto un protocollo per l'estrazione della frazione proteica idrosolubile. Dopo diversi tentativi con protocolli desunti dalla letteratura ed opportunamente adattati alla farina di canapa, è stato messo a punto un protocollo in grado di consentire l'estrazione della frazione proteica idrosolubile dalla farina di canapa e la visualizzazione del pattern proteico mediante elettroforesi modimensionale su gel di poliacrilammide denaturante (1D SDS-PAGE)

#### ***Estrazione proteine idrosolubili da farina di canapa***

Prima dell'estrazione proteica 1 g di farina è stato sgrassato con esano 1/20 w/v in un vial da 50 ml, con agitazione orizzontale moderata per 14 ore. La sospensione ottenuta è stata centrifugata a 9,000 rpm per 20' a 4 °C ed il sovrinatante eliminato; il pellet (farina sgrassata) è stato seccato in campana sotto vuoto e conservato in freezer a -20°C fino all'estrazione proteica.

#### ***Estrazione proteine solubili***

Per l'estrazione è stato adoperato un metodo opportunamente adattato ai campioni di farina di canapa, come segue:

100 mg di farina sgrassata sono stati pesati in un vial da 2 ml e risospesi in 1 ml di tampone d'estrazione (50 mM Tris-HCl pH 7.2, 50 mM NaCl, 1 % w/v CHAPS, inibitori di proteasi 1X). I vials sono stati incubati in Thermomixer (Bio-Rad) a temp. ambiente per 2h, a velocità media, vortexando a mano ad intervalli regolari; centrifugati a 9,000 rpm per 10' a r.t. e il sovrinatante, trasferito in un vial da 2 ml è stato centrifugato a 15,300 rpm per 20' a r.t. Il sovrinatante ottenuto è stato trasferito in un nuovo vial da 2 ml e le proteine estratte sono state precipitate aggiungendo Acido tricloroacetico (TCA) acquoso (50 % w/v) fino ad una concentrazione finale del 20 % w/v e incubando in ghiaccio per 1 h. Dopo la precipitazione i vials sono stati centrifugati a rpm max per 10' a 4 °C. Eliminato il sovrinatante il pellet è stato lavato con TCA 20%, centrifugato a rpm max per 10' a 4°C e, eliminato il sovrinatante, asciugato sottovuoto in Speedvac (Eppendorf). I pellet proteici sono stati conservati a -20°C fino ad analisi successiva.

#### ***Quantificazione delle proteine estratte***

I pellet proteici sono stati risospesi in 500 µl di tampone d'estrazione (privo di inibitori di proteasi) e le proteine quantificate con il metodo Bradford adoperando una retta di taratura ottenuta con BSA (Albumina,

da 20µg a 130 µg, 6 punti)

***Elettroforesi monodimensionale su gel denaturante (SDS-PAGE, gel midi 16X16)***

250 µg di proteine risospese sono state diluite in rapporto 1:1 con il Laemmli-sample-buffer 2X (4 % w/v SDS, 20 % w/v glicerolo, 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 0.004 % w/v BPB, 10 % v/v β-mercaptoetanol) e caricate in ogni pozzetto di un gel denaturante in poliacrilammide al 12% (T12%, C 1.28%, 1,5 mm) ottenuto sciogliendo in un microonde Acrilammide 40% e Bis- acrilammide 2,8% in un opportuno volume di Main gel Buffer 4X (TRIS 1,5 M, SDS 0,4%). Dopo aver raffreddato a temp. ambiente la miscela, sono stati aggiunti il catalizzatore (Ammonio Persolfato 0,05%) e l'iniziatore (TEMED 0,05%). Il gel è stato colato nello stampo per la polimerizzazione. La corsa elettroforetica è stata condotta in due fasi consecutive

P1: 100 V, 100 W, 25 mA per gel; durata 40'

P2: 150 V, 100 W, 25 mA per gel; durata 6 h 30'

Dopo la corsa il gel è stato fissato in acido acetico 10%, sciacquato in acqua MilliQ e colorato con Imperial Protein Stain (Thermo Scientific)

***Estrazione di proteine idrosolubili da seme di canapa***

Al fine di valutare l'effetto del processamento (spremitura, macinatura, setacciamento) sul pattern proteico, sono state condotte estrazioni di proteine idrosolubili direttamente dal seme macinato. 20 g di seme di canapa sono stati macinati adoperando un macinino domestico ed il composto pastoso ottenuto è stato suddiviso in aliquote da 1 g che sono state sgrassate in esano secondo il protocollo descritto in precedenza. Dopo la sgrassatura, 100 mg di sfarinato sgrassato sono stati adoperati per l'estrazione delle proteine idrosolubili, secondo il protocollo già descritto. Le proteine estratte dal seme sono state quantificate e sottoposte ad elettroforesi denaturante su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE). Le bande componenti il pattern proteico di farina e seme di canapa sono state prelevate dal gel, e conservate in congelatore a -80°C fino al sequenziamento.

***Sequenziamento bande proteiche di seme e farina di canapa***

Ciascuna banda è stata processata per ottenere l'eluizione della proteina, la sua digestione nei peptidi componenti, la separazione mediante HPCL dei peptidi ed il successivo sequenziamento mediante analisi in spettrometria di massa (LC-MS/MS). L'ulteriore analisi bioinformatica dei dati di sequenza ottenuti fornisce, mediante algoritmi predittivi, una predizione della putativa proteina più rappresentata nella banda del gel.

**CARATTERIZZAZIONE DEL PROFILO NUTRIZIONALE DELLA BIOMASSA LARVALE (UNIPR-SITEIA)**

Il profilo nutrizionale della biomassa larvale è stato caratterizzato mediante analisi centesimale dei parametri misurati per l'analisi della farina. In particolare, sono stati determinati parametri ritenuti interessanti per caratterizzare questo tipo di matrice, come: umidità, ceneri, grassi e proteine. Per determinare questi parametri sono stati utilizzati gli stessi metodi descritti in precedenza, applicati alla farina di canapa, ad eccezione della frazione lipidica che è invece stata determinata tramite metodo di Folch. Questo metodo permette l'estrazione e la quantificazione del contenuto lipidico totale, eseguendo un'estrazione a temperatura ambiente tramite l'utilizzo di una miscela di solventi (diclorometano e metanolo). Il contenuto in grassi è calcolato per via gravimetrica.

Le frazioni proteica e grassa sono state caratterizzate ulteriormente (Caligiani et al. 2019; Leni et al. 2020).

**Caratterizzazione della frazione proteica:**

Al fine di caratterizzare la frazione proteica, innanzitutto è stato determinato il contenuto in chitina. A questo scopo, la biomassa larvale è stata sottoposta ad idrolisi aggiungendo acido cloridrico. Il campione viene poi opportunamente diluito e aggiunto di uno standard di riferimento (galattosammina). Si procede quindi con l'analisi del campione tramite tecnica UHPLC-MS (cromatografia liquida interfacciata a spettrometria di massa). La concentrazione in chitina viene determinata sulla base del contenuto in glucosammina, ottenuta dall'idrolisi della chitina stessa.

La frazione proteica è stata caratterizzata in termini di profilo aminoacidico, al fine di capire quali aminoacidi vadano a comporre le proteine. Il campione viene sottoposto a idrolisi acida, purificazione su resina a scambio cationico, derivatizzazione e analisi GC-MS su di un gascromatografo TRACE 1300 e spettrometro di massa ISQ (Thermo scientific) usando una colonna SLB5 di silice fusa (Supelco).

Infine, la frazione proteica è stata sottoposta ad idrolisi, al fine di produrre degli idrolizzati proteici ricchi in peptidi potenzialmente bioattivi. L'idrolisi è stata condotta per via enzimatica mediante proteasi commerciale da *Bacillus licheniformis*. La massa viene mantenuta in agitazione costante alla temperatura di 60°C per 180 minuti e 15 h (2 prove a 2 tempi diversi). Una volta finita la fase di idrolisi, l'enzima viene inattivato. Il campione viene poi sottoposto ad analisi tramite cromatografia liquida ad alte prestazioni interfacciata a spettrometria di massa ad alta risoluzione (UHPLC-MS) al fine di ottenere il profilo peptidico e individuare la possibile presenza di composti con bioattività. L'identificazione delle proteine e delle relative funzioni per ogni peptide è stata eseguita utilizzando il database UniProt.

**Caratterizzazione della frazione lipidica:**

Prima di tutto è stato determinato il profilo in acidi grassi del campione di larve di *Hermetia illucens*, recuperando la frazione grassa mediante metodo di Folch. I lipidi estratti vengono derivatizzati, per ottenere i metil esteri degli acidi grassi presenti. Si utilizza anche una soluzione di standard interno a concentrazione nota (C23 soluzione a 3000 ppm). L'analisi viene effettuata tramite GC-MS su colonna: Supelcowax 10. Gli acidi grassi presenti sono quantificati mediante lo standard interno (C23).

Per determinare il profilo della frazione insaponificabile si utilizzano i lipidi estratti col metodo di Folch, che vengono trattati con una base forte ed etanolo, portando ad ebollizione. La frazione di interesse viene recuperata usando etere dietilico, addizionata dello standard 5-alfa-colestan-3-beta-olo e quindi derivatizzata tramite BSTFA [N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamide]. La caratterizzazione avviene tramite tecnica GC-MS, su colonna capillare: DB5 (J & W).

La frazione grassa della massa larvale è stata caratterizzata anche tramite tecnica <sup>1</sup>H-NMR al fine di valutare quale fosse la distribuzione delle classi lipidiche e risalire quindi ad informazioni relative alla stabilità ossidativa. A questo scopo una piccola aliquota di grasso estratto è stata dispersa in un solvente idoneo per l'analisi (cloroformio deuterato) e sottoposta a risonanza magnetica nucleare a 400 MHz.

**VALUTAZIONE TECNOLOGICA E SENSORIALE DI NUOVI FORMULATI PER ALIMENTI FUNZIONALI (UNIPR-SITEIA)**

La farina di canapa è stata selezionata quale ingrediente innovativo da studiare e impiegare nella formulazione di prodotti destinati ad un consumo alimentare umano. Questo perché l'olio, date le sue

caratteristiche chimico-fisiche, quali l'elevata percentuale di acidi grassi insaturi e la presenza di polifenoli, è un alimento che può essere consumato tal quale, senza ulteriori trasformazioni tecnologiche. Un processing che preveda infatti uno step di cottura potrebbe andare a inficiare e appiattare le peculiari caratteristiche di questo prodotto.

Al fine di valutare la fattibilità di utilizzo della farina di canapa, è stato scelto come alimento potenziale il pane, ipotizzando che le proprietà della farina di canapa (acidi grassi e aminoacidi essenziali, polifenoli, fibra) potessero migliorare il profilo nutrizionale di pane senza glutine. Prima di tutto è stato necessario valutare quale potesse essere la percentuale di utilizzo della farina di canapa in un impasto. Dal momento che le miscele per preparare pane senza glutine presenti in commercio risultano piuttosto differenti tra loro, può risultare difficile standardizzare il prodotto e poter ottenere risultati confrontabili tra loro. Quindi, per risalire a quale potesse essere la miglior percentuale di farina di canapa da utilizzare in panificazione, si è reso necessario partire da farina di frumento.

Sulla base di precedenti studi scientifici che hanno adottato un livello crescente di sostituzione di farina di frumento con farine diverse dal frumento nella produzione di formulazioni di pane innovative (Marchini et al., 2021), nel presente studio sono state prodotte e analizzate 4 diverse tipologie di pane: una di controllo (STD, senza aggiunta di farina di canapa), una al 10% di farina di canapa (H10), una al 15% di farina di canapa (H15) e una al 25% di farina di canapa (H25).

I campioni di pane sono stati valutati in termini di: consistenza (texture) (analizzatore di consistenza TA.TX2); colore (colorimetro Minolta); umidità, attività dell'acqua ( $a_w$ ) volume; Il contenuto d'acqua (moisture content, MC) (%), g acqua/100 g di campione) della mollica e della crosta è stato determinato per gravimetria, ovvero per essiccazione in stufa a 105° C, mentre l'attività dell'acqua ( $a_w$ ) della mollica e della crosta è stata misurata con un igrometro (Aqualab 4TE, Decagon Devices, WA, USA). È stata utilizzata l'analisi di immagine al fine di valutare in modo oggettivo l'alveolatura dei pani prodotti. Le immagini sono state acquisite con uno scanner (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) con una risoluzione di 600 dots per inch (dpi).

Il gradimento dei pani prodotti è stato valutato mediante analisi sensoriale, effettuando un test di accettabilità che ha coinvolto 60 giudici non addestrati. Ai panelisti è stato chiesto di valutare i pani in termini di colore, aspetto, odore, sapore, consistenza e accettabilità complessiva utilizzando una scala edonistica a 9 punti (1- estremamente sgradevole; 9- estremamente gradevole).

Oltre ai parametri tecnologici e all'analisi sensoriale, i pani sono stati analizzati da un punto di vista chimico-nutrizionale.

È stato determinato il contenuto lipidico mediante metodica Soxhlet. Il profilo lipidico è stato poi indagato mediante tecnica GC-MS, utilizzando una colonna capillare ZB-5MS. Utilizzando il metodo Kjeldhal è stato quindi determinato il contenuto proteico dei pani. La frazione proteica è stata caratterizzata ulteriormente andando a determinare il profilo in aminoacidi, tramite idrolisi, purificazione e analisi tramite tecnica GC-MS su di una colonna SLB5 (Supelco). Infine, è stata determinata la quantità in polifenoli totali e la relativa attività antiossidante, rispettivamente tramite test di Folin-Ciocalteu e DPPH.

#### ANALISI METAGENOMICA DEL LIQUIDO DI MACERAZIONE (CREA)

L'approvazione della domanda di variante (DETERMINAZIONE Num. 13993 del 23/07/2021), ha consentito di dare luogo, presso il CREA-GB, all'attività sperimentale finalizzata all'analisi della composizione del

bioma macerante, mediante *16S rRNA metabarcoding*. Sono stati effettuati 9 cicli di macerazione, di cui il primo è stato condotto in acqua di sorgente 100%, mentre nei successivi cicli di macerazione il 5% del volume totale del bioreattore era costituito dal liquido di macerazione prodotto nel ciclo precedente (95% acqua di sorgente, 5% liquor) riducendo di 24 ore la durata del processo. Campioni di liquor del volume di 50 ml sono stati prelevati in triplicato all'inizio (T0), a metà ciclo (TM) e alla fine del ciclo macerativo (TF), per un totale di 84 campioni.

STARTER (10 l macerazione precedente)	Macerazione n°	Nome campione		
		inizio	metà	fine
NO	1	T0 11/05/21 (Prelievo vasca vuota)	T1 13/05/21	T1 - F 14/05/21
		T1 - 0 11/05/21 (prelievo con fibra)		
SI	2	T2 - 0 17/05/21	T2 - M 18/05/21	T2 - F 20/05/21
	3	T3 - 0 31/05/21	T3 - M 01/06/21	T3 - F 03/06/21
	4	T4 - 0 07/06/21	T4 - M 08/06/21	T4 - F 10/06/21
	5	T5 - 0 14/06/21	T5 - M 15/06/21	T5 - F 17/06/21
	6	T6 - 0 21/06/21	T6 - M 22/06/21	T6 - F 24/06/21
	7	T7 - 0 28/06/21	T7 - M 29/06/21	T7 - F 01/07/21
	8	T8 - 0 05/07/21	T8 - M 06/07/21	T8 - F 08/07/21
	9	T9 - 0 (12/07/21)	T9 - M (13/07/21)	T9 - F (15/07/21)

#### Estrazione DNA batterico

Per l'estrazione del DNA batterico dal liquido di macerazione (liquor) è stato adoperato il kit NucleoSpin Soil, (Macherey -Nagel), con opportune modifiche per adattarlo al nostro materiale di partenza. Infatti, il volume del campione di liquor prelevato (50 ml) è stato suddiviso equamente in due vials sterili, centrifugato a rpm max per 30' per pelletizzare i batteri contenuti e solo una delle due aliquote è stata adoperata per le analisi per non saturare il kit e garantire l'estrazione di DNA di buona qualità e quantità sufficiente per il sequenziamento. Per l'estrazione del DNA batterico il protocollo messo a punto prevedeva la risospensione del pellet batterico con 700 ul di **Buffer SL1** ed il trasferimento del risospeso **direttamente** nel Nucleospin bead tube **type A**, fornito dal kit, a cui sono stati aggiunti **150 ul di Enhancer SX**. Inoltre, al posto del vortex orizzontale suggerito dal protocollo, per l'estrazione del DNA è stato adoperato lo strumento MIXER MILL a 30 Hz per 2':50"

#### Quantificazione spettrofotometrica del DNA estratto

Il DNA batterico è stato eluito in 30 ul di buffer SE (kit) e 1 ul dell'eluato è stato quantificato in spettrofotometro Nanodrop, sfruttando la linearità tra l'assorbanza a 260 nm e la concentrazione del DNA presente in soluzione (Legge di Lambert -Beer), considerando che per il DNA 1 Unità di Assorbanza a 260nm è uguale a 50 µg/ml

#### Qualità del DNA estratto

Per verificare la qualità del DNA estratto (eventuale grado di frammentazione e dimensioni dei frammenti) 2-4 ul dell'eluato sono stati caricati su gel di agarosio 1% in TBE 0,5% e sottoposti ad Elettroforesi orizzontale a 100 volt per 20-40'.

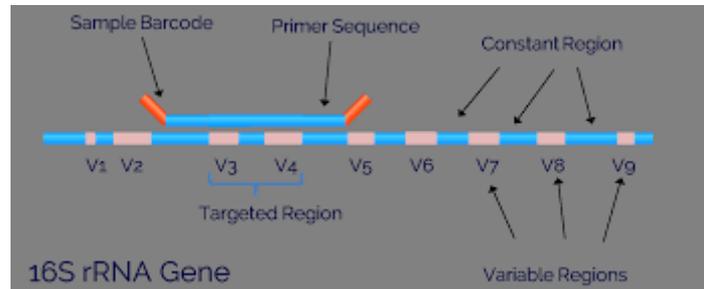
#### Amplificazione della regione target

Tutti i campioni di DNA batterico estratto sono stati sottoposti ad amplificazione della regione target (V3-V4) del gene per la subunità 16S dell'RNA ribosomiale, per il successivo sequenziamento. L'amplificazione della regione V3-V4 è stata effettuata adoperando i seguenti primers:

16S Amplicon PCR Forward Primer = 5'

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCA  
G

16S Amplicon PCR Reverse Primer = 5'  
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCT  
AATCC



Il protocollo di amplificazione PCR adoperato è stato il seguente:

1. 95°C per 3 minuti
2. 25 cicli di:
  - 95°C per 30 secondi (denaturazione)
  - 55°C per 30 secondi (appaiamento)
  - 72°C per 30 secondi (estensione)
3. 72°C per 5 minuti

Gli amplificati sono stati caricati su gel di agarosio 1% in TBE 0,5% e sottoposti a corsa elettroforetica per la visualizzazione dei prodotti di amplificazione.

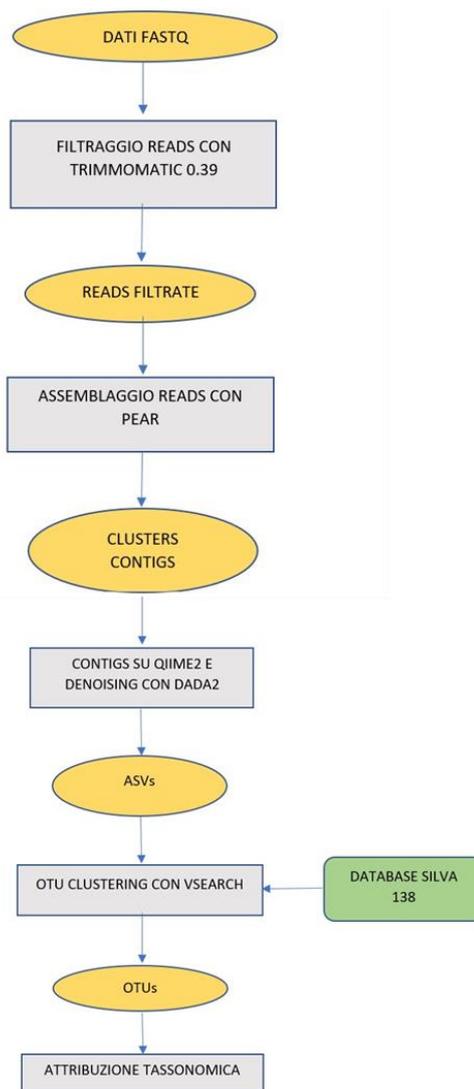
#### *Sequenziamento regione target*

Per il sequenziamento della regione target di circa 600 bp è stato adoperato lo strumento Illumina MiSeq e le relative chimiche e flow cells analitiche, seguendo scrupolosamente i protocolli forniti dalla ditta costruttrice e proprietaria della tecnologia, sintetizzabili nelle seguenti fasi:

1. Preparazione delle librerie
2. Purificazione delle librerie
3. Indicizzazione delle librerie mediante PCR
4. Purificazione delle librerie indicizzate
5. Quantificazione delle librerie indicizzate con metodo fluorimetrico
6. Normalizzazione delle librerie
7. Denaturazione delle librerie e caricamento su cartuccia Illumina
8. Sequenziamento su Illumina MiSeq

#### *Analisi bioinformatica dei dati di sequenza*

Il sequenziamento MiSeq restituisce le sequenze in files FASTQ, per la cui analisi è stata adoperata la seguente pipeline bioinformatica:



## Bibliografia

- Cirlini, M., Caligiani, A., Palla, G., De Ascentiis, A., Tortini, P. (2012). Stability studies of ozonized sunflower oil and enriched cosmetics with a dedicated peroxide value determination. *Ozone: Science & Engineering*, 34, 293–299.
- Caligiani, A., Bonzanini, F., Palla, G., Cirlini, M., Bruni, R. (2010). Characterization of a potential nutraceutical ingredient: Pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil unsaponifiable fraction. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(3), 277-283.
- Horwitz, William. *Official Methods of Analysis of AOAC International*; AOAC International, 2006; ISBN 0935584773.
- Dall'Asta, C., Cirlini, M., Morini, E., Rinaldi, M., Ganino, T., Chiavaro, E. (2013). Effect of chestnut flour supplementation on physico-chemical properties and volatiles in bread making. *LWT-Food Science and Technology*, 53 (1), 233-239.
- Caligiani, A., Marseglia, A., Sorci, A., Bonzanini, F., Lolli, V., Maistrello, L., Sforza, S. (2019). Influence of the killing method of the black soldier fly on its lipid composition. *Food Research International* 116, 276–28.
- Leni, G.; Soetemans, L.; Jacobs, J.; Depraetere, S.; Gianotten, N.; Bastiaens, L.; Caligiani, A.; Sforza, S. (2020). Protein Hydrolysates from *Alphitobius Diaperinus* and *Hermetia Illucens* Larvae Treated with Commercial Proteases. *Journal of Insects as Food and Feed*, 6, 393–404
- Marchini, M., Carini, E., Cataldi, N., Boukid, F., Blandino, M., Ganino, T., Vittadini, E., Pellegrini, N. (2021). The use of red lentil flour in bakery products: How do particle size and substitution level affect rheological properties of wheat bread dough?, *LWT* 136, Article number 110299.

<p>Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate</p>	<p>Tutti gli obiettivi previsti dal Piano sono stati raggiunti, ad eccezione del sequenziamento delle bande proteiche eluite dai gel monodimensionali (CREA) a causa della rottura del sistema HPLC di separazione dei peptidi, che precede l'analisi in spettrometria di massa. La dilatazione dei tempi per l'acquisto della nuova strumentazione, avvenuta a cavallo del periodo pandemico ha reso impossibile la messa a punto del metodo e l'esecuzione delle analisi sul nuovo strumento nei tempi del progetto. Il contenuto in chitina relativo alla biomassa larvale è stato determinato tramite metodica UPLC-MS e non tramite GC-MS e/o 1H-NMR, dal momento che lo standard analitico di glucosamina, sul quale la determinazione della chitina viene basata, non risultava rilevabile con queste due metodiche.</p> <p>Per quanto riguarda l'analisi sensoriale dei campioni di pane prodotti, per maggior semplicità e tenendo in considerazione il fatto di utilizzare giudici non addestrati, è stata preferita l'applicazione di un test di accettabilità, rispetto a un test CATA (check-all-that-apply). In questo modo i giudici hanno potuto valutare in modo diretto e semplice (mediante una scala edonica) le caratteristiche sensoriali del pane e darne quindi un giudizio complessivo.</p> <p>Infine, si è ipotizzato che potesse essere interessante determinare sui campioni di pane oggetto di studio sia la quantità in polifenoli totali che la relativa attività antiossidante, al fine di verificare quale fosse l'apporto dovuta alla farina di canapa di questi componenti bioattivi. I test (Folin-Ciocalteu e DPPH) sono stati quindi effettuati anche se non previsto per l'azione 4.</p>
--	---

**COSTI - AZIONE 4  
COSTI PERSONALE**

Cognome e nome	Mansione/ qualifica	Attività svolta nell'azione	Costo orario	Ore	Costo totale
	impiegato TI part time 80%	coordinamento scientifico e analisi	€ 33,00	15,00	€ 495,00
	Ricercatore	analisi di laboratorio	€ 0,00	-	€ 11.800,00
Totale:					€ 12.295,00

**MATERIALE CONSUMABILE**

Fornitore	Descrizione materiale	Costo
Roche Diagnostic spa / CONSIGLIO PER LA RICERCA IN AGRICOLTURA E L'ANALISI DELL'ECONOMIA AGRARIA	N. 2 kit KAPA HIFI Hs RM per sequenziamento DNA batterico	€ 1.015,04
Carlo Erba Reagents srl / CONSIGLIO PER LA RICERCA IN AGRICOLTURA E L'ANALISI DELL'ECONOMIA AGRARIA	Kit Nucleo SPIN SOIL	€ 1.140,70
VWR International srl / CONSIGLIO PER LA RICERCA IN AGRICOLTURA E L'ANALISI DELL'ECONOMIA AGRARIA	2-D Quant Kit per la quantificazione di proteine	€ 440,37
Illumina Italy srl / CONSIGLIO PER LA RICERCA IN AGRICOLTURA E L'ANALISI DELL'ECONOMIA AGRARIA	Reagenti per il sequenziamento del metagenoma microbico del liquidi di macerazione della canapa	€ 5.133,64
Fisher Scientific SAS / CONSIGLIO PER LA RICERCA IN AGRICOLTURA E L'ANALISI DELL'ECONOMIA AGRARIA	Reagenti laboratorio	€ 852,85
Fisher Scientific SAS / CONSIGLIO PER LA RICERCA IN AGRICOLTURA E L'ANALISI DELL'ECONOMIA AGRARIA	Reagenti laboratorio	€ 113,24
Fisher Scientific SAS / CONSIGLIO PER LA RICERCA IN AGRICOLTURA E L'ANALISI DELL'ECONOMIA AGRARIA	Reagenti laboratorio	€ 34,39
Illumina Italy srl / CONSIGLIO PER LA RICERCA IN AGRICOLTURA E L'ANALISI DELL'ECONOMIA AGRARIA	Reagenti per il sequenziamento del metagenoma microbico MiSeq	€ 1.800,72
VWR International srl / CONSIGLIO PER LA RICERCA IN AGRICOLTURA E L'ANALISI DELL'ECONOMIA AGRARIA	Reagenti per analisi proteomica su farina di canapa	€ 1.593,78
Fisher Scientific SAS / CONSIGLIO PER LA RICERCA IN AGRICOLTURA E L'ANALISI DELL'ECONOMIA AGRARIA	Reagenti laboratorio	€ 77,36
Beckman Coulter spa / CONSIGLIO PER LA RICERCA IN AGRICOLTURA E L'ANALISI DELL'ECONOMIA AGRARIA	N. 3 Agencourt AMPure XP	€ 1.177,06
VWR INTERNATIONAL SRL / UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	[EN]KJELDAHL CATALYST FREE OF Hg AND Se - [EN]KJELDAHL CATALYST WIENINGER 3,5 G	€ 1.177,30
VWR INTERNATIONAL SRL / UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	PROVETTA BAVIS 16x160 MM VETRO PYREX - T	€ 158,60
Carlo Erba Reagents / UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	508801 N,N-DIMETILFORMAMMIDE RE 1L 446731 ESAMETILDISILAZANO RPE 25ML 386002 TOLUENE RE 1L	€ 52,22
Carlo Erba Reagents / UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	L04393906 N,O-BIS(TRIMETHYLSILYL)TRIFLUOROACETA 5G LA13651AC CHLOROTRIMETHYLSILANE, 98+ 25ML LA1448818 3-OCTANOL, 95 50G	€ 155,90
INCOFAR S.R.L. / UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA	CUVETTA SEMI-MICRO UV GRADE F. BASSA ML.1,5 CF/100	€ 263,03

<b>Azione</b>	<b>AZIONE 5: SVILUPPO DI NUOVI FORMULATI PER ALIMENTI FUNZIONALI E ADDITIVI PER L'INDUSTRIA MANGIMISTICA</b>
<b>Unità</b>	UNIPR-SITEIA
<b>Descrizione delle attività</b>	<p><b>Produzione di nuovi formulati per alimenti funzionali</b></p> <p>Sulla base delle caratteristiche di olio e farina di canapa analizzati nell'azione 4, è stato possibile ipotizzare una loro applicazione nell'industria alimentare. Dal momento che l'olio di canapa risulta ricco in acidi grassi <math>\omega_3</math>, steroli vegetali e composti potenzialmente antiossidanti (polifenoli), che possono facilmente ossidarsi o degradarsi in seguito a trattamenti termici, è stato ipotizzato che per mantenerne intatte le proprietà nutraceutiche e organolettiche, esso debba essere consumato tal quale, a freddo. Per quanto riguarda la farina di canapa ottenuta dal setacciamento (&lt;0,5mm) del pannello macinato a pietra, sono state valutate le possibilità di applicazione nella panificazione, ed in particolare nella produzione di pani speciali privi di glutine, ipotizzando che le proprietà della farina di canapa (acidi grassi e aminoacidi essenziali, polifenoli, fibra) potessero migliorare il profilo nutrizionale di questa tipologia di prodotto.</p> <p>Le miscele disponibili in commercio per preparare pane senza glutine sono piuttosto differenti tra loro, quindi, per individuare la miglior percentuale di farina di canapa da utilizzare in panificazione, è stato necessario partire da formulati a base di farina di frumento. Pertanto, sono state allestite delle prove di panificazione con farina di frumento addizionata di farina di canapa in percentuali diverse. Sono state quindi realizzate 4 diverse formulazioni di impasto per il pane: una di controllo (STD, senza aggiunta di farina di canapa), una al 10% di farina di canapa (H10), una al 15% di farina di canapa (H15) e una al 25% di farina di canapa (H25). La valutazione tecnologica e sensoriale di questi pani (azione 4) ha consentito di individuare nel 15% la percentuale di farina di canapa più idonea a realizzare un prodotto dalle buone proprietà tecnologiche, organolettiche e sensoriali.</p> <p>Sono state selezionate 6 diverse miscele di farina senza glutine per panificazione tra quelle disponibili in commercio. Per la produzione dei pani, è stata usata una macchina per il pane (Moulinex uno B07, Moulinex, Francia), applicando un programma preimpostato.</p> <p>Dopo diverse prove di panificazione, solo 2 mix (indicate con le sigle "CO" e "DE") hanno presentato le caratteristiche migliori e quindi sono stati utilizzati per produrre diversi campioni di pane addizionato di farina di canapa al 15%. Questi prodotti sono stati sottoposti a caratterizzazione, effettuando opportuni campionamenti sul prodotto, sezionando il pane in 5 diverse fette, scartando le parti più esterne. Sui campioni è stato determinato: <b>il volume specifico</b> attraverso il metodo 10-05 dell'American Association Cereal Chemistry (AACC, 2001); <b>il contenuto in acqua</b> (moisture content o MC) tramite essiccazione in stufa a una temperatura di 105°C fino al raggiungimento di un peso costante; <b>l'attività dell'acqua (<math>a_w</math>)</b> usando un igrometro (Aqualab 4TE, Decagon Devices, WA, USA) a temperatura ambiente; <b>analisi dell'immagine</b> tramite l'utilizzo di uno scanner (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) a una risoluzione di 600 dpi (punti per pollice) e il software ImageJ (Media Cybernetics Inc., USA) è stato utilizzato per analizzare le immagini; <b>analisi della texture</b> tramite Texture Analyzer TA.TX2 (Stable Micro System, Goldalming, Regno Unito); <b>analisi del colore</b> tramite colorimetro (CM 2600d, Minolta Co., Osaka, Giappone); determinazione del <b>contenuto in polifenoli totali</b> e <b>attività antiossidante</b> tramite saggio di Folin-Ciocalteu e test del DPPH associati a misure spettrofotometriche; <b>determinazione di proteine</b> tramite metodo Kjeldhal, di <b>grassi</b> tramite metodo Soxhlet, del profilo in aminoacidi essenziali e acidi grassi essenziali tramite tecnica GC-MS. I campioni sono stati trattati e analizzati con le stesse</p>

	<p>metodiche di analisi descritte nell'azione 4. E' stata eseguita inoltre <b>un'analisi sensoriale dei pani sviluppati</b>, come descritto in precedenza (azione 4).</p> <p><b>Produzione di additivi per l'industria mangimistica dalla biomassa larvale</b></p> <p>La frazione proteica ottenuta dalla massa larvale, privata dei grassi e della chitina, è stata idrolizzata utilizzando come enzima una proteasi commerciale (l'alcalasi) per 3 e 15 ore (come descritto per l'azione 4) e quindi le frazioni ottenute sono state caratterizzate.</p> <p>La composizione degli estratti proteici idrolizzati è stata determinata in termini di sostanza secca, contenuto proteico, lipidico e di ceneri. Il contenuto proteico è stato determinato tramite metodo Kjeldhal che prevede una fase di mineralizzazione del campione con acido solforico e acido fosfosolforico, seguita da una distillazione in corrente di vapore e un'ultima fase di titolazione acido-base nella quale si utilizza come titolante acido cloridrico; per quanto riguarda la sostanza secca, questa è stata determinata tramite riscaldamento in stufa a 105°C per almeno 24 ore o comunque fino a peso costante; le ceneri sono state determinate tramite riscaldamento in muffola alla temperatura di 520 - 550°C fino a completo incenerimento del campione; il contenuto in grassi è stato determinato tramite il metodo di Folch.</p> <p>La frazione proteica è stata quindi caratterizzata mediante tecnica UHPLC-MS, al fine di individuare la presenza di peptidi bioattivi. A questo scopo è stata eseguita una valutazione <i>in silico</i>, ovvero le sequenze peptidiche identificate sono state studiate e caratterizzate tramite appositi software e database online (come descritto per l'azione 4). La potenziale bioattività è stata valutata utilizzando il software PEPTIDE RANKER e per risalire a quale fosse la specifica bioattività, è stato utilizzato il database BIOPEP.</p>
<p>Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate</p>	<p>Gli obiettivi di questa azione sono stati raggiunti pienamente.</p>

**COSTI - AZIONE 5  
COSTI PERSONALE**

Cognome e nome	Mansione/ qualifica	Attività svolta nell'azione	Costo orario	Ore	Costo totale
	Prof.ssa Associata	prove sperimentali	€ 48,00	79,00	€ 3.792,00
	Prof.ssa Associata	prove sperimentali	€ 48,00	79,00	€ 3.792,00
Totale:					€ 7.584,00

<b>Azione 6</b>	<b>AZIONE 6: RACCOLTA ED ELABORAZIONE DATI</b>																																																				
Unità aziendale responsabile	CREA, collaborano UNIPR-SITEIA, Stuard																																																				
Descrizione delle attività	<p>COLLAUDO DEL SISTEMA DI PRERISCALDAMENTO (Azione 2):</p> <p>1. RESA IN OLIO E PANNELLO (Naturfibre)</p> <p>La prova di resa in spremitura è stata effettuata ad un'unica temperatura di preriscaldamento della coclea (72°C), adoperando 19 kg di seme (20 kg, purezza misurata con vaglio pari al 95%). I dati sono riportati in tabella</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="9">ESPERIMENTO RESA SPREMITURA</th> </tr> <tr> <th>T1</th> <th>T2(set)</th> <th>T3</th> <th>T4</th> <th>T5</th> <th>T6</th> <th>T7</th> <th>olio 1 (kg)</th> <th>panello 1 (kg)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>27°C</td> <td>72</td> <td>42</td> <td>44</td> <td>58</td> <td>-</td> <td>54</td> <td>4,916</td> <td>14,5</td> </tr> </tbody> </table> <p>La resa in olio è stata calcolata in percentuale (4,916 kg/19 kg) x100 = 25,87%</p> <p>Così come la resa in pannello (14,5 kg/19 kg) x 100 = 76,31%</p> <p>Considerando che la resa in olio del seme spremuto a freddo dichiarata dalla ditta fornitrice era del 24,5%, il preriscaldamento del seme ha consentito di ottenere un evidente incremento della resa. La quantità limitata di seme disponibile per le prove di resa del preriscaldamento (19 kg totali) non ha consentito una misurazione precisa di tale incremento</p> <p>2. QUALITA' DI OLIO E PANNELLO PRODOTTO (UNIPR-SITEIA)</p> <p>UNIPR-SITEIA si è occupata della valutazione della qualità dell'olio che è stato estratto dall'impianto di spremitura a freddo, applicando diverse temperature di preriscaldamento del seme. Al fine di valutare qualitativamente i campioni di olio raccolti, è stata eseguita la determinazione dell'acidità totale e la determinazione del numero o indice di perossidi (NP o IP). Di seguito si riportano i risultati ottenuti:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Acidità %</th> <th>IP (mEq O<sub>2</sub>/kg olio)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>RT</td> <td>1,86 ± 0,12</td> <td>1,30 ± 0,21</td> </tr> <tr> <td>T 60</td> <td>2,15 ± 0,12</td> <td>0,40 ± 0,00</td> </tr> <tr> <td>T 80</td> <td>1,95 ± 0,05</td> <td>0,65 ± 0,14</td> </tr> <tr> <td>T 150</td> <td>1,58 ± 0,03</td> <td>1,33 ± 0,05</td> </tr> </tbody> </table> <p>I dati mostrano valori di acidità compresi tra circa 1,5 e 2,15%, mentre valori compresi tra 0,4 e 1,35 mEq O<sub>2</sub>/kg olio sono stati riscontrati per il numero di perossidi. E' possibile notare come l'utilizzo di elevate temperature di pre-riscaldamento porti a un IP maggiore, anche se ancora confrontabile con i valori ottenuti per il campione di riferimento (RT) estratto a temperatura ambiente. Sui pannelli esausti è stata valutata la % di grasso (olio) rimasta all'interno del residuo di estrazione al fine di capire se la resa potesse essere soddisfacente.</p> <p>I risultati sono riportati nella tabella seguente.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Grassi %</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Pannello da estrazione olio RT</td> <td>10,20 ± 0,50</td> </tr> <tr> <td>Pannello da estrazione olio T 60°</td> <td>10,07 ± 0,20</td> </tr> <tr> <td>Pannello da estrazione olio T 80°</td> <td>11,04 ± 0,21</td> </tr> <tr> <td>Pannello da estrazione olio T 150°</td> <td>7,22 ± 0,19</td> </tr> </tbody> </table> <p>I dati relativi alla percentuale di grasso rimasta nel pannello dopo l'estrazione dell'olio da temperatura ambiente fino a 80°C sono in linea con quanto riportato in letteratura (% grasso della farina di canapa = 11% circa), mentre il preriscaldamento del seme a 150 °C</p>	ESPERIMENTO RESA SPREMITURA									T1	T2(set)	T3	T4	T5	T6	T7	olio 1 (kg)	panello 1 (kg)	27°C	72	42	44	58	-	54	4,916	14,5		Acidità %	IP (mEq O <sub>2</sub> /kg olio)	RT	1,86 ± 0,12	1,30 ± 0,21	T 60	2,15 ± 0,12	0,40 ± 0,00	T 80	1,95 ± 0,05	0,65 ± 0,14	T 150	1,58 ± 0,03	1,33 ± 0,05		Grassi %	Pannello da estrazione olio RT	10,20 ± 0,50	Pannello da estrazione olio T 60°	10,07 ± 0,20	Pannello da estrazione olio T 80°	11,04 ± 0,21	Pannello da estrazione olio T 150°	7,22 ± 0,19
ESPERIMENTO RESA SPREMITURA																																																					
T1	T2(set)	T3	T4	T5	T6	T7	olio 1 (kg)	panello 1 (kg)																																													
27°C	72	42	44	58	-	54	4,916	14,5																																													
	Acidità %	IP (mEq O <sub>2</sub> /kg olio)																																																			
RT	1,86 ± 0,12	1,30 ± 0,21																																																			
T 60	2,15 ± 0,12	0,40 ± 0,00																																																			
T 80	1,95 ± 0,05	0,65 ± 0,14																																																			
T 150	1,58 ± 0,03	1,33 ± 0,05																																																			
	Grassi %																																																				
Pannello da estrazione olio RT	10,20 ± 0,50																																																				
Pannello da estrazione olio T 60°	10,07 ± 0,20																																																				
Pannello da estrazione olio T 80°	11,04 ± 0,21																																																				
Pannello da estrazione olio T 150°	7,22 ± 0,19																																																				

sicuramente consente di estrarre una maggiore quantità di olio dal seme, dato l'abbassamento della percentuale di olio riscontrata nel pannello. Riguardo l'acidità ed il numero dei perossidi, facendo riferimento alla normativa vigente per l'olio di oliva (non essendo disponibile una normativa per l'olio di canapa) si può dire che il preriscaldamento consente di ottenere un olio di qualità paragonabile all'olio di oliva "vergine". Riguardo il numero dei perossidi, tutte le temperature provate consentono di ottenere un olio di qualità pari all'olio di oliva "extravergine" e "vergine" (N.P. < 20). Tuttavia, mentre un elevato numero di perossidi evidenzia un processo di ossidazione primaria già avviato ed irreversibile, un basso numero di perossidi non è necessariamente legato a qualità elevata, in quanto si può essere già in presenza della fase secondaria dell'ossidazione, in cui i perossidi si sono decomposti in aldeidi e chetoni, responsabili della sensazione di rancido.

#### CONTROLLO QUALITÀ DELLA FIBRA MACERATA E RIPULITA (Azione 3, STUARD, CREA)

In totale sono stati condotti 5 esperimenti indipendenti di macerazione e successiva pulizia della fibra macerata con larve di *H. illucens*. Per ogni esperimento è stato allestito un controllo (fibra pulita con metodo convenzionale) e 3 trattati (fibra pulita con larve di *H. illucens*) in vasche separate. Ogni esperimento di macerazione è stato condotto adoperando fibra della stessa varietà, proveniente dai campi sperimentali del progetto. In totale sono stati analizzati 20 campioni di fibra (5 controlli e 15 trattati) e per ciascun campione è stata misurata la resistenza alla tensione. Nella tabella sottostante sono riportati i valori medi misurati per controllo e trattato.

CAMPIONE	F medio (N)	Dev. St. ( $\sigma$ )	Peso medio (mg)	Dev. St. ( $\sigma$ )	Tenacia Media	Dev. St. ( $\sigma$ )
Controllo	53,2	13,97	4,64	2,08	18,19	3,75
Trattato	52,3	16,2	6,08	2,11	13,18	2,27

L'analisi dei dati raccolti ha evidenziato una notevole variabilità tra campioni, che era attesa visto il limitato numero di campioni analizzato e la naturale eterogeneità della fibra. Le ridotte dimensioni del campione e l'elevato grado di variabilità tra campioni non consentono di effettuare un'analisi statistica dei dati, ma dai valori medi di F e tenacia sembrerebbe che la pulizia della fibra da parte delle larve di *H. illucens* sia un trattamento più aggressivo rispetto a quello convenzionale, causando una diminuzione della forza di rottura e della tenacia della fibra ottenuta. L'analisi di un numero considerevolmente maggiore di campioni e di repliche biologiche e tecniche consentirà di effettuare una valutazione molto più accurata dell'efficacia del sistema di pulitura proposto.

#### CARATTERIZZAZIONE DELL'OLIO DI CANAPA (UNIPR-SITEIA; azione 4)

L'olio ottenuto dalla spremitura delle sementi è stato caratterizzato andando a ottenere il profilo in acidi grassi, il profilo della frazione insaponificabile, la distribuzione delle classi lipidiche, la stabilità ossidativa ed il contenuto in polifenoli totali.

##### *Profilo in acidi grassi dell'olio di canapa:*

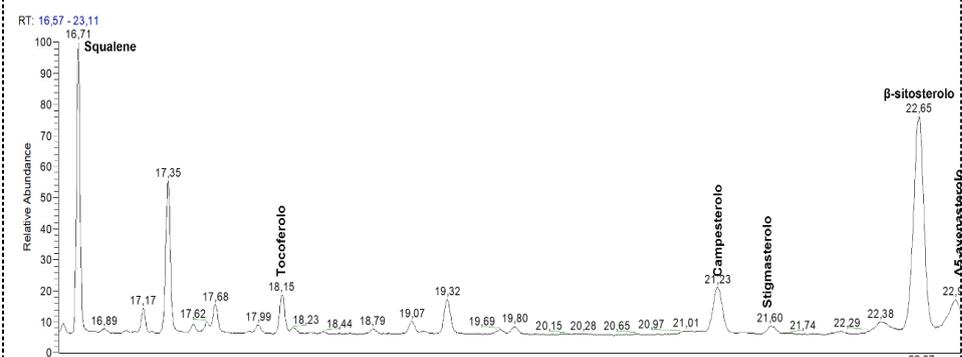
Il profilo in acidi grassi dell'olio di canapa, analizzato in triplicato, è stato indagato tramite tecnica GC-MS. I risultati sono riportati di seguito:

Acido grasso	ID	Composizione Olio (g/100g di prodotto)	Composizione Olio (%)
Miristico	C14:0	0,041 ± 0,004	0,15 ± 0,013
Pentadecanoico	C15:0	0,018 ± 0,001	0,07 ± 0,002
Palmitoleico	C16:1	0,168 ± 0,009	0,61 ± 0,028
Palmitico	C16:0	3,597 ± 0,143	13,13 ± 0,433
Eptadecanoico	C17:1	0,052 ± 0	0,19 ± 0
Eptadecanoico	C17:0	0,060 ± 0,003	0,22 ± 0,011
Linolenico ω-3	C18:3	3,399 ± 0,020	12,40 ± 0,006
Linoleico ω-6	C18:2	9,302 ± 0,044	34,15 ± 0,056
Oleico ω-9	C18:1	5,315 ± 0,218	19,40 ± 0,926
Stearico	C18:0	3,053 ± 0,124	11,14 ± 0,384
Eicosadienoico	C20:2	0,241 ± 0,002	0,88 ± 0,001
Eicosenoico	C20:1	0,404 ± 0,005	1,47 ± 0,028
Eicosanoico	C20:0	1,100 ± 0,055	4,04 ± 0,148
Eneicosanoico	C21:0	0,014 ± 0,001	0,05 ± 0,001
Erucico	C22:1	0,012 ± 0,001	0,04 ± 0,003
Docosanoico	C22:0	0,356 ± 0,004	1,30 ± 0,024
Nervonico	C24:1	0,004 ± 0,001	0,02 ± 0,001
Tetracosanoico	C24:0	0,099 ± 0,004	0,36 ± 0,018
<b>Totale</b>		<b>27,40</b>	<b>100</b>
<b>Saturi</b>		<b>8,34</b>	<b>30,43</b>
<b>Insaturi</b>		<b>19,06</b>	<b>69,57</b>
<b>Monoinsaturi</b>		<b>6,12</b>	<b>22,34</b>
<b>Polinsaturi</b>		<b>12,94</b>	<b>47,23</b>
<b>ω-6/ω-3</b>		<b>2,74</b>	

Grazie all'analisi in GC-MS è stato possibile indentificare acidi grassi a media e lunga catena nell'intervallo da 14 a 24 atomi di carbonio. L'acido linoleico è l'acido grasso maggiormente rappresentativo, seguito dall'acido oleico e dall'acido linolenico. Per quanto riguarda, invece, gli acidi grassi saturi, le percentuali maggiormente rappresentative sono riscontrabili per l'acido palmitico e l'acido stearico.

*Profilo della frazione insaponificabile dell'olio di canapa:*

La frazione insaponificabile è stata caratterizzata tramite tecnica GC-MS, previo trattamento del campione. Il profilo ha mostrato la presenza di diversi steroli vegetali, come evidenziato nel gas-cromatogramma riportato di seguito:



Grazie all'utilizzo di uno standard interno è stato possibile semi-quantificare il contenuto in steroli della frazione insaponificabile dell'olio di canapa:

NOME	mg/g	(DEV.STD)
Squalene	245,47	215,43
Tocoferolo	105,53	5,94
Campesterolo	232,32	44,49
Stigmasterolo	65,80	16,68
β-sitosterolo	928,36	147,58
Δ <sub>5</sub> -avenasterolo	233,46	27,18

Dai dati si evince che il composto più abbondante è il β-sitosterolo, seguito dallo squalene, dal Δ<sub>5</sub>-avenasterolo e dal campesterolo; in

quantità minore sono stati rilevati i tocoferoli e lo stigmasterolo.

*Distribuzione delle classi lipidiche dell'olio di canapa:*

Dall'analisi seguita tramite risonanza magnetico-nucleare  $^1\text{H-NMR}$  a 400 MHz, è emerso che l'olio è composto per la sua totalità da trigliceridi e quindi non si evidenziano quantità rilevabili di acidi grassi liberi. Quindi l'olio dovrebbe risultare stabile all'ossidazione.

*Stabilità ossidativa dell'olio di canapa:*

Ai fini di indagare la stabilità ossidativa dell'olio di canapa, partendo dal presupposto che i maggiori componenti sono l'acido linoleico e oleico, sono stati determinati due parametri utili come l'acidità percentuale e l'indice di perossido (IP).

E' stata ottenuta un'acidità di:  $0,87 \pm 0,04 \%$ .

E' stata ottenuto un IP di:  $2,09 \pm 0,01 \text{ mEqO}_2/\text{Kg}$ .

I dati ottenuti, in linea con la letteratura, mostrano come l'olio di canapa ottenuto abbia una bassa acidità e un basso indice di perossido, indicatori di stabilità all'ossidazione, se la conservazione è effettuata in modo opportuno (contenitori scuri e assenza di ossigeno).

*Determinazione della quantità di polifenoli dell'olio di canapa:*

Il saggio di Folin-Ciocalteu è stato impiegato per determinare il contenuto in polifenoli totali dell'olio di canapa.

L'olio in esame ha mostrato un contenuto in polifenoli di  $29,13 \pm 8,28 \text{ mg/Kg GAE}$ .

**CARATTERIZZAZIONE NUTRIZIONALE DELLA FARINA DI CANAPA (SITEIA-UNIPR, azione 4)**

Ai fini di caratterizzare le proprietà nutrizionali della farina di canapa, sono stati determinati umidità, ceneri, proteine, lipidi, polifenoli totali, fibra e carboidrati.

La sostanza secca della farina di canapa è risultata essere pari a  $90.2 \pm 0.22 \%$ . I risultati relativi ai parametri quali grassi, proteine, carboidrati, fibra e ceneri vengono calcolati sulla base della sostanza secca (SS).

Composizione (%SS)	Farina Canapa
Grassi	$12,2 \pm 0.2$
Proteine	$33.9 \pm 0.2$
Ceneri	$0.069 \pm 0.003$
Fibra insolubile	$48,6 \pm 0.4$
Fibra solubile	$2,85 \pm 0.2$
Carboidrati disponibili e altri comp.*	2,38

Per quanto riguarda il contenuto in polifenoli totali, è stata misurata una quantità di  $866,72 \pm 30,24 \text{ mg/Kg GAE}$ , risultati in linea da quelli descritti in letteratura, pari a  $744 \pm 29$  e  $21 \pm 5 \text{ mg/Kg GAE}$ .

**CARATTERIZZAZIONE DEL PROFILO NUTRIZIONALE DELLA BIOMASSA LARVALE E DEGLI IDROLIZZATI (UNIPR-SITEIA, azione 4)**

Il profilo nutrizionale della biomassa larvale sarà caratterizzato mediante analisi centesimale dei parametri misurati per l'analisi della farina. In particolare, sono stati determinati parametri ritenuti interessanti per caratterizzare questo tipo di matrice, come: umidità, ceneri, grassi e proteine.

Sono stati ottenuti i seguenti risultati, riportati sulla sostanza secca (SS):

Composizione	Percentuale (SS)	Deviazione standard
Sostanza secca	20.08	0.43
Proteine totali	46.30	4.57
Lipidi	12.41	0.81
Ceneri	16.56	0.65

Dalla composizione chimica ottenuta si può osservare che il contenuto di sostanza secca è risultato essere pari al  $20.08 \pm 0.43\%$ , valore inferiore a quelli riportati in letteratura, generalmente pari al 30%. Anche il contenuto lipidico, pari al  $12.41 \pm 0.81\%$  riferito alla sostanza secca, è inferiore a quello che generalmente viene determinato, ma è linea con il range tra il 12% e il 30% che viene descritto per le larve di mosca soldato. E' da considerare il fatto di aver applicato una metodica che prevede un'estrazione dei grassi a temperatura ambiente, ideale per poter poi fare ulteriori indagini sul grasso ottenuto, ma non del tutto quantitativa come invece lo sarebbe la metodica Soxhlet che prevede invece l'utilizzo di temperature elevate. Queste però andrebbero a indurre modificazioni molecolari e ulteriori indagini sul grasso estratto non sarebbero possibili.

La frazione proteica e quella lipidica sono state caratterizzate dal punto di vista molecolare, al fine di indagare quale fosse la loro composizione, grazie alla quale si può valutare l'effettiva qualità nutrizionale della matrice.

#### Caratterizzazione della frazione proteica:

Al fine di caratterizzare la frazione proteica, innanzitutto è stato determinato il contenuto in chitina. Dal momento che la determinazione di questo parametro non risulta semplice, è stato utilizzato un metodo che prevede l'estrazione della chitina dalla matrice, la sua separazione cromatografica da altri analiti estratti contemporaneamente, l'identificazione sulla base del caratteristico spettro di massa e la semi-quantificazione sulla base dell'utilizzo di uno standard di riferimento (galattosammina). La concentrazione in chitina viene determinata sulla base del contenuto in glucosammina, ottenuta dall'idrolisi della chitina stessa. La percentuale di chitina ottenuta è di circa 10 % ( $9,43 \pm 0,47\%$ ), in linea con il contenuto atteso.

La frazione proteica è stata caratterizzata in termini di profilo amino acidico, al fine di capire quali amino acidi vadano a comporre le proteine, ponendo particolare attenzione a quelli che sono gli amino acidi essenziali. La caratterizzazione del profilo aminoacidico ha portato a ottenere informazioni sia qualitative che quantitative sulla presenza/assenza di aminoacidi essenziali e non, all'interno della biomassa larvale. Ai fini di capire se questa biomassa potesse essere impiegata come mangime per gli animali, il profilo in amino acidi e le relative quantità, è stato confrontato con quello della soia. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella seguente:

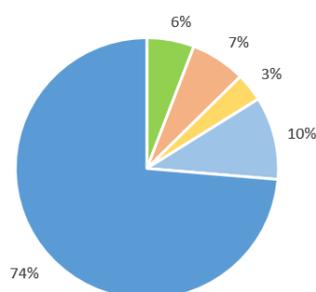
	mg/g proteina SS	FAO/WHO 1985 (mg/g protein)	Soia (mg/g proteina)
<b>Aminoacidi essenziali</b>			
Treonina (Thr)	50,59 ± 7,08	23	38
Valina (Val)	103,83 ± 13,24	39	43
Lisina (Lys)	75,67 ± 7,58	45	63
Isoleucina (Ile)	55,47 ± 5,03	30	47
Leucina (Leu)	56,54 ± 2,29	59	85
Fenilalanina (Phe)	56,94 ± 3,12		
Metionina (Met)	47,64 ± 7,16		
<b>Aminoacidi non essenziali</b>			
Acido Aspartico (Asp)	43,89 ± 2,58		
Serina (Ser)	51,51 ± 11,37		
Acido Glutammico (Glu)	88,57 ± 5,36		
Glicina (Gly)	74,40 ± 9,09		
Alanina (Ala)	121,29 ± 17,09		
Prolina (Pro)	31,84 ± 2,07		
Idrossi prolina	1,54 ± 0,20		
Tirosina (Tyr)	56,94 ± 3,12		

Dai dati ottenuti, si può osservare come la biomassa larvale sia ricca in aminoacidi essenziali, così come la loro concentrazione è comparabile e a volte maggiore rispetto ai dati riportati per la soia. Questo aspetto può far propendere per un utilizzo come mangime. Inoltre, la quantità di questi componenti andrebbe a soddisfare il fabbisogno necessario per l'alimentazione umana indicato da FAO/WHO dal 1985.

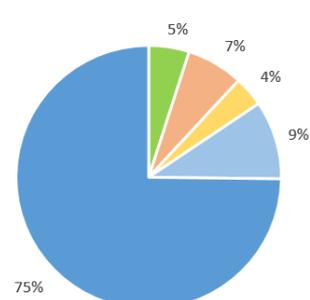
Infine, la frazione proteica è stata sottoposta ad **idrolisi**, al fine di produrre degli idrolizzati proteici ricchi in peptidi potenzialmente bioattivi.

L'analisi ha permesso di identificare un totale di 499 e 463 peptidi negli estratti proteici idrolizzati rispettivamente per 3 e 15 ore, quindi un numero confrontabile. Nonostante la maggior parte di questi peptidi derivi da proteine classificate come "ipotetiche" dal database dal momento che le proteine di mosca soldato non sono ancora state del tutto delucidate, è stato possibile attribuire la presenza dei peptidi a 4 classi proteiche: proteine ipotetiche, proteine muscolari, in particolare actina, tropomiosina e miosina, proteine cuticolari e proteine con funzioni diverse da quelle elencate in precedenza. Di seguito si riporta la distribuzione dei peptidi nelle diverse classi proteiche:

Estratti proteici idrolizzati 3 h



Estratti proteici idrolizzati 15 h



■ Proteine muscolari ■ Proteine enzimatiche ■ Proteine cuticolari ■ Altre proteine ■ Proteine ipotetiche

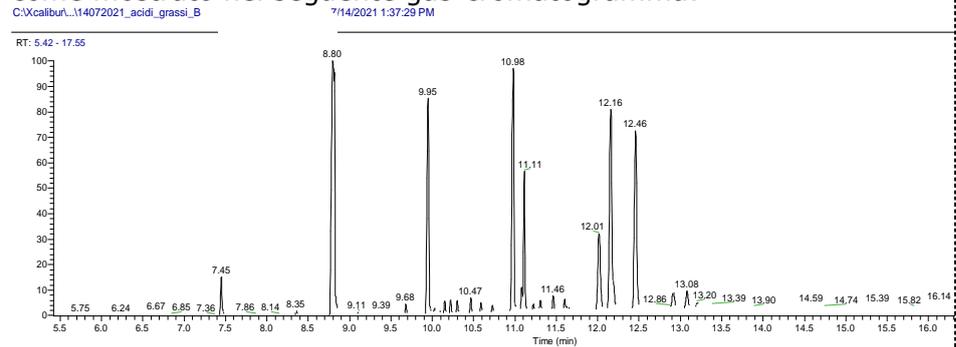
Una volta caratterizzato il profilo peptidico degli estratti proteici idrolizzati, è stata valutata la potenziale bioattività utilizzando il software PEPTIDE RANKER. In questo modo sono stati individuati più di 30 peptidi potenzialmente bioattivi. Quindi per capire quale fosse la specifica bioattività, è stato utilizzato il database BIOPEP. In questo modo è stato possibile risalire alla presenza di 25 peptidi contenenti sequenze ACE inibitori (inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina, quindi antipertensivi) negli idrolizzati proteici

analizzati dopo 3h e 19 peptidi contenenti sequenze ACE inibitori negli idrolizzati proteici analizzati dopo 15h. Inoltre, in entrambi gli idrolizzati sono stati identificati alcuni peptidi (circa una decina) correlabili con una potenziale bioattività che permette di inibire la dipeptidil peptidasi IV (DPP-IV; azione antidiabetica). Osservando in generale i dati ottenuti dai dagli estratti proteici idrolizzati rispettivamente 3 e 15 ore, si può osservare che dal punto di vista del profilo peptidico e della potenziale bioattività non vi sono grandi differenze. Dal punto di vista industriale un processo di idrolisi con una durata di circa 3 ore è sicuramente il più favorevole e preferibile.

#### Caratterizzazione della frazione lipidica:

Prima di tutto è stato determinato il profilo in acidi grassi del campione di larve di *Hermetia illucens*.

Il profilo in acidi grassi ha mostrato la presenza di diversi segnali, come mostrato nel seguente gas-cromatogramma:



Di seguito si riportano le concentrazioni e le percentuali dei diversi acidi grassi identificati:

Acidi grassi	ID	µg/g di grasso	deviazione standard	Percentuale	deviazione standard
Acido caprico	C10:0	848,3074	121,41	1,70	0,11
Acido laurico	C12:0	12880,9856	1433,65	25,84	0,85
Acido miristico	C14:0	5915,4156	530,48	11,88	0,13
Acido miristoleico	C14:1	275,5099	65,31	0,55	0,09
Acido pentadecanoico	C15:0	707,6517	19,99	1,42	0,07
Acido palmitico	C16:0	7480,2712	572,91	15,03	0,03
Acido sapienico	C16:1	2950,6353	174,74	5,93	0,12
Acido margarico	C17:0	384,7855	8,92	0,77	0,04
Acido eptadecenoico	C17:1	234,8093	18,28	0,47	0,00
Acido stearico	C18:0	2837,2134	79,60	5,71	0,29
Acido oleico	C18:1	7586,1798	470,16	15,25	0,25
Acido linoleico	C18:2	6852,9068	439,75	13,77	0,20
Acido linolenico	C18:3	597,8509	9,68	1,21	0,11
Acido arachico	C20:0	95,8852	5,73	0,19	0,03
Acido gadoleico	C20:1	69,5136	1,43	0,14	0,01
Acido bebenico	C22:0	66,2847	6,43	0,13	0,02
<b>Totale saturi</b>		<b>31216,8003</b>	<b>2754,80</b>	<b>62,68</b>	<b>0,61</b>
<b>Totale monoinsaturi</b>		<b>11116,6478</b>	<b>727,06</b>	<b>22,34</b>	<b>0,30</b>
<b>Totale polinsaturi</b>		<b>7450,7577</b>	<b>430,07</b>	<b>14,98</b>	<b>0,31</b>

E' stato possibile indentificare acidi grassi a corta, media e lunga catena nell'intervallo da 10:0 a 22:0. L'acido laurico (12:0) è l'acido grasso preponderante. Altri acidi grassi saturi presenti in quantità significative sono l'acido miristico (14:0), l'acido palmitico (16:0) e l'acido stearico (18:0). Per quanto riguarda gli acidi grassi polinsaturi (PUFA), quelli in maggiore quantità sono l'acido oleico (18:1) e l'acido linoleico (18:2), rispettivamente con concentrazioni pari a  $15,25 \pm 0,25\%$  e  $13,77 \pm 0,20\%$ . È presente anche una piccola percentuale pari al  $1,21 \pm 0,11\%$  di acido linolenico (18:3).

Per determinare il profilo della frazione insaponificabile i risultati ottenuti sono riassunti nella seguente tabella:

	g/100g di grasso	deviazione standard	Percentuale	deviazione standard
Policosanoli	0,0381	0,0037	8,67	1,43
Colesterolo	0,0104	0,0000	2,39	0,63
Campesterolo	0,0922	0,0255	20,49	0,38
Stigmasterolo	0,0356	0,0045	8,06	1,09
$\beta$ -sitosterolo	0,2273	0,0707	50,28	2,72
Stigmastanolo	0,0356	0,0131	7,81	0,91
Squalene	0,0016	0,0005	0,35	0,03
Totale (g/100 g di grasso)	0,4490	0,1162		

Gli steroli presenti in maggiori quantità all'interno delle larve di mosca soldato sono il  $\beta$ -sitosterolo ( $50.28 \pm 2.72\%$ ) e il campesterolo ( $20.49 \pm 0.38\%$ ), generalmente caratteristici dei grassi di origine vegetale, mentre il colesterolo è presente in quantità minime ( $2.39 \pm 0.63\%$ ). Il  $\beta$ -sitosterolo, come detto in precedenza, è lo sterolo vegetale maggiormente rappresentativo sia dell'olio che della farina di canapa.

La frazione grassa della massa larvale è stata caratterizzata anche tramite tecnica  $^1\text{H-NMR}$ . Di seguito si riporta lo spettro ottenuto:



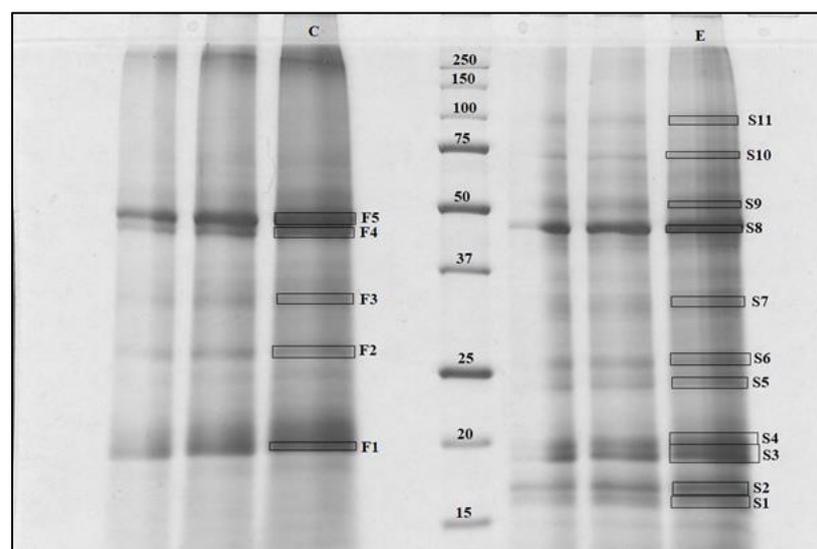
E' stato possibile identificare e semi-quantificare i seguenti componenti:

Distribuzione classi lipidi	%
Digliceridi (posizione 1,2)	3.01
Monogliceridi (posizione 2)	2.24
Trigliceridi	78.97
Digliceridi (posizione 1,3)	3.44
Monogliceridi (posizione 1)	12.32
Acidi Grassi liberi	0

Dal momento che la presenza di acidi grassi in forma libera risulta trascurabile, si può ipotizzare che il grasso della biomassa larvale presenti un'elevata stabilità all'ossidazione. Questa ipotesi è corroborata anche dal fatto che i maggiori componenti che rappresentano la frazione in acidi grassi di questi lipidi, sia composta da acidi grassi saturi (% > 60%) come descritto in precedenza. La composizione chimica della biomassa larvale permette quindi di ipotizzare l'utilizzo di questa come mangime per animali, visto soprattutto l'elevata qualità della componente proteica.

#### CARATTERIZZAZIONE DELLE PROTEINE DEL SEME DI CANAPA MEDIANTE SDS-PAGE (CREA)

Dopo aver messo a punto il protocollo di estrazione delle proteine idrosolubili del seme di canapa, quantitativi diversi di estratto proteico sono stati separati mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide denaturante. Il pattern elettroforetico risultava composto da 18 bande principali che sono state ritagliate dal gel e conservate a -80°C per ulteriori analisi. (Fig. 1,) particolari del pattern elettroforetico ottenuto e relative bande di interesse excise dal gel.



Campione	Bande prelevate										
C - 20 µl	F1	F2	F3	F4	F5						
E - 20 µl	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11

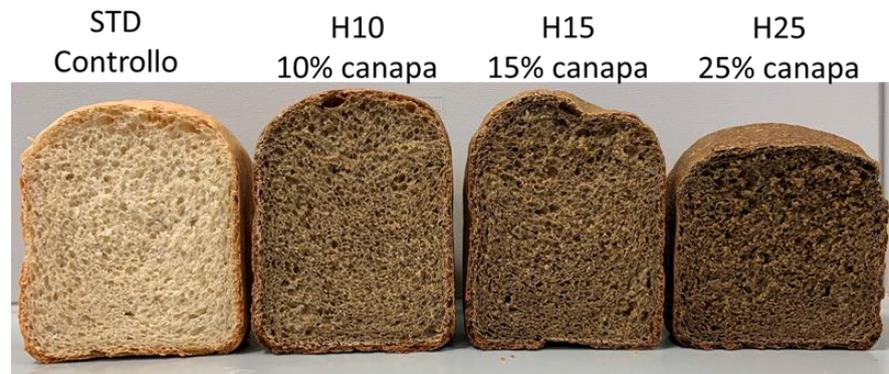
Fig. 1 particolari del pattern elettroforetico ottenuto in 1D SDS PAGE e relative bande di interesse prelevate dal gel per sequenziamento.

#### VALUTAZIONE TECNOLOGICA E SENSORIALE DI NUOVI FORMULATI PER ALIMENTI FUNZIONALI (UNIPR-SITEIA, azione 4)

Per individuare la miglior percentuale di farina di canapa da utilizzare in panificazione, sono state prodotte 4 diverse tipologie di pane: una di controllo (STD, senza aggiunta di farina di canapa), una al 10% di farina di canapa (H10), una al 15% di farina di canapa (H15) e una al 25% di farina di canapa (H25).

I campioni di pane sono stati valutati innanzitutto in termini di consistenza (texture): dai dati ottenuti è emerso che la canapa sembra migliorare la durezza del prodotto, che risulta minore nel pane H10 rispetto al pane standard, per poi aumentare negli altri campioni in modo proporzionale alla percentuale addizionata.

In termini di colore, come ci si aspettava, le differenze di colore aumentano all'aumentare della percentuale di farina di canapa utilizzata nella ricetta. Il pane addizionato di farina di canapa risulta infatti più scuro rispetto al pane di controllo e l'indice di rosso ( $a^*$ ) è direttamente proporzionale alla percentuale di fortificazione, mentre luminosità ( $L^*$ ) e indice di giallo ( $b^*$ ) risultano minori dove la quantità di farina di canapa addizionata è maggiore. Si riporta una fotografia dei campioni di pane ottenuti:



È stato misurato il volume dei campioni di pane. Questo parametro serve a valutare il corretto sviluppo nel pane in termini di inglobamento di aria nell'impasto. In generale, si è notato che l'aggiunta di farina di canapa porta ad un aumento di volume rispetto al controllo quando la percentuale di fortificazione è del 10 o del 15% mentre diminuisce quando si aggiunge canapa al 25%.

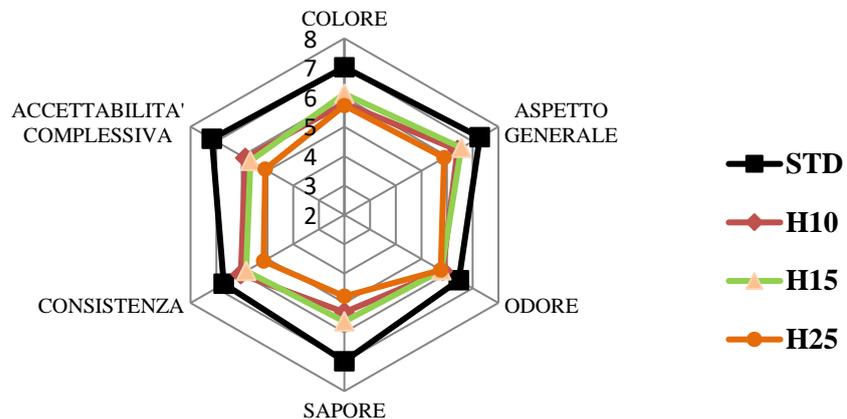
	Volume [L]
STD	1.244 ± 0.042 c
H10	1.454 ± 0.050 a
H15	1.353 ± 0.066 b
H25	1.141 ± 0.030 d

È stata utilizzata l'analisi di immagine al fine di valutare in modo oggettivo l'alveolatura dei pani prodotti. È stato possibile osservare come i campioni di pane a volume maggiore (pane STD e pane H10 e H15) presentassero un numero di alveoli di piccole e grandi dimensioni maggiore rispetto a quello dei campioni di pane a più alta concentrazione di canapa. I risultati sono quindi in linea con quelli ottenuti per il volume, mostrando come la farina di canapa possa influenzare lo sviluppo dell'impasto soprattutto quando le percentuali di fortificazione sono elevate, mentre per percentuali del 10 o 15% i

risultati sono soddisfacenti, come si evince anche dalla fotografia dei campioni.

E' stata poi valutata la quantità di acqua e l'attività dell'acqua. L' $a_w$  della mollica è risultata significativamente maggiore nei pani sperimentali rispetto al controllo (effetto della formulazione); nella crosta, invece, sono stati registrati valori maggiori nei campioni H15 e H25, mentre H10 non è risultato significativamente diverso da STD. I valori di  $a_w$  maggiori riscontrati nei campioni di pane fortificato con farina di canapa portano a supporre che la presenza di alcuni componenti caratteristici della canapa (lipidi, proteine, fibra) possa influenzare la presenza di acqua legata nel prodotto. Il contenuto di acqua totale era simile per tutti i campioni considerati.

Sulla base di questi risultati, i campioni sono stati valutati dal punto di vista sensoriale. I dati ottenuti indicano che la farina di pannello di canapa ha significativamente impattato sui parametri sensoriali considerati. E' stata osservata una riduzione dei punteggi attribuiti alle caratteristiche sensoriali del pane con canapa se confrontati con il controllo. L'accettabilità complessiva ha subito una significativa riduzione all'aumentare del grado di fortificazione del pane.



I punteggi assegnati dai panelisti ai parametri sensoriali non sono stati tuttavia così negativi da determinare la non-accettabilità complessiva dei campioni prodotti. Il campione H25 ha ricevuto le valutazioni più negative; i campioni H10 e H15 hanno spesso ricevuto valutazioni simili.

Da tutti i dati ottenuti, è possibile dedurre che una percentuale di fortificazione con farina di canapa che non superi il 15% è quella che può portare a risultati accettabili, sia in termini tecnologici che sensoriali. Quindi la percentuale del 15% è quella che si è considerata ai fini di progettare prodotti senza glutine.

Oltre ai parametri tecnologici e all'analisi sensoriale, è stata condotta una valutazione chimico - nutrizionale delle formulazioni prodotte.

E' stato determinato il contenuto lipidico. I risultati hanno mostrato come i pani fortificati con farina di canapa presentassero una percentuale di lipidi statisticamente superiore rispetto al pane di controllo. Inoltre, è possibile notare come il contenuto in grasso aumenti all'aumentare della percentuale di fortificazione.

PANE	Lipidi (g/100g)
PANE CONTROLLO	2,044 ± 0,145 <sup>a</sup>
PANE 10% CANAPA	2,761 ± 0,016 <sup>b</sup>
PANE 15% CANAPA	3,022 ± 0,174 <sup>b</sup>
PANE 25% CANAPA	3,846 ± 0,180 <sup>c</sup>

Il profilo lipidico è stato indagato mediante tecnica GC-MS. Le analisi così condotte hanno permesso di risalire alla composizione in acidi grassi dei lipidi presenti nei diversi campioni di pane, mostrando come la fortificazione con farina di canapa abbia contribuito ad apportare al pane acidi grassi essenziali come l'acido linolenico, appartenente alla serie degli  $\omega$ 3 e assente nel pane controllo. Di seguito si riportano i risultati che evidenziano come la quantità di acido linolenico aumenti con l'aumentare della percentuale di farina canapa:

ACIDI GRASSI	PANE CONTROLLO (G/100G DI GRASSO)	PANE 10% CANAPA (G/100G DI GRASSO)	PANE 15% CANAPA (G/100G DI GRASSO)	PANE 25% CANAPA (G/100G DI GRASSO)
ACIDO A-LINOLENICO - C 18:3 ( $\Omega$ -3)	n.d.	0,17 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,37 ± 0,03 <sup>c</sup>

Sui diversi campioni di pane è stata determinata la quantità di proteine. La percentuale di proteine aumenta all'aumentare del contenuto in canapa, come atteso:

PANE	Proteine (g/100g)
PANE CONTROLLO	7,120 ± 0,093 <sup>a</sup>
PANE 10% CANAPA	8,889 ± 0,062 <sup>b</sup>
PANE 15% CANAPA	8,839 ± 0,231 <sup>b</sup>
PANE 25% CANAPA	9,992 ± 0,292 <sup>c</sup>

La frazione proteica è stata caratterizzata ulteriormente andando a determinare il profilo in aminoacidi. Dai dati ottenuti è emerso che alcuni aminoacidi come serina, prolina, idrossiprolina, aspartato, fenilalanina e tirosina siano risultati più abbondanti in modo statisticamente significativo nei pani addizionati del 10%, 15% e 25% di farina di canapa, rispetto al pane di controllo. Inoltre, è stata posta particolare attenzione al contenuto di lisina, riportato in letteratura come l'aminoacido limitante della farina di frumento. Nonostante non siano state osservate delle variazioni quantitative, statisticamente significative, di questo aminoacido tra i diversi campioni di pane analizzati, è stata comunque osservata una tendenza verso l'aumento della concentrazione in lisina nei pani addizionati di farina di canapa. Infine, sui campioni di pane oggetto di studio è stata determinata la quantità in polifenoli totali e la relativa attività antiossidante. I risultati hanno evidenziato come la farina di canapa contribuisca ad aumentare il contenuto in polifenoli, così come l'attività antiossidante:

PANE	mg GAE/g (POLIFENOLI)
PANE CONTROLLO	0,822 ± 0,008 <sup>a</sup>
PANE 10% CANAPA	1,077 ± 0,055 <sup>b</sup>
PANE 15% CANAPA	1,184 ± 0,019 <sup>c</sup>
PANE 25% CANAPA	1,283 ± 0,053 <sup>d</sup>

PANE	mg TEAC/g (DPPH)
PANE CONTROLLO	0,131 ± 0,031 <sup>a</sup>
PANE 10% CANAPA	0,357 ± 0,007 <sup>b</sup>
PANE 15% CANAPA	0,423 ± 0,003 <sup>c</sup>
PANE 25% CANAPA	0,626 ± 0,039 <sup>d</sup>

I dati raccolti suggeriscono come la farina di canapa possa migliorare le caratteristiche nutrizionali del pane. Anche se le migliori caratteristiche chimico-nutrizionali si ottengono utilizzando una percentuale di fortificazione del 25%, questa ha dato problemi in termini di sviluppo dell'impasto e non è stata apprezzata dal punto di vista sensoriale. Quindi si pensa che il miglior compromesso sia quello di adottare una percentuale di fortificazione pari al 15%.

#### CARATTERIZZAZIONE DI NUOVI FORMULATI PER ALIMENTI E MANGIMI FUNZIONALI (UNIPR-SITEIA, azione 5)

Nell'ambito **dell'azione 5** UNIPR-SITEIA si è occupata della caratterizzazione di nuovi formulati (**pani senza glutine addizionati di farine di canapa**) e degli **idrolizzati proteici** ottenuti da biomassa larvale al fine di individuare potenziali composti aventi bioattività.

##### *Produzione di nuovi formulati per alimenti funzionali*

Al fine di produrre **pani senza glutine** addizionati del 15% di farina di canapa, sono stati selezionati 6 diversi mix di farina senza glutine per panificazione tra tutti quelli presenti in commercio. La scelta è stata effettuata sulla base di alcune considerazioni, tra cui la facile reperibilità, la diffusione sul mercato e le caratteristiche della ricetta. E' da considerare infatti che i preparati senza glutine per panificazione possono contenere diversi ingredienti tra cui amido di mais, farina di frumento deglutinato, farina di riso, farina di grano saraceno, farina di semi di lino, ecc. Questo può rendere più complesso ottenere un prodotto finale accettabile.

Dopo diverse prove di panificazione, solo 2 mix (indicati con le sigle "CO" e "DE") hanno presentato le caratteristiche migliori (per gli altri, gli impasti non lievitavano) e quindi sono stati utilizzati per produrre diversi campioni di pane addizionato di farina di canapa al 15%. Questi prodotti sono stati sottoposti a caratterizzazione.

Per quanto riguarda il volume specifico è stato notato come la fortificazione con farina di canapa porti a ottenere un pane meno sviluppato rispetto all'analogo non fortificato (HEMP\_CO e HEMP\_DE vs STD\_CO e STD\_DE).

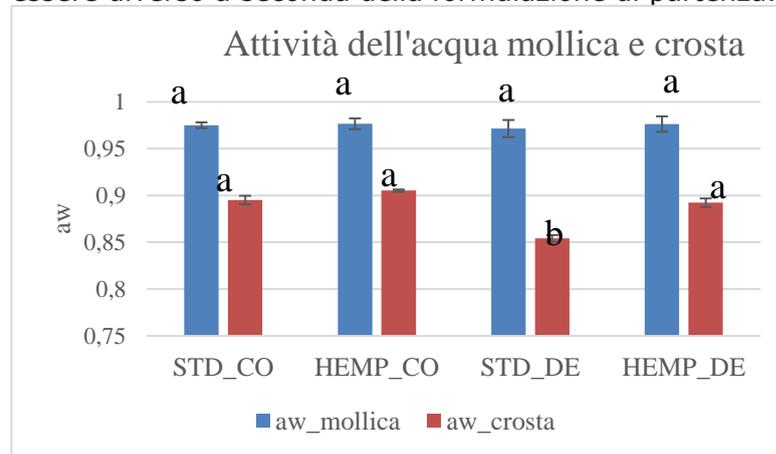
	Volume specifico (L/kg)
STD_CO	2,90 ± 0,21 a
HEMP_CO	2,36 ± 0,09 b
STD_DE	2,91 ± 0,45 a
HEMP_DE	2,09 ± 0,03 b

I risultati del contenuto d'acqua sono riportati nelle seguenti tabelle, dove, in generale, è possibile notare un maggior contenuto in umidità dei campioni addizionati di farina canapa (HEMP\_CO e HEMP\_DE). Questo fenomeno è probabilmente dovuto a interazioni tra l'acqua e i componenti della farina di canapa (proteine e lipidi). Il maggior contenuto di acqua risulta anche una delle cause dell'abbassamento del volume.

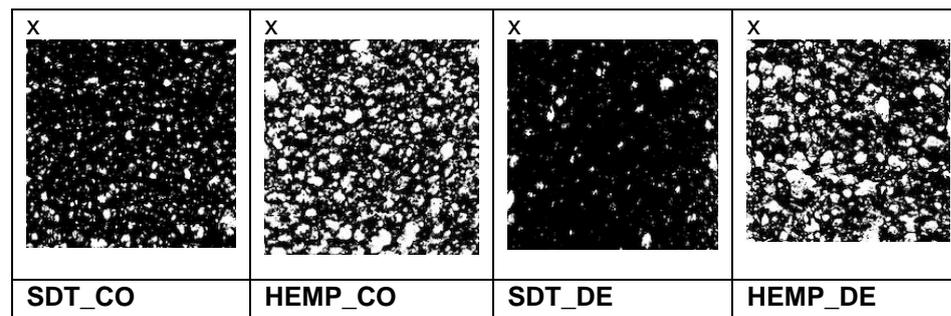
	Umidità % mollica
STD_CO	53.00 ± 0.32 a
HEMP_CO	52.86 ± 0.09 a
STD_DE	46.99 ± 0.22 c
HEMP_DE	47.58 ± 0.34 b

	Umidità % crosta
STD_CO	21.35 ± 0.57 a,b
HEMP_CO	22.92 ± 2.15 a
STD_DE	19.91 ± 0.57 b
HEMP_DE	22.99 ± 0.90 a

Per quanto riguarda invece l'attività dell'acqua ( $a_w$ ), si può notare come non siano state osservate differenze significative tra i diversi campioni in esame, tranne che per una delle formulazioni (DE) per la quale si nota un valore di  $a_w$  nella crosta maggiore nel campione fortificato con farina di canapa rispetto al campione controllo. Come detto in precedenza, diversi mix di farina senza glutine potrebbero portare a ottenere risultati diversi. Il comportamento quindi potrebbe essere diverso a seconda della formulazione di partenza.



L'analisi dell'immagine, per la quale si riporta un esempio di seguito, ha permesso di osservare che il pane di controllo è caratterizzato da alveoli di dimensioni ridotte (0,01 – 0,024 mm<sup>2</sup>) che sono presenti in maggior numero e occupano una superficie più ampia nella sezione considerata. D'altra parte, quando si considerano le categorie relative ai pori più grandi (1-9,99 mm<sup>2</sup> e >10 mm<sup>2</sup>), si osserva un cambiamento di tendenza, poiché il pane contenente farina di canapa presenta un maggior numero di alveoli grandi e occupano una maggiore superficie rispetto al pane di controllo. Questo comportamento si evince anche dall'immagine riportata di seguito.



La valutazione della texture ha portato a determinare parametri quali durezza, coesività ed elasticità. Di seguito sono riportati i risultati

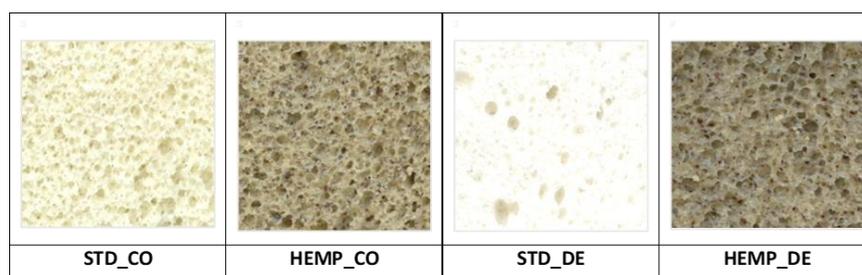
ottenuti:

	Durezza (N)	Coesività (-)	Coesività (-)
STD_CO	1,39 ± 0,13 c	0,72 ± 0,03 b	0,72 ± 0,03 b
HEMP_CO	2,25 ± 0,11 a	0,71 ± 0,00 b	0,71 ± 0,00 b
STD_DE	1,16 ± 0,05 c	0,87 ± 0,00 a	0,87 ± 0,00 a
HEMP_DE	1,86 ± 0,04 b	0,85 ± 0,00 a	0,85 ± 0,00 a

L'aggiunta di farina di canapa al pane permette di ottenere una mollica più dura rispetto al pane senza canapa e le differenze possono variare sulla base della composizione della farina di partenza. Nonostante non contenga glutine, la farina di canapa può modificare la consistenza del pane grazie alla sua ricchezza in proteine che aiutano a trattenere l'aria nell'impasto e a rendere la struttura più compatta e pesante. La farina di canapa non sembra influenzare parametri come coesività ed elasticità, che invece dipendono dal mix di farine di partenza.

Per quanto riguarda il colore, sono stati determinati alcuni parametri come la luminosità (L) e i parametri che determinano alcuni colori come il rosso-blu (a) e il giallo-verde (b) e il valore di  $\Delta E$ , parametro utile per capire se una differenza in colorazione sia apprezzabile dall'occhio umano. Dall'osservazione dei dati registrati è emerso che il colore del pane senza glutine può dipendere dai tipi di farine utilizzati nella sua formulazione e la farina di canapa tende a renderlo più scuro portando ad una diminuzione del parametro L e un aumento dei valori di a e b. Grazie alla determinazione del  $\Delta E$  è possibile affermare che la variazione nella colorazione è apprezzabile dal consumatore, dato che le differenze nei valori riscontrati in pane controllo e pane addizionato di canapa sono tutti superiori a un valore soglia fissato a 12:

	$\Delta E$
CO_MOL	23,76
CO_CRO	13,39
DE_MOL	23,92
DE_CRO	20,13



Dal punto di vista dell'apporto in molecole bioattive, come i polifenoli, è stato possibile osservare come l'aggiunta di canapa porti a ottenere valori significativamente maggiori di polifenoli totali e componenti antiossidanti nei campioni dove la farina di canapa è stata addizionata.

	Polifenoli (ppm GAE)	Antiossidanti (mM TEAC)
STD_CO	12,58 ± 1,91 b	n.r.
HEMP_CO	37,95 ± 1,91 a	0,1102 ± 0,0171 a
STD_DE	8,76 ± 0,82 b	0,0007 ± 0,0006 b
HEMP_DE	33,36 ± 4,50 a	0,1077 ± 0,0099 a

Inoltre, la farina di canapa porta ad ottenere pani arricchiti sia in

proteine che in grassi:

	Proteine (%)	Grassi (%)
STD_CO	1,86±0,05 b	2,78±0,07 c
HEMP_CO	3,74±0,73 a	3,82±0,21 b
STD_DE	0,79±0,25 c	5,40±0,36 a
HEMP_DE	3,11±0,05 a	6,41±0,22 a

Analizzando nello specifico la frazione proteica così come quella lipidica è stato possibile evidenziare come la fortificazione con farina di canapa apporti un significativo aumento del contenuto in aminoacidi essenziali come fenilalanina, isoleucina, leucina e valina, così come di acidi grassi appartenenti alla serie degli  $\omega 3$  come l'acido linolenico, che non è stato riscontrato invece nei campioni di pane senza glutine non addizionati in farina di canapa.

E' stata effettuata una valutazione sensoriale utilizzando un panel di 20 assaggiatori non addestrati, sottoponendo loro il pane senza glutine standard e quello addizionato in farina di canapa al 15%. In questo caso gli assaggiatori, seppur fossero un numero molto limitato, sembrano aver apprezzato maggiormente il pane addizionato in farina di canapa rispetto a quello bianco. Bisogna però sottolineare che il panel test è stato effettuato con un numero limitato di assaggiatori e che questi soggetti erano persone non intolleranti al glutine, quindi, abituate a usare nelle loro diete pane contenente glutine.

In conclusione, è possibile affermare che l'utilizzo della farina di canapa può portare ad un miglioramento delle caratteristiche nutrizionali del pane senza glutine, così come ad una variazione di alcuni parametri tecnologici, anche se la sua applicazione può variare a seconda del mix di partenza che si va ad utilizzare. Nel voler quindi progettare nuovi formulati bisogna tenere in considerazione questi aspetti e utilizzare quindi mix a base di amido di mais o di riso.

#### **Produzione di ingredienti dalla biomassa larvale**

La frazione proteica ottenuta dalla massa larvale, privata dei grassi e della chitina, è stata idrolizzata e le frazioni ottenute sono state caratterizzate.

I dati ottenuti sono riportati nella tabella sottostante:

composizione	Idrolisi di 3h	Idrolisi di 15h
sostanza secca	89,88 ± 0,21	92,03 ± 2,19
proteine	63,96 ± 0,00	64,23 ± 2,27
lipidi	1,15 ± 0,27	0,41 ± 0,00
ceneri	22,31 ± 0,00	20,33 ± 0,62

Dai dati si nota come i due processi non portino a differenze significative; quindi, è possibile applicare un processo di idrolisi di 3 ore. Si nota inoltre come i residui di grasso siano molto bassi. La frazione proteica è stata quindi caratterizzata mediante tecnica UHPLC-MS, al fine di individuare la presenza di peptidi bioattivi. I risultati ottenuti hanno evidenziato la presenza negli estratti proteici idrolizzati 3 e 15 ore rispettivamente di 25 e 19 peptidi associabili con attività ACE inibitoria, ovvero brevi sequenze di amminoacidi inattive all'interno della proteina originale, ma che una volta rilasciate dalla digestione gastrointestinale o dalla lavorazione degli alimenti,

esercitano le loro numerose funzioni fisiologiche. Inoltre, sono stati identificati 14 peptidi nei campioni idrolizzati 3 ore e ad 11 nell'idrolizzato per 15 ore, che hanno una potenziale bioattività che permette di inibire la dipeptidil peptidasi IV (DPP-IV), coinvolta nella regolazione della secrezione di insulina e della glicemia. Questo conferisce agli idrolizzati proteici di *Hermetia illucens* un potenziale ruolo nella gestione della glicemia. E' da sottolineare che i peptidi identificati non sono da considerarsi bioattivi in quanto tali, ma essi contengono delle sequenze formate da di- e tri-peptidi che sono riconosciute come bioattive. Queste sequenze possono quindi essere rilasciate in fase di digestione gastro-intestinale nel momento in cui l'idrolizzato proteico viene utilizzato come alimento.

Si riporta qualche esempio di risultato:

	PROTEINA	TIPO DI BIOATTIVITA'	PROFILO DELLA POTENZIALE BIOATTIVITA'
GPPGPPGPPGPPGPPGKFL	Proteina ipotetica	ACE inibitore	FP, GP, PL, GK, PG, KF, GPP, PP
GPGGPGGPKGGGGGPF	Proteina ipotetica	inibitore della dipeptidil peptidasi IV	GP, GG, KG, PF, PG, PK
GPPGPPGPPGLPKFPGST	Proteina ipotetica	ACE inibitore	FP, PGL, GLP, LPG, GP, GL, GS, GK, PG, KF, GPP, PP, ST
GPGGPGGGKGGPGGPL	Proteina ipotetica	ACE inibitore	GPL, GP, PL, KG, GK, GG, PG, KGP
GPKGPAGPPGPPGPPGPL	Proteina non caratterizzata	ACE inibitore	GPA, GPL, GP, PL, AG, KG, PG, GPP, PP, AGP, KGP
FPGYYPGLR	Proteina ipotetica	ACE inibitore	FP, GY, YP, PGL, GL, PG, YPG, LR, YY
GRVPIPIFGWPM	Proteina ipotetica	inibitore della dipeptidil peptidasi IV	IPI, VP, IP, WP, FP, GW, PG, PI, PM

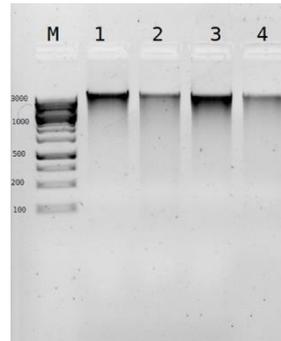
La conclusione che è possibile trarre da questa valutazione è che la biomassa larvale, ed in particolare la frazione proteica idrolizzata, può rappresentare una discreta fonte di composti bioattivi.

#### CARATTERIZZAZIONE DEL PROCESSO MACERATIVO MEDIANTE ANALISI METAGENOMICA DEL LIQUOR. (CREA)

L'estrazione del DNA batterico da 84 campioni di liquor mediante Nucleospin Soil Kit (Macherey-Nagel) ha consentito di ottenere DNA genomico in buona quantità (compresa tra 60 ng e 8,5 µg totali, Tab. 1) e di buona qualità per tutti i campioni, come testimoniato dalle immagini dei gel di agarosio ottenuti dal caricamento di 2 ul del DNA estratto (Fig. 1)

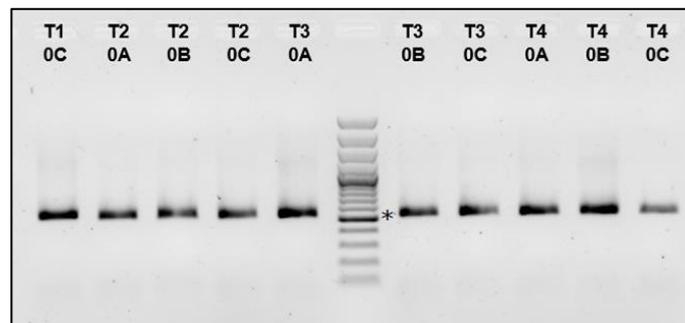
ESPERIMENTO	Sample ID	Nucleic Acid (ng/µl)	quantità (µl)	Quantità totale (ng)
<b>T1</b>				
	T00A (11/05/21)	8	30	240
	T00B (11/05/21)	9	30	270
	T00C (11/05/21)	8	30	240
	T10A (11/05/21)	2	30	60
	T10B (11/05/21)	0	30	0
	T10C (11/05/21)	19	30	570
	T1FA (14/05/21)	77	30	2310
	T1FB (14/05/21)	58	30	1740
	T1FC (14/05/21)	21	30	630
	T1M A (13/05/21)	121	30	3630
	T1M B (13/05/21)	104	30	3120
12	T1M C (13/05/21)	108	30	3240
<b>T2</b>				
	T20A (17/05/21)	14	30	420
	T20B (17/05/21)	11	30	330
	T20C (17/05/21)	11	30	330
	T2FA	67	30	2010
	T2FB	95	30	2850
	T2FC	86	30	2580
	T2M A	101	30	3030
	T2M B	138	30	4140
9	T2M C	110	30	3300
<b>T3</b>				
	T30A (31/05/21)	58	30	1740
	T30B (31/05/21)	22	30	660
	T30C (31/05/21)	31	30	930
	T3FA (3/06/21)	130	30	3900
	T3FB (3/06/21)	163	30	4890
	T3FC (3/06/21)	178	30	5340
	T3MA (1/06/21)	116	30	3480
	T3MB (1/06/21)	190	30	5700
9	T3MC (1/06/21)	159	30	4770
<b>T4</b>				
	T40A (7/06/21)	25	30	750
	T40B (7/06/21)	42	30	1260
	T40C (7/06/21)	23	30	690
	T4FA (10/06/21)	148	30	4440
	T4FC (10/06/21)	42	30	1260
	T4MA (8/06/21)	223	30	6690
	T4MB (8/06/21)	163	30	4890
8	T4MC (8/06/21)	187	30	5610
<b>T5</b>				
	T50A (14/06/21)	29	30	870
	T50B (14/06/21)	51	30	1530
	T50C (14/06/21)	25	30	750
	T5FA (17/06/21)	161	30	4830
	T5FB (17/06/21)	157	30	4710
	T5FC (17/06/21)	145	30	4350
	T5M A (15/06/21)	142	30	4260
	T5M B (15/06/21)	121	30	3630
8	T5M C (15/06/21)	128	30	3840
<b>T6</b>				
	T60A (21/06/21)	177	30	5310
	T60B (21/06/21)	206	30	6180
	T60C (21/06/21)	229	30	6870
	T6FA (24/06/21)	222	30	6660
	T6FB (24/06/21)	145	30	4350
	T6FC (24/06/21)	222	30	6660
	T6M A (22/06/21)	239	30	7170
	T6M B (22/06/21)	280	30	8400
9	T6M C (22/06/21)	254	30	7620
<b>T7</b>				
	T70A (28/06/2021)	43,2	30	1296
	T70B (28/06/2021)	48,5	30	1455
	T70C (28/06/2021)	43,9	30	1317
	T7F (1/07/21)	223	30	6690
	T7FA (1/07/21)	142	30	4260
	T7FB (1/07/21)	129	30	3870
	T7M A (29/06/21)	164,2	30	4926
	T7M B (29/06/21)	179,1	30	5373
9	T7M C (29/06/21)	49,2	30	1476
<b>T8</b>				
	T80A (5/07/21)	96	30	2880
	T80B (5/07/21)	104	30	3120
	T80C (5/07/21)	75	30	2250
	T8FA (8/07/21)	132	30	3960
	T8FB (8/07/21)	120	30	3600
	T8FC (8/07/21)	149	30	4470
	T8M A (6/07/21)	180	30	5400
	T8M B (6/07/21)	195	30	5850
9	T8M C (6/07/21)	188	30	5640
<b>T9</b>				
	T9F (B tre repliche)(15/07/21)	78,7	30	2361
2	T9M (A tre repliche)(13/07/21)	97,5	30	2925

*Tab. 1 risultati quantificazione spettrofotometrica dei campioni di DNA batterico estratto dal liquido di macerazione, per ciascun esperimento (T1-T9)*



*Fig. 1 Elettroforesi su gel di agarosio di N. 4 campioni di DNA batterico estratto dal liquor di macerazione. L'altezza delle bande (> 3000 bp) e l'assenza di smear denota l'integrità del DNA batterico estratto*

Tutti i campioni sono stati diluiti ed adoperati per la preparazione delle librerie di sequenziamento secondo il protocollo Illumina MiSeq. Le librerie di sequenziamento sono state quantificate con metodo fluorimetrico e mediante elettroforesi su gel di agarosio ne è stata verificata la qualità (presenza di 1 unica banda di DNA di circa 600 bp per ogni campione, Fig. 2)



*Fig. 2 Elettroforesi su gel di agarosio di N. 10 librerie ottenute da un subset casuale di campioni di Liquor prelevati al T0 negli esperimenti da 1 a 4. L'asterisco indica l'altezza della banda di 600 bp*

Il sequenziamento mediante sequenziatore Illumina MiSeq delle 84 librerie corrispondenti alla regione ipervariabile V3-V4 (circa 600 bp + adattatori Illumina) del gene per la subunità 16S del RNA ribosomiale, ha restituito un totale di 4.350.419 reads, che dopo la "pulizia" dagli adattatori ed il check di qualità delle sequenze effettuato mediante il software TRIMMOMATIC 0.39 si sono ridotte a 1.487.582. La scarsa qualità del sequenziamento dei TM e TF dell'esperimento 9 ha imposto di eliminare questo esperimento dal dataset. Le successive fasi di assemblaggio in contigs e di "denoising" effettuate con QIIME2 hanno consentito di raggruppare le sequenze in "Amplicon Sequence Variant" (ASV) che sono stati poi raggruppati sulla base della similarità mediante il tool VSEARCH consentendo di individuare in totale 1866 "Operational Taxonomic Unit" (OTUs). L'annotazione delle OTUs è stata effettuata contro il database SILVA 138 eliminando tutte quelle OTUs che erano composte solo da 10 reads, poiché ritenute di scarso rilievo ai fini della caratterizzazione del microbioma macerante. Nelle figure 3 e 4 sono rappresentate mediante barplots le OTUs di ciascun esperimento con la relativa

annotazione al livello tassonomico di Phylum

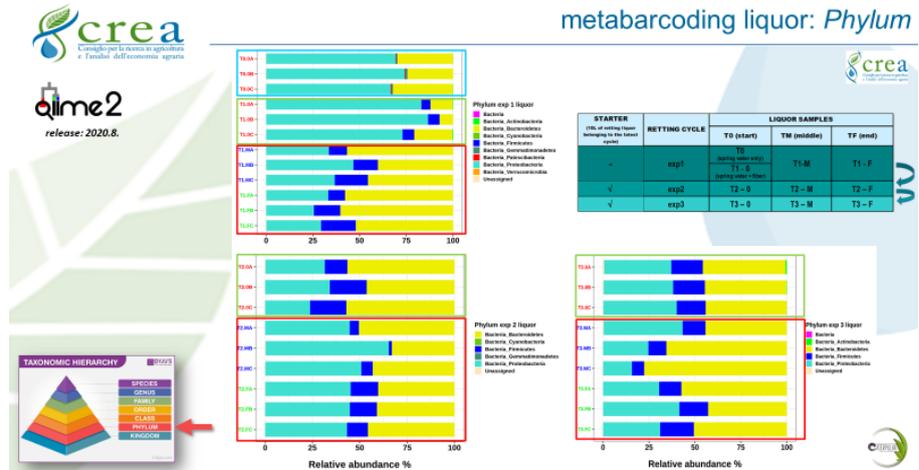


Fig.3 Barplots delle OTUs identificate ed annotate fino al livello di Phylum per i primi tre esperimenti di macerazione

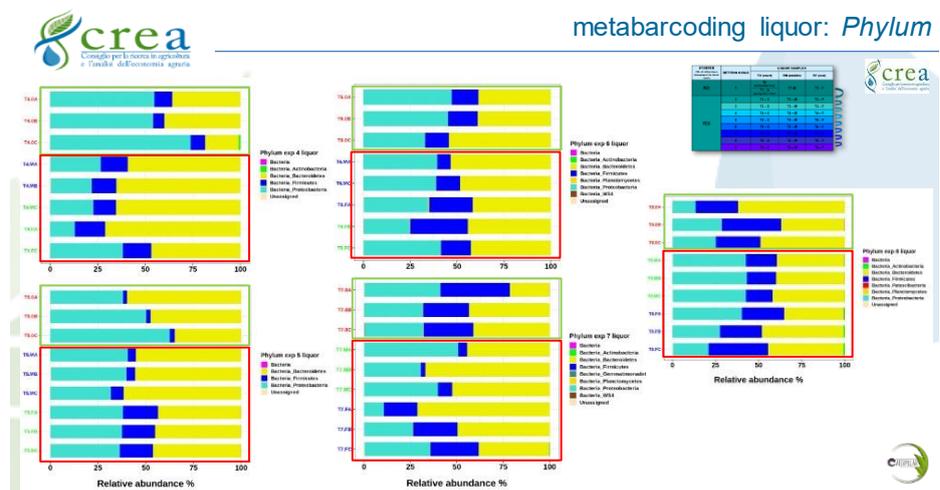


Fig.4 Barplots delle OTUs identificate ed annotate fino al livello di Phylum per gli esperimenti di macerazione dal 4 al 8

Dall'analisi di questi risultati al livello di categoria tassonomica Phylum si evince che:

1. Il contributo dell'acqua di sorgente alla composizione del consorzio microbico macerante è pressoché irrilevante, dato che la comunità microbica che si sviluppa dinamicamente nel processo riassume sostanzialmente quella presente sulla fibra
2. La riduzione dei tempi di macerazione (24-48 ore) ottenuta con l'uso di un inoculo costituito dal liquido di macerazione di scarto della macerazione precedente (5% del volume totale) è imputabile al contributo sostanziale dell'inoculo allo stabilirsi del consorzio microbico macerante
3. L'intero processo è sostenuto sostanzialmente da batteri appartenenti a tre phyla: *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes*

Estendendo l'analisi alla categoria tassonomica di Genus (genere) abbiamo ottenuto i risultati rappresentati nei barplots riportati a titolo esemplificativo nelle figure 5 e 6

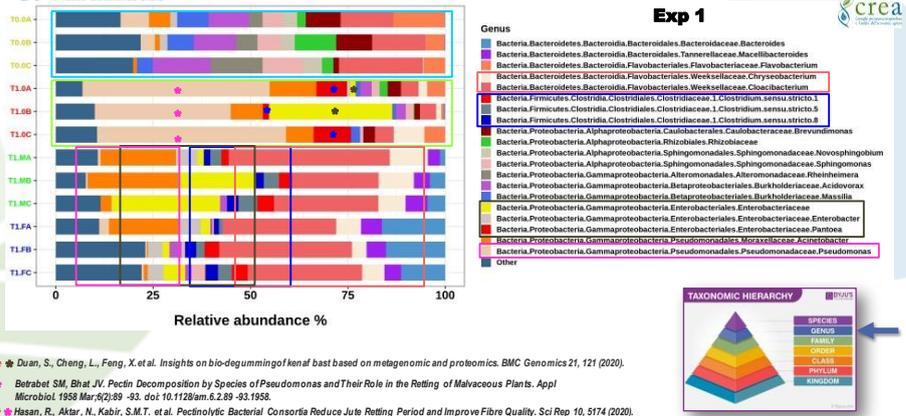


Fig.5 Barplots delle OTUs identificate ed annotate al livello di Genere per l'esperimento di macerazione n. 1

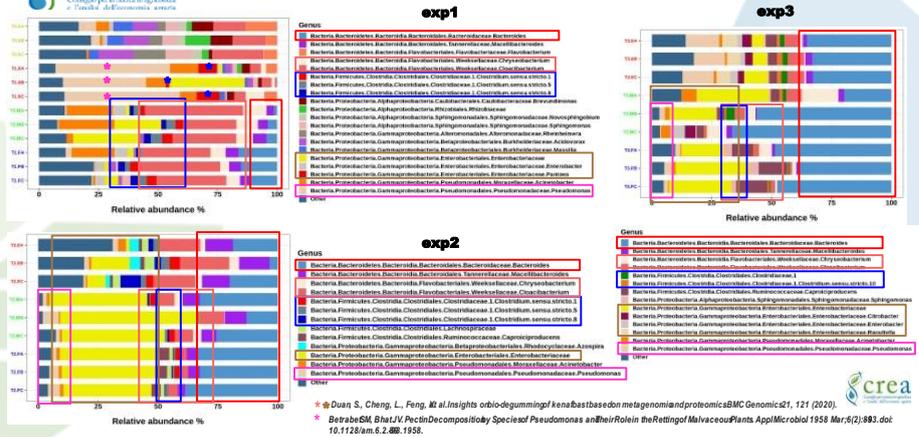


Fig.6 Barplots delle OTUs identificate ed annotate al livello di Genere per gli esperimenti di macerazione n. 1-3

Dal confronto dei barplots di genere ottenuti per gli 8 esperimenti consecutivi si conferma il contributo sostanziale della fibra alla composizione del microbioma macerante e la capacità del sistema di controllo del processo di selezionare in termini di abbondanza relativa e numero di specie, alcuni generi di batteri che dalla letteratura risultano coinvolti in varie tipologie di processi macerativi:

- 1) Clostridium: sono introdotti nel sistema al T0 dalla fibra e aumentano in abbondanza relativa e numero di specie nella fase intermedia del processo per stabilizzarsi in quella finale.
- 2) Bacteroides: apparentemente introdotti dalla fibra tendono ad aumentare sensibilmente dal T0 al TF del primo esperimento, ma aumentano sostanzialmente anche nel tempo confrontando cicli consecutivi di macerazione in cui il 5% del liquido macerativo è costituito dallo scarto del liquido della macerazione precedente.
- 3) Enterobacteriaceae: introdotte dalla fibra tendono ad aumentare nel secondo ciclo macerativo con inoculo e a ridursi in abbondanza, crescendo in diversità di specie nel terzo ciclo macerativo e nei seguenti.
- 4) Pseudomonas: presenti massicciamente sulla fibra ed anche

nell'acqua di sorgente vengono selezionati negativamente durante il processo. A questo genere appartengono specie ad attività pectinolitica.

Dal confronto degli indici di diversità di Shannon per gli otto cicli consecutivi si evidenzia la ciclicità con cui l'indice di diversità varia nei processi consecutivi, con e senza l'impiego di inoculo. In assenza di inoculo la diversità è alta al T0, si abbassa drasticamente al tempo intermedio e tende ad alzarsi al tempo finale. In presenza di inoculo la diversità microbica al T0 riassume quella del TF del ciclo precedente, si abbassa al TM per poi tornare ai valori iniziali al TF (Fig. 7).

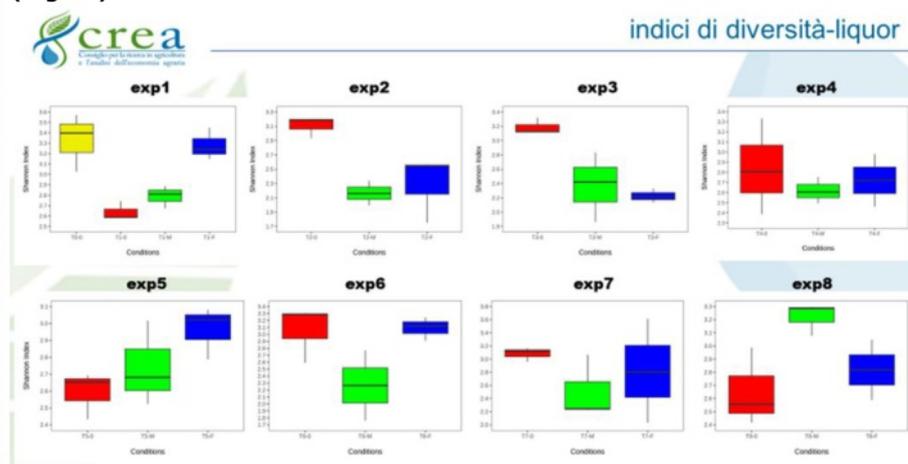


Fig.7 Boxplot degli indici di diversità di Shannon misurati nelle tre fasi del processo investigate (T0, TM, TF) per 8 cicli di macerazione consecutivi.

Da quanto misurato si evince che la fase intermedia del processo è la più selettiva in termini di numero di specie, riducendo la complessità del consorzio. Verosimilmente questa forte selezione è responsabile della drastica riduzione dei tempi del processo macerativo che si riescono a realizzare nel bioreattore, rispetto alla macerazione naturale in macero all'aperto.

Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità

Tutti gli obiettivi previsti dal Piano sono stati raggiunti.

## COSTI – AZIONE 6 PERSONALE

Cognome e nome	Mansione/ qualifica	Attività svolta nell'azione	Costo orario	Ore	Costo totale
	imp. Agrario 1° categoria - Quadro	raccolta e analisi dei dati	€ 43,00	7,50	€ 322,50
	impiegato TI part time 80%	coordinamento scientifico / raccolta e analisi dei dati	€ 33,00	13,00	€ 429,00
	Prof.ssa Associata	raccolta e analisi dei dati	€ 48,00	39,50	€ 1.896,00
Totale:					€ 2.325,00

<b>Azione</b>	<b>AZIONE 7: REDAZIONE REPORT E LINEE GUIDA</b>
Unità aziendale responsabile	CREA Collaborano: CREA, UNIPR, NATURFIBRE, OPEN FIELDS
Descrizione delle attività	<p>Tutti i Partner coinvolti nelle Attività progettuali hanno periodicamente relazionato al coordinatore scientifico sulle attività svolte, le difficoltà eventualmente incontrate e le attività ancora da svolgere, favorendo il coordinamento e l'efficiente impiego delle risorse disponibili. Il CREA ha raccolto e redatto report riassuntivi sul complesso della attività progettuali svolte, sia in forma di testo che di presentazione powerpoint.</p> <p>Nell'ambito dell'azione 7, l'Unità UNIPR- SITEIA si è occupata di raccogliere dati provenienti dalla caratterizzazione molecolare delle matrici di interesse quali: biomassa larvale, farina di canapa, olio di canapa, pane con e senza glutine fortificato con farina di canapa. Sono state preparate delle relazioni che descrivono le metodiche analitiche adottate per caratterizzare le matrici oggetto di esame, comprensive di trattamento del campione e analisi strumentali, e che comprendono l'interpretazione dei risultati ottenuti. Gli idrolizzati proteici ottenuti dalla biomassa larvale sono risultati ricchi in peptidi bioattivi potenzialmente interessanti per una dieta animale. Le farine ottenute sono risultate idonee alla panificazione: utilizzando una percentuale del 10-15% si può arricchire il pane convenzionale di componenti importanti nella dieta (grassi e proteine nobili, antiossidanti), mentre per quanto riguarda il pane senza glutine non è possibile creare una ricetta standard ma la percentuale di fortificazione con farina di canapa deve essere modulata sulla base della composizione del mix senza glutine di partenza.</p> <p>Sulla base della sperimentazione effettuata e dei risultati ottenuti dal progetto è stato possibile redigere le seguenti linee guida:</p> <p><b>Linee guida per la produzione di seme e fibra dalla canapa industriale</b></p> <p><b>Linee guida per la spremitura del seme e la produzione di formulati per panificazione fortificati con farina di canapa</b></p>

## COSTI- AZIONE 7 PERSONALE

Cognome e nome	Mansione/ qualifica	Attività svolta nell'azione	Costo orario	Ore	Costo totale
	imp. Agrario 1° categoria - Quadro	redazione report	€ 43,00	55,00	€ 2.365,00
	imp. Agrario 1° categoria - Quadro	redazione report e linee guida	€ 43,00	24,00	€ 1.032,00
	impiegato TI part time 80%	coordinamento scientifico / redazione report e linee guida	€ 33,00	77,25	€ 2.549,25
	Prof. Ordinario	redazione report	€ 73,00	10,00	€ 730,00
	Ricercatrice t.d. anno 2021 / Prof.ssa Associata da anno 2022	redazione report e linee guida	€ 31 anno 2021 / € 43 da anno 2022	55,50	€ 2.154,00
Totale:					€ <b>6.465,25</b>

Azione	DIVULGAZIONE
Unità aziendale responsabile	Open Fields Srl.
Descrizione delle attività	<p>Nell'ambito dell'azione divulgazione sono stati realizzati:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- il logo di progetto (Open Fields);</li> </ul>  <ul style="list-style-type: none"> <li>- pagine web sui siti internet dei partner del GO: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <a href="https://www.openfields.it/progetto/caterpillar/">https://www.openfields.it/progetto/caterpillar/</a></li> <li>• <a href="https://www.crea.gov.it/web/genomica-e-bioinformatica/-/caterpillar-canapa-tessile-per-la-produzione-di-alimenti-funzionali-e-di-biomasse-proteiche-per-l-alimentazione-animale">https://www.crea.gov.it/web/genomica-e-bioinformatica/-/caterpillar-canapa-tessile-per-la-produzione-di-alimenti-funzionali-e-di-biomasse-proteiche-per-l-alimentazione-animale</a></li> <li>• <a href="https://www.centritecnopolo.unipr.it/siteiaparma/2021/07/21/caterpillar-canapa-tessile-per-la-produzione-di-alimenti-funzionali-e-di-biomasse-proteiche-per-l'alimentazione-animale/">https://www.centritecnopolo.unipr.it/siteiaparma/2021/07/21/caterpillar-canapa-tessile-per-la-produzione-di-alimenti-funzionali-e-di-biomasse-proteiche-per-l'alimentazione-animale/</a></li> <li>• <a href="https://www.stuard.it/caterpillar/">https://www.stuard.it/caterpillar/</a></li> <li>• <a href="https://cadalfieri.it/progetto-caterpillar-nella-filiera-canapicola-italiana/">https://cadalfieri.it/progetto-caterpillar-nella-filiera-canapicola-italiana/</a></li> <li>• <a href="https://naturfibre.it/">https://naturfibre.it/</a></li> </ul> </li> <li>- il sito web <a href="http://www.gocaterpillar.it">www.gocaterpillar.it</a> in lingua italiana ed inglese. Il sito è stato aggiornato in tempo reale condividendo informative e documenti (a cura di Open Fields);</li> <li>- cartelli recanti il logo del progetto ed i riferimenti al PSR Emilia-Romagna, da utilizzare durante gli eventi (Stuard);</li> <li>- un video delle attività progettuali (a cura di Open Fields); <a href="https://www.youtube.com/watch?v=ZVKW2ERdT6Q">https://www.youtube.com/watch?v=ZVKW2ERdT6Q</a></li> <li>- due video brevi presentati ad Expo Dubai (a cura di Open Fields); <a href="https://player.vimeo.com/video/630010692?h=686a783598">https://player.vimeo.com/video/630010692?h=686a783598</a> <a href="https://share-expo2020dubai.com/#video">https://share-expo2020dubai.com/#video</a></li> <li>- un evento divulgativo in campo preceduto dalla presentazione del progetto, il 15/07/2021, organizzato da Stuard ed Open Fields a cui hanno i partner e 20 agricoltori interessati;</li> </ul>   <ul style="list-style-type: none"> <li>- una presentazione orale dal titolo "Whole crop valorization and process innovation for a circular and sustainable hemp-based bioeconomy" durante la 18° Conferenza dell'EIHA "Hemp for Europe:</li> </ul>

Emerging opportunity for the Green recovery", il 16/06/2021;

- una presentazione orale a EIMA 2021. Esposizione Internazionale di Macchine per l'Agricoltura e il Giardinaggio. Fiera della meccanizzazione agricola a Bologna, il 21/10/2021. In quell'occasione Dott. Agr. Marco Errani è intervenuto con una presentazione sulle attività del progetto Caterpillar all'interno del workshop MECCANIZZAZIONE DELLA RACCOLTA E DELLA PRIMA TRASFORMAZIONE DELLA CANAPA;

- presentazione del progetto durante l'open day del 17 maggio 2022 al CREA-GB di Fiorenzuola d'Arda (PC) nell'ambito della giornata mondiale "Fascination of Plant Day 2022";



- una presentazione orale della Prof.ssa Eleonora Carini di UNIPR al 12° convegno AISTEC dal titolo "CEREALI E SCIENZA: resilienza, sostenibilità e innovazione", svoltosi presso la Facoltà di Agraria dell'Università di Napoli "Federico II" il 16/06/2022 (Portici). La prof.ssa Carini ha presentato i risultati ottenuti nello studio "Pane da farine composite di frumento e pannello di canapa: un'opportunità qualitativa?" mostrando gli effetti dell'inclusione di pannello di canapa nella formulazione di pane;

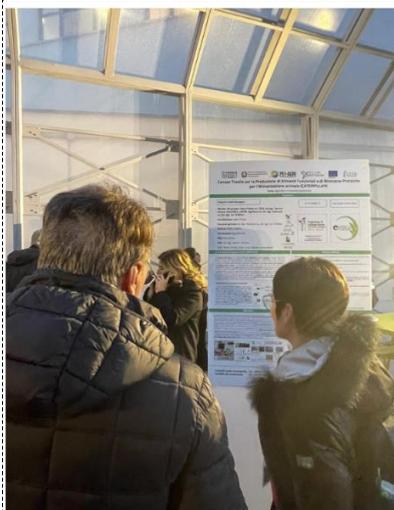
- Interventi a cura Dott.ssa Vita Maria Cristiana Moliterni e del Dott. Agr. Marco Errani, rispettivamente al Business Exchange Programme ed alla Conferenza Internazionale del Canapa Forum 2022 tenutasi il 7-10/09/2022 a Napoli;

- una presentazione dal titolo "Water retting process innovation for a circular and sustainable hemp-based bioeconomy" della Dott.ssa Moliterni al Congresso "Natural Fiber Extraction" di Stoccarda, il 26/10/2022;

- una presentazione della Dott.ssa Moliterni, 19/12/2022 presso il CREA - GB di Fiorenzuola d'Arda (PC) durante un incontro tra imprenditori e ricercatori del percorso delineato dal Protocollo d'Intesa tra CREA, CIA, AGIA e Agricoltura e Vita, sulla ricerca genomica e le sue applicazioni nel settore agroalimentare.

Nel corso dell'incontro la Dott.ssa Moliterni ha parlato dell'innovazione nella filiera della canapa industriale ed ha presentato il progetto CATERPILLAR;

- partecipazione all'incontro tenutosi a Roma l'1-2/03/2023 dal titolo "Innovazione e sostenibilità ambientale: obiettivi e strumenti della PAC 2023-2027". Il primo giorno di lavori ha permesso di avviare la riflessione sull'importanza che l'innovazione riveste per i temi ambientali e climatici e di illustrare i progressi nell'attuazione dei Gruppi Operativi (GO), i loro risultati e le azioni di supporto offerte dalla Rete Rurale Nazionale. È stato inoltre possibile visitare l'esposizione dei materiali dei GO che hanno partecipato al concorso RURINNOVA, tra questi il poster del GO Caterpillar. Il secondo giorno di lavori è stato dedicato al dibattito e alla condivisione di esperienze. All'incontro hanno partecipato le Dott.sse Moliterni, Folloni e Marchini;



- incontro con il progetto europeo HempClub (<https://hempclubproject.com/> ) finanziato sul programma COSME il 12/04/2023;

- l'organizzazione del convegno finale il 5/05/2023 presso il Centro Congressi del Parco Area Delle Scienze (Campus) Università di Parma, Al convegno sono intervenuti la Dott.ssa Patrizia Alberti, Responsabile Area Innovazione, Formazione e Consulenza – Direzione Generale Agricoltura, Caccia e Pesca della Regione Emilia-Romagna e Beppe Croce, Presidente di Federcanapa. I partecipanti sono stati circa 40;



- due articoli divulgativi pubblicati su note riviste che trattano temi di green economy e scienze gastronomiche:

“La canapa, una coltura verde per un futuro green” di Mia Marchini e Marco Furmenti (Stuard)

<http://www.assaggiamparma.it/images/assaggiamenti/sfogliabili/34/mobile/index.html#p=16>

“La valorizzazione dello scarto per un uso integrale della canapa” di Vita Maria Cristiana Moliterni (CREA-GB) e Maria Vittoria Zaglio

<https://www.lampon.it/articolo/14/09/2021/canapa-scarti-progetto-caterpillar/>

-un roll-up di progetto (a cura di Open Fields)

## Canapa Tessile per la Produzione di Alimenti Funzionali e di Biomasse Proteiche per l'Alimentazione animale (CATERPILLAR)



### Opportunità

La canapa industriale è una pianta utile per l'agricoltore e per l'ambiente, in grado di fornire materie prime all'industria alimentare, farmaceutica, cosmetica, automobilistica, tessile, edilizia e cartaria, in linea con i principi del Green Deal Europeo che raccomandano l'efficace gestione delle risorse e la riduzione delle emissioni di gas serra. La canapa è una coltura elettiva per sostenere una bioeconomia circolare, lo sfruttamento di tutte le parti della pianta garantisce sostenibilità e sostenibilità culturale, ma ad oggi non esiste una moderna filiera della canapa in grado di rispondere a questa necessità. Il progetto CATERPILLAR propone lo sfruttamento di tutte le potenzialità colturali, con particolare interesse agli usi alimentari dei prodotti e degli scarti delle lavorazioni, generando nuovi sottoprodotti ad elevato valore aggiunto. Attraverso il metodo piatto di innovazione il progetto contribuisce allo sviluppo di una filiera pilota per la produzione di semi e fibre naturali tessili e tecnici.

### Attività



1. Prove agronomiche in pieno campo presso le aziende agricole partner e prove parcellari presso l'azienda Stuard utilizzando colture di canapa monocoltura.
2. Esecuzione, stoccaggio e sbramatura a freddo delle sementi con impianto prototipo e fine di ottenere olio di canapa e farina.
3. Sviluppo, manutenzione in bioreattore prototipo e collaudi di fibre con l'uso dell'ottimo Mirocote diretto.
4. Realizzazione degli studi di idoneità e caratterizzazione del prodotto finale ottenuto dalla coltura di canapa, caratterizzazione delle porzioni analizzate (fibre e semi), caratterizzazione del prodotto finale ottenuto dalla lavorazione (struttura e caratteristiche nutrizionali) e analisi chimica e microbiologica del prodotto.
5. Sviluppo di nuovi formati per la vendita finale della farina di canapa ed additivi per l'alimentazione animale (analisi chimica e microbiologica).
6. Valutazione della sostenibilità socio-economica del progetto: commercializzazione dei prodotti a mercato (derivati dalla lavorazione del seme e della valorizzazione ad uso mangimico della biomassa animale prodotta) nella fase di produzione della fibra.
7. FORMAZIONE: Due edizioni del corso di aggiornamento e sviluppo di nuove attività e servizi.

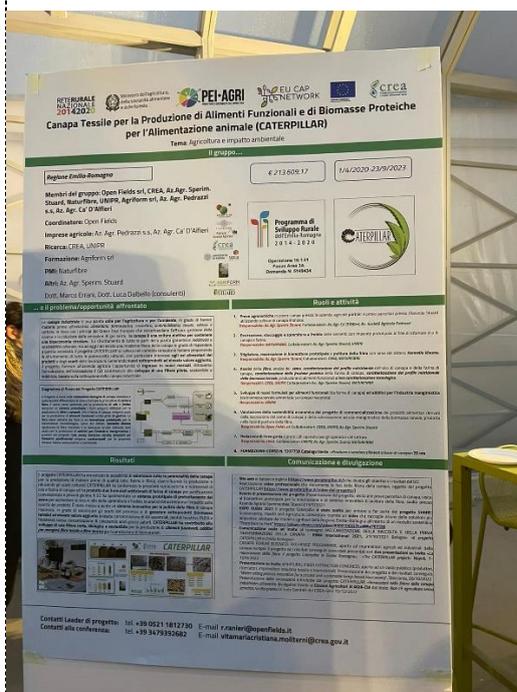


Info: [info@agroparadisi.it](mailto:info@agroparadisi.it)  
[www.paradisi.it/area-tematica/area-tema-2/](http://www.paradisi.it/area-tematica/area-tema-2/)

Iniziativa realizzata nell'ambito del Programma regionale di sviluppo rurale 2014 - 2020 - Tipo di operazione 16.101 Focus area 1a - domanda di sostegno 31494.24



-un poster (a cura del CREA-GB)



Il 12/04/2023 la Dott.ssa Moliterni è stata intervistata da una giornalista per la pubblicazione di un articolo sulle innovazioni nel campo dell'economia circolare. Durante l'intervista sono state

	illustrate le innovazioni proposte nei progetti Scarabeo e Caterpillar. Due articoli scientifici sono in preparazione.
Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate	Gli obiettivi sono stati raggiunti.

## COSTI – AZIONE DIVULGAZIONE PERSONALE

Cognome e nome	Mansione/ qualifica	Attività svolta nell'azione	Costo orario	Ore	Costo totale
	impiegato TI part time 50%	gestione attività divulgative	€ 27,00	16,00	€ 432,00
	impiegato TI per anno 2021-2022 / quadro da anno 2023	gestione attività divulgative	€ 27 per anno 2021-2022 / € 43 da anno 2023	17,00	€ 603,00
	imp. Agrario 3° categoria - tempo indeterminato	organizzazione eventi	€ 27,00	79,50	€ 2.146,50
	imp. Agrario 4° categoria - tempo indeterminato 51,29%	organizzazione eventi e redazione materiale divulgativo	€ 27,00	15,50	€ 418,50
Totale:					€ <b>3.168,00</b>

## TRASFERTE

nome e cognome	Descrizione	Costo
	Presentazione orale presso il convegno "Natural Fibre Extractios Congress 2022" - 07/11/2022	€ 458,34
	Partecipazione congresso annuale EIHA - 16/06/2023	€ 825,00
Totale:		€ 1.283,34

Azione	<b>FORMAZIONE</b>
Unità aziendale responsabile	Agriform
Descrizione delle attività	<p>Nell'azione formazione sono state completate due edizioni del corso di formazione di 26 ore relative alla proposta di formazione 5207758 "Canapa tessile per la produzione di alimenti funzionali e di biomasse proteiche per l'alimentazione animale", con costo pro capite 643,76 €.</p> <p>Le due edizioni del corso corrispondono a:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Avvio formazione GOI 5218402 corso di formazione svolto dal 15/02/2021 al 15/03/2021 con 11 utenti <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Rendicontazione domanda 5244727 per un importo di 7081,36€</li> </ul> </li> <li>• Avvio formazione GOI 5382732 corso di formazione svolto dal 7/02/2022 al 9/03/2022 con 15 utenti <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Rendicontazione domanda 5512583 per un importo di 9656,40 €</li> </ul> </li> </ul> <p>svolto interamente online al quale hanno partecipato 11 aziende</p>

	<p>agricole.</p> <p>In questo corso sono state poste le basi per buone pratiche di coltivazione, ma anche di prima e seconda lavorazione sia per la filiera tessile che per quella della nutrizione umana. Sono stati descritti sistemi efficienti di macerazione che integrano la filiera tessile con la produzione di pannelli proteici per animali. Sono state descritte la qualità nutrizionali e nutraceutiche dei prodotti alimentari derivanti dalla canapa. La parte economica della filiera è stata trattata a partire dal conto economico delle diverse filiere fino agli accessi concreti al mercato.</p>
<p>Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate</p>	<p>Gli obiettivi della formazione sono stati pienamente raggiunti.</p>

## 2 - CRITICITÀ INCONTRATE DURANTE LA REALIZZAZIONE DELL'ATTIVITÀ

<p><b>Criticità tecnico-scientifiche</b></p>	<p>Le molteplici criticità gestionali sorte in corso d'opera e meglio descritte sopra, che hanno portato a 2 varianti del Piano d'Innovazione e del relativo bilancio, hanno imposto una rimodulazione delle attività sperimentali previste nell'azione 2, pertanto le prove di spremitura e di resa della spremitura sono state effettuate con un mix di varietà di seme canapa e con un numero ridotto di repliche sperimentali.</p> <p>Il sequenziamento delle bande proteiche eluite dai gel monodimensionali (CREA) non è stato eseguito a causa della rottura del sistema HPLC di separazione dei peptidi, che precede l'analisi in spettrometria di massa. La dilatazione dei tempi per l'acquisto della nuova strumentazione, avvenuta a cavallo del periodo pandemico ha reso impossibile la messa a punto del metodo e l'esecuzione delle analisi sul nuovo strumento nei tempi del progetto.</p> <p>Il contenuto in chitina relativo alla biomassa larvale, è stato determinato tramite metodica UPLC-MS e non tramite GC-MS e/o 1H-NMR, dal momento che lo standard analitico di glucosammina, sul quale la determinazione della chitina viene basata, non risultava rilevabile con queste due metodiche.</p>
<p><b>Criticità gestionali</b> (ad es. difficoltà con i fornitori, nel reperimento delle risorse umane, ecc.)</p>	<p>Criticità gestionali importanti legate al contesto pandemico, quali la difficoltà ad attivare borse di studio presso il CREA per gli anni 2020 e 2021 e la mancata disponibilità del fornitore individuato per la realizzazione del prototipo di estrattore di olio hanno comportato la necessità di rivedere il programma di lavoro e per questo sono state richieste due varianti che hanno riguardato:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- variazioni delle voci di spesa del budget CREA-GB nell'ambito dell'azione 4 per sostituzione della borsa di studio annuale inerente allo studio della composizione proteica della farina di canapa con l'acquisto reagenti di laboratorio finalizzati all'analisi di proteine della canapa e DNA microbico del liquido macerante;</li> <li>- riduzione del budget di Naturfibre per mancato acquisto del prototipo, dopo aver ottenuto l'autorizzazione a variare il fornitore, e conferma dell'impegno di Naturfibre a completare lo studio di progettazione del prototipo (azione 2).</li> </ul> <p>Il completamento dell'attività formativa ha richiesto tempi più lunghi rispetto a quanto previsto a causa delle restrizioni dovute alla</p>

	pandemia da COVID-19.
<b>Criticità finanziarie</b>	I partner di diritto privato hanno sostenuto sforzi economici notevoli derivanti dal prolungarsi del progetto molto oltre i tempi inizialmente previsti. Il contesto globale con aumento dei prezzi delle materie prime ha dato origine a criticità finanziarie per le quali è stato necessario rivedere il programma di lavoro dell'azione 2, sempre garantendo il completamento dello studio di progettazione del prototipo di estrattore d'olio.

### 3 - RELAZIONE TECNICA

Il Piano CATERPILLAR si basa sulla coltivazione di canapa industriale per la produzione di fibra e seme, e attraverso l'innovazione di processo propone lo sfruttamento di tutte le potenzialità della coltura, con particolare interesse all'uso alimentare o mangimistico dei prodotti e degli scarti delle lavorazioni. Attraverso la sperimentazione in campo il Piano CATERPILLAR si propone di contribuire alla diffusione delle buone pratiche agricole per la coltivazione e la raccolta della canapa industriale, favorendo la nascita di una filiera canapicola italiana, sostenibile e redditizia e l'integrazione delle Aziende Agricole residenti in aree svantaggiate, nel mercato globale dei prodotti a base di fibra e seme di canapa.

#### SPERIMENTAZIONE IN CAMPO

La sperimentazione in campo presso le aziende Agricole Ca' D'Alfieri e Pedrazzi, entrambe residenti in aree D, (3000 mq seminati con le varietà monoiche KC ZUZANA e SECUIENI JUBILEU, rispettivamente) nonostante le avverse condizioni climatiche, hanno consentito di effettuare i rilievi morfometrici previsti e la raccolta di fusti ed infruttescenze che sono stati poi essiccati all'aria. Le prove hanno dimostrato la possibilità di effettuare la coltivazione anche su terreno collinare, ed evidenziato la necessità di dotare le aziende della strumentazione meccanica adatta al taglio dei fusti di canapa. Infatti, la raccolta degli steli è stata effettuata manualmente, con motosega, in entrambi i campi. Il seme essiccato all'aria è stato sgranato manualmente. Complessivamente, I dati morfometrici e produttivi ottenuti in entrambe le aziende incoraggiano la coltivazione della canapa anche in aree svantaggiate, evidenziando la necessità di macchine dedicate per la raccolta e per la lavorazione dei suoi prodotti.

#### ESSICCAZIONE, STOCCAGGIO, SPREMITURA SEMENTI E CARATTERIZZAZIONE DEI PRODOTTI

Per effetto della DETERMINAZIONE Num. 13993 del 23/07/2021 e DETERMINAZIONE Num. 15257 del 04/08/2022, le attività previste per il completo raggiungimento degli obiettivi dell'azione 2 sono state rimodulate nel collaudo del sistema di preriscaldamento del seme di canapa finalizzato ad aumentare la resa di spremitura e nella predisposizione di un documento di progettazione del prototipo sulla base dei risultati ottenuti. Il collaudo e le prove di spremitura sono stati effettuati con un mix di sementi di canapa da spremitura acquistato da un fornitore, presso la ditta Tecnoimpianti, sotto la supervisione scientifica del CREA. Il sistema di preriscaldamento realizzato da Tecnoimpianti su indicazione di Naturfibre è costituito da una coclea rotante che alloggiata in un tubo della lunghezza di metri 3 complessivi. Il tubo è riscaldato in 6 punti distribuiti regolarmente lungo i tre metri, con

resistenze di 500 W ciascuna. La temperatura può essere impostata dall'esterno ed è regolata da un termostato in dotazione che lavora in un range di temperature da t. amb. a 250 °C, con una precisione di controllo di  $\pm 3-5^{\circ}\text{C}$ . Il motore della coclea è impostato a 1400 giri/min con un regolatore 1/10 che porta i giri a 140/min. Il motore lavora in continuo caricando all'interno del tubo di preriscaldamento tutto il seme disponibile nella tramoggia di alimentazione. Al termine delle prove di collaudo del sistema di preriscaldamento è stato predisposto un documento di progettazione che prevede le seguenti modifiche:

- Riduzione della portata del tubo di preriscaldamento per assecondare la velocità della pressa;
- Riduzione del numero di resistenze da 500W da N.6 a N.3
- Possibilità di differenziare l'accensione e lo spegnimento delle tre resistenze, secondo necessità
- Riduzione del N. di giri del motore della coclea.

Le analisi dei campioni prelevati durante le prove di spremitura hanno fornito alcune interessanti evidenze sperimentali: all'aumentare della temperatura di preriscaldamento si ottiene una maggiore resa in olio rispetto alla spremitura convenzionale senza preriscaldamento. Tuttavia, la qualità dell'olio misurata in termini di acidità e numero di perossidi, ha fornito risultati contrastanti. L'acidità dell'olio alle diverse temperature di preriscaldamento varia tra circa 1,5 e 2,15%, che sono valori paragonabili a quelli dell'olio di oliva "vergine", mentre, il numero dei perossidi ha mostrato un andamento apparentemente non correlabile con la temperatura di preriscaldamento. In conclusione, possiamo dire che indubbiamente la presenza di un sistema di preriscaldamento del seme ha l'effetto di aumentare la resa in olio; sono tuttavia necessari ulteriori esperimenti per accertare la qualità dell'olio ottenuto mediante preriscaldamento del seme, soprattutto per quanto riguarda la stabilità ossidativa e la shelf-life

## PULITURA DELLA FIBRA MACERATA CON LARVE di *H. ILLUCENS* e loro CARATTERIZZAZIONE

L'impianto prototipale di macerazione della fibra decorticata di canapa, sviluppato nell'ambito del PSR SCARABEO e disponibile presso lo STUARD LAB, è stato adoperato per gli esperimenti necessari a fornire la fibra macerata per ottimizzare il sistema di pulitura della fibra mediante larve del dittero *Hermetia Illucens* (BSF, mosca soldato), sviluppato in forma prototipale nell'ambito delle attività del PSR SCARABEO. In particolare, l'obiettivo del progetto CATERPILLAR era quello di individuare un sistema ottimale per la separazione delle larve dalla fibra al termine del processo di pulitura, consentendo il loro recupero per il successivo processamento. Il sistema di separazione e recupero delle larve messo a punto nelle attività progettuali si basa su una separazione con mezzi fisici (calore) e sfrutta il naturale comportamento delle larve osservato durante la sperimentazione. Al termine della fase di pulitura, la fibra con le larve viene collocata su un graticcio e irradiata con una debole sorgente di calore e luce visibile. L'aumento di temperatura e luminosità spinge le larve ad addentrarsi nello spessore della fibra ripulita, fino ad attraversare il graticcio, concentrandosi sul fondo di un contenitore sottostante, in cui vengono recuperate. Se la sorgente di luce e calore è il sole, questo sistema non consuma energia elettrica. La fibra ripulita con le larve è stata analizzata mediante lo stelometro, che ha rilevato una riduzione statisticamente non significativa delle proprietà tensili rispetto a quella ripulita con metodo convenzionale (lavaggio ad acqua in macchina).

L'analisi chimico-fisica della biomassa larvale cresciuta su fibra di canapa macerata per 6 giorni ha evidenziato un incremento ponderale del  $50.87 \pm 7.21$  %. L'analisi centesimale ha dimostrato che la biomassa larvale è un'interessante fonte di proteine (40% sulla sostanza secca) ricche di aminoacidi essenziali, e di grassi (12%) principalmente costituiti da acidi grassi saturi, mentre  $\beta$ -sitosterolo e campesterolo (steroli tipicamente vegetali) sono risultati i più abbondanti tra gli steroli. Approfondendo l'analisi della frazione proteica mediante

digestione enzimatica, caratterizzazione degli idrolizzati e analisi bioinformatica dei dati, ne è stata inoltre evidenziata la potenziale bioattività. In particolare, gli idrolizzati proteici risultano ricchi in peptidi con potenziali attività antiossidanti, ACE e inibitorie della DPP-IV, correlate rispettivamente con la regolazione della pressione arteriosa nei mammiferi e con la regolazione dell'omeostasi del glucosio. L'insieme di questi risultati ha evidenziato come il sistema di pulizia della fibra di canapa con larve di mosca soldato consente di valorizzare gli scarti della lavorazione dei fusti di canapa, non solo da un punto di vista quantitativo (incremento ponderale) ma anche qualitativo (composizione chimica della biomassa). L'elevato contenuto in proteine ad alta qualità e di steroli vegetali rende infatti la biomassa larvale una potenziale fonte di molecole che possono essere sfruttate come ingredienti o additivi funzionali nel settore alimentare e/o mangimistico.

## ANALISI FUNZIONALE DEL SEME DI CANAPA

Il seme di canapa prodotto dalla sperimentazione in campo/parcellare è stato sottoposto a prove di germinabilità per attestarne il grado. Tali prove hanno rivelato delle differenze nel grado di germinabilità tra il seme prodotto in campo e quello prodotto nelle prove parcellari. In particolare, è stato riscontrato un grado di germinabilità più basso nelle prove in campo rispetto a quello ottenuto dalle prove parcellari e tali differenze sono da imputare probabilmente al differente grado di maturazione del seme raccolto in campo (luglio) rispetto a quello del seme raccolto dalle prove parcellari (agosto).

## CARATTERIZZAZIONE DEL PROFILO NUTRIZIONALE DI OLIO E FARINA DI CANAPA

Olio e farina ottenuti dalla spremitura convenzionale del seme di canapa sono stati caratterizzati per le loro proprietà chimico-fisiche e profilo nutrizionale.

### *Olio di canapa*

Il profilo in **acidi grassi** dell'olio di canapa risulta costituito per circa il 70% da acidi grassi insaturi, tra cui l'acido linoleico è quello maggiormente rappresentato, seguito dall'acido oleico e dall'acido linolenico. Gli acidi grassi saturi costituiscono circa il 30% in cui acido palmitico e acido stearico risultano maggiormente rappresentati. Il profilo in **steroli** dell'olio di canapa è particolarmente ricco di  $\beta$ -sitosterolo,  $\Delta_5$ -avenasterolo e campesterolo, mentre la percentuale di colesterolo è relativamente molto bassa, come atteso da un olio di origine vegetale. L'analisi della distribuzione delle classi lipidiche ha rivelato la prevalenza di trigliceridi, generalmente associata ad una bassa percentuale di acidi grassi liberi e ad una maggiore stabilità ossidativa. I valori misurati di acidità percentuale e Indice di perossido (IP) hanno confermato una buona stabilità ossidativa, se il prodotto viene conservato in opportuni contenitori che lo proteggono dall'ossidazione chimica (bassa percentuale di ossigeno) e fisica (protezione dalla luce solare). Il contenuto totale in polifenoli dell'olio di canapa è risultato pari a  $29,13 \pm 8,28$  mg/Kg GAE

### *Farina di canapa*

La sostanza secca della farina di canapa è risultata pari a  $90.2 \pm 0.22$  %. Nella tabella seguente, i risultati dell'analisi del profilo nutrizionale della farina di canapa

<b>Composizione (%SS)</b>	<b>Farina Canapa</b>
Grassi	$12,2 \pm 0.2$
Proteine	$33.9 \pm 0.2$
Ceneri	$0.069 \pm 0.003$
Fibra insolubile	$48,6 \pm 0.4$

Fibra solubile	2,85 ± 0.2
Carboidrati disponibili e altri comp. *	2,38

I polifenoli totali della farina sono risultati pari a 866,72 ± 30,24 mg/Kg GAE, in linea da quelli descritti in letteratura, pari a 744 ± 29 e 21 ± 5 mg/Kg GAE

Parallelamente è stata effettuata la caratterizzazione delle proteine idrosolubili del seme di canapa mediante elettroforesi monodimensionale in condizioni denaturanti. Il pattern ottenuto è paragonabile ad altri disponibili in letteratura. Per un'accurata identificazione delle proteine espresse nel bandeggio, un totale di 16 bande sono state prelevate dal gel per essere sequenziate mediante spettrometria di massa ed analisi bioinformatica dei dati di sequenza. Per motivi tecnici non si è potuto procedere al loro sequenziamento.

#### SVILUPPO NUOVI FORMULATI PER ALIMENTI FUNZIONALI ADDIZIONATI DI FARINA DI CANAPA E LORO CARATTERIZZAZIONE NUTRIZIONALE, TECNOLOGICA E SENSORIALE

Per valorizzare le proprietà nutrizionali e salutistiche della farina di canapa è stato scelto di realizzare dei nuovi formulati per panificazione privi di glutine, addizionati di farina di canapa (fortificati). Per individuare la percentuale di farina di canapa più adatta alla fortificazione sono state effettuate prove preliminari con formulati convenzionali a cui è stata aggiunta farina di canapa in percentuali crescenti (10%, 15%, 25%). Di questi pani sono state valutate le proprietà tecnologiche, sensoriali nutrizionali e salutistiche. Le analisi hanno mostrato come il contenuto lipidico e proteico aumenta in modo direttamente proporzionale alla quantità di farina di canapa aggiunta, come atteso. Inoltre, la farina di canapa contribuisce ad incrementare il contenuto di acidi grassi essenziali come l'acido linolenico, appartenente alla serie degli  $\omega$ 3 e assente nel pane controllo. La caratterizzazione del profilo amminoacidico della frazione proteica ha rivelato un contenuto di serina, prolina, idrossiprolina, aspartato, fenilalanina e tirosina significativamente maggiore nei pani addizionati con farina di canapa. Infine, anche il contenuto di polifenoli totali e l'attività antiossidante mostrano un andamento coerente all'aumento della quantità di farina di canapa addizionata all'impasto. L'analisi delle proprietà tecnologiche e sensoriali ha consentito di individuare nel 15% la quantità ottimale di farina di canapa per la fortificazione del pane.

Al fine di produrre pani privi di glutine addizionati del 15% di farina di canapa, sono state selezionate 6 diverse miscele commerciali per panificazione senza glutine tra quelle presenti in commercio, in base alla facile reperibilità, la diffusione sul mercato e le caratteristiche della ricetta. Solo 2 mix sono risultati idonei alla fortificazione con farina di canapa e sono state adoperate per produrre diversi campioni di pane addizionato di farina di canapa al 15%. Questo risultato è in linea con quanto atteso, infatti è noto che i preparati per panificazione privi di glutine possono contenere ingredienti di varia natura (frumento de glutinato, grano saraceno, farina di semi di lino o farina di riso o amido di mais) che possono impattare negativamente sulla gradevolezza del prodotto finale. Da un punto di vista tecnologico, fermo restando che le osservazioni effettuate durante questa sperimentazione sono fortemente legate alla tipologia di mix commerciale adoperata, è stato osservato che la fortificazione con farina di canapa produce un pane meno sviluppato rispetto all'analogo non fortificato, con un'alveolatura di dimensioni maggiori, con un maggior contenuto di acqua, e con una mollica più dura. Infatti, anche se priva di glutine, la farina di canapa ha un elevato contenuto di proteine che aiutano a trattenere l'aria nell'impasto e a rendere la struttura più compatta e pesante. La farina di canapa non sembra influenzare parametri come coesività ed elasticità, che invece dipendono dal mix di farine di partenza. Riguardo il colore, dall'analisi è emerso che il colore del pane senza glutine può dipendere dal tipo di farina utilizzata nella formulazione e l'aggiunta di farina di canapa tende a rendere più scuro l'impasto ed il prodotto finito, come atteso. Il contenuto proteico, lipidico e polifenolico, con le relative proprietà

antiossidanti, aumentano sensibilmente in tutti gli impasti fortificati con farina di canapa. Tutti i risultati della sperimentazione condotta concorrono nel definire la fortificazione con farina di canapa un utile sistema per aumentare le proprietà nutrizionali (lipidi e proteine) e il contenuto in antiossidanti (polifenoli totali) degli impasti per panificazione convenzionali e privi di glutine.

## CARATTERIZZAZIONE DEL PROCESSO MACERATIVO IN IMPIANTO PROTOTIPALE

Per effetto della delibera DPG/2021/14537 del 23/07/2021, è stata introdotta nelle attività del Piano CATERPILLAR, la caratterizzazione del processo macerativo mediante un approccio basato sull'analisi metagenomica e bioinformatica di campioni del liquido di macerazione, prelevati all'inizio (T0), a metà processo (TM), e alla fine del processo (TF). Questa caratterizzazione è stata effettuata ai fini di una migliore comprensione del processo, per la sua standardizzazione in vista di un possibile sviluppo industriale e per l'eventuale produzione di inoculi commerciali. L'analisi è stata condotta su 84 campioni di liquido di macerazione prelevati nelle diverse fasi del processo, in 8 cicli macerativi successivi. L'analisi metagenomica è stata effettuata mediante la tecnica del sequenziamento di molecole di DNA "barcode", in questo caso rappresentate dalla regione ipervariabile V3-V4 del gene per l'rRNA ribosomiale 16S (16S rRNA Metabarcoding). L'analisi bioinformatica dei dati ha rivelato che il processo viene condotto prevalentemente da un discreto numero di generi batterici che, nelle condizioni selettive imposte nel bioreattore, diminuiscono nella fase intermedia del processo per poi aumentare nella fase finale del ciclo, in cui la composizione del microbioma è decisamente diversa da quella riscontrata al T0. Questa osservazione basata sul numero di unità tassonomiche presenti in ciascuna fase del processo per 8 cicli macerativi successivi è confermata dall'analisi degli indici di diversità di Shannon calcolati negli stessi campioni. L'indice di diversità è sempre molto alto al T0, diminuisce drasticamente nel TM (fase selettiva del processo), per poi risalire nella fase finale (TF). Quando una frazione del liquido di macerazione viene adoperata come inoculo per il ciclo macerativo successivo, la composizione del microbioma al T0 rispecchia quella del liquido di macerazione al tempo finale, riducendo i tempi necessari all'instaurarsi della comunità macerante.

In conclusione, dal confronto dei risultati dell'analisi bioinformatica dei dati di sequenziamento, condotta fino al livello di "Genere" ottenuti per gli 8 esperimenti consecutivi si evidenzia il contributo sostanziale della fibra alla composizione del microbioma macerante e la capacità del sistema di selezionare in termini di abbondanza relativa e numero di specie, alcuni generi di batteri che dalla letteratura risultano coinvolti in varie tipologie di processi macerativi:

- 5) Clostridi: sono introdotti nel sistema al T0 dalla fibra e aumentano in abbondanza relativa e numero di specie nella fase intermedia del processo per stabilizzarsi in quella finale.
- 6) Bacteroides: apparentemente introdotti dalla fibra tendono ad aumentare sensibilmente dal T0 al TF del primo esperimento, ma aumentano sostanzialmente anche nel tempo confrontando cicli consecutivi di macerazione in cui il 5% del liquido macerativo è costituito dallo scarto del liquido della macerazione precedente.
- 7) Enterobacteriaceae: introdotte nel sistema dalla fibra di canapa, tendono ad aumentare nel secondo ciclo macerativo con inoculo e a ridursi in abbondanza, crescendo in diversità di specie nel terzo ciclo macerativo e nei seguenti.
- 8) Pseudomonas: presenti massicciamente sulla fibra ed anche nell'acqua di sorgente vengono selezionati negativamente durante il processo. A questo genere appartengono specie ad attività pectinolitica.

Le attività realizzate nell'ambito del Piano Caterpillar hanno contribuito a:

- Dimostrare la possibilità di coltivare canapa monoica a doppio uso (seme e fibra), diversificando la produzione e aumentando la redditività colturale;

- Diffondere le buone pratiche agricole per la coltivazione della canapa in aziende agricole residenti in aree D, evidenziando la necessità di un maggiore grado di meccanizzazione della raccolta di seme e fusti
- Sperimentare il preriscaldamento del seme di canapa come sistema per aumentare la resa ed uniformare la produzione di olio e pannello
- Individuare le caratteristiche tecniche necessarie per la realizzazione di un sistema di preriscaldamento del seme efficiente, per implementare gli impianti di spremitura a freddo
- Sperimentare la produzione di impasti per panificazione convenzionali e privi di glutine fortificati con farina di canapa e definire la formulazione più idonea alla produzione di pane arricchito in molecole dall'elevato potere nutrizionale e salutistico.
- Sperimentare la produzione ciclica di fibra macerata mediante il bioreattore prototipale (realizzato con fondi del PSR) e disponibile per ulteriore sperimentazione presso il laboratorio della rete HT della Regione Emilia-Romagna, STUARD LAB
- Caratterizzare il processo macerativo nel bioreattore come strumento propedeutico al suo sviluppo industriale, contribuendo al rilancio dell'industria tessile canapicola regionale e allo sviluppo di una filiera canapicola sostenibile e redditizia
- Mettere a punto un sistema prototipale completo di pulitura della fibra macerata mediante larve di mosca soldato, valorizzando gli scarti della macerazione, con notevole risparmio idrico ed energetico rispetto al sistema convenzionale di pulitura
- Dimostrare che allevare le larve di mosca soldato per 6 giorni su fibra di canapa macerata consente di ottenere in incremento ponderale del 50%, e di aumentarne il valore nutrizionale
- Dimostrare che la biomassa larvale adoperata per la pulizia della fibra di canapa è una fonte di componenti dall'elevato potere nutrizionale e di molecole bioattive utili per l'industria alimentare e mangimistica, fornendo all'azienda nuove opportunità di mercato.
- Realizzare corsi di formazione per agricoltori sulla biologia della canapa e dei suoi prodotti, sulla fisiologia della produzione, le tecniche di coltivazione e di raccolta, le normative vigenti e le opportunità di mercato per i prodotti ad uso alimentare e mangimistico

La fibra di canapa macerata nel bioreattore in diversi cicli consecutivi nell'ambito di CATERPILLAR è stata utilizzata per prove di filatura e tessitura effettuate a titolo gratuito dalla società Prototipo Studio (Via Bagutta 14, 20121, MILANO), che hanno condotto alla produzione del primo filato 100 % canapa, interamente fatto in Italia. Il filato è stato poi lavorato con macchine artigianali fino alla produzione di capi di abbigliamento prototipali. I risultati di questa sperimentazione hanno incoraggiato la società Prototipo Studio ad investire nella realizzazione di un impianto preindustriale di macerazione (TRL6). Questo impianto della capacità di 320 kg di fibra/ciclo, già in funzione, sarà oggetto di ulteriore sperimentazione nell'ambito del progetto POR FESR "Water Retting 4.0" (delibera N. 16453 del 27/07/2023). I risultati della sperimentazione di CATERPILLAR hanno inoltre incoraggiato un gruppo di imprenditori agricoli del parmigiano ad investire nell'acquisto di un impianto industriale di stigliatura che fornirà la fibra decorticata per alimentare il TRL6 del progetto Water Retting 4.0. La presenza di un impianto industriale di stigliatura rappresenta una concreta opportunità di sviluppo della filiera canapicola Emiliano-Romagnola, scaturita dalle attività realizzate nell'ambito del progetto CATERPILLAR.

Data, 12/10/2023

IL LEGALE RAPPRESENTANTE

*Roberto Ranieri*