

Recupero di composti bioattivi da germe e crusche di grano duro deoleato

■ PAROLE CHIAVE

economia circolare, sottoprodotto, grano, antiossidanti, polifenoli, recupero scarti

RIASSUNTO

L'economia circolare è un modello di produzione e consumo alternativo a quello dell'economia lineare e si basa sulla capacità di riutilizzare, recuperare o riciclare i materiali di scarto ottenuti nelle diverse fasi produttive, o addirittura sul prevenirli. In particolare, il recupero degli scarti provenienti dal settore agro-alimentare, oltre a ridurre l'impatto ambientale, offre la possibilità di estrarre diversi composti bioattivi, come gli antiossidanti, utilizzabili in altri settori produttivi. Nel presente lavoro vengono riportate prove preliminari di estrazione da materiale di scarto (frazioni molitorie derivanti dalla molitura del grano) fornito dall'azienda Casillo Next Gen Food srl per il recupero di composti antiossidanti, effettuando il confronto fra tre tecniche estrattive: macerazione, macerazione assistita da ultrasuoni ed estrazione con Naviglio estrattore.



Recovery of bioactive compounds from germ and bran of de-oiled durum wheat

■ KEYWORDS

circular economy, by-product, grain, antioxidants, polyphenols, waste recovery

SUMMARY

The circular economy is an alternative production and consumption model to that of the linear economy and it is based on the ability to reuse, recover or recycle waste materials from the various production phases, or even prevent them. In particular, the recovery of waste from the agro-food sector, in addition to reducing the environmental impact, offers the possibility of extracting bioactive compounds from the waste itself, such as antioxidants, which can be used in other production sectors. This work reports preliminary extraction tests from waste material (fraction deriving from wheat milling) supplied by the company Casillo Next Gen Food srl for the recovery of antioxidant compounds, comparing three extraction techniques: maceration, ultrasound-assisted maceration and extraction with Naviglio extractor.

Introduzione

L'economia circolare è un modello di produzione e consumo alternativo a quello dell'economia lineare e si basa sulla capacità di riutilizzare, recuperare o riciclare i materiali di scarto delle diverse fasi produttive e, in alcuni casi, sul riuscire ad evitarne la dispersione. In particolare, il recupero degli scarti provenienti dal settore agro-alimentare, oltre a ridurre l'impatto ambientale, offre la possibilità di estrarre composti bioattivi, come gli antiossidanti, utilizzabili in altri settori produttivi.

Gli antiossidanti naturali sono composti che è facile trovare nella frutta, nelle foglie di tè, nella verdura, nei cereali e nelle piante medicinali. Questi composti sono attualmente oggetto di grande attenzione sia dal punto di vista accademico, che commerciale, poiché si comportano come "spazzini di radicali", la cui tossicità è di gran lunga inferiore rispetto a quella degli antiossidanti sintetici, come

l'idrossianisolo butilato (BHA) e l'idrossitoluene butilato (BHT), ritenuti responsabili delle principali malattie del fegato [1]. Inoltre, studi scientifici confermano che l'assunzione di antiossidanti naturali è associata a un minor rischio di malattie degenerative cardiovascolari e cancro [2].

Il grano è uno dei principali cereali, alla base di molti ingredienti alimentari nel mondo. Il chicco di grano è composto morfologicamente da crusca, germe ed endosperma. Gli antiossidanti presenti nel grano, che includono carotenoidi, tocoferoli, flavonoidi e acidi fenolici, sono stati oggetto di molti approfondimenti scientifici negli ultimi due decenni [3-6], per via del loro comprovato effetto benefico sulla salute e sulla prevenzione di diverse malattie nell'uomo. In particolare, dal frumento sono stati ottenuti estratti ricchi di antiossidanti, mediante l'uso di solventi tra cui acqua, etanolo, metanolo e miscele acqua/etanolo e acqua/metanolo [7, 8]. Alcuni studi hanno anche

riportato l'attività antiossidante del germe di grano sgrassato tostato [9, 10], oli di germe di grano [11] e idrolizzati proteici di germe di grano [12].

In particolare, il germe di grano sgrassato (Defatted Weat Germ, DWG) è il principale sottoprodotto del grano nel processo di estrazione dell'olio di germe; esso contiene molti ingredienti nutrizionali, come proteine, carboidrati, vitamine del gruppo B, pigmenti e minerali e alcuni microcomponenti funzionali [13, 14]. Tuttavia, in letteratura si riportano pochi studi sistematici riguardanti il Weat Germ (WG), specialmente dal punto di vista del contenuto e contributo alle attività antiossidanti complessive. Infatti, data la natura complessa dei fitochimici, la loro attività antiossidante dovrebbe essere valutata e validata tramite saggi accettati dalla comunità scientifica.

La lavorazione della cariosside del grano, una cui schematizzazione è riportata **Fig. 1a**, ha come obiettivo la produzione di



Fig. 1 - Schema delle componenti della cariosside (a) e principali fasi di produzione della crusca di grano duro deoleata e delle germe di grano duro deoleato (b).

Domanda di brevetto, non ancora brevettato

farina e di semole di grano. Purtroppo, non tutto il seme può essere utilizzato nell'alimentazione umana, ma alcune parti di esso vengono in genere considerate come dei sottoprodotti di lavorazione. Tuttavia, attualmente sono in fase di sviluppo alcuni processi volti a considerare questo tipo di sottoprodotto come una risorsa al pari di una materia prima, nell'ottica di sviluppo di una economia circolare in sostituzione di quella lineare (come dalle indicazioni fornite dall'European Green Deal Priorities 2019-24, source: https://ec.europa.eu/info/strategy/priorities-2019-2024_en). Ad esempio, il processo brevettato da Casillo Next Gen Food srl (con Nr. 102022000012611, Fig. 1b) ha come finalità il riutilizzo di sottoprodotti molitori della filiera alimentare volto a migliorare l'efficienza del ciclo produttivo, a promuovere la circolarità delle risorse, garantendo loro un ulteriore valore aggiunto. In particolare frazioni molitorie selezionate (germe e crusche di grano), derivanti dal processo di molitura del grano, sono sottoposte a un processo di estrazione dell'olio di grano duro a solvente, il residuo di estrazione dell'olio (germe e crusche di grano deoleati) è sottoposto a sua volta a trattamenti di separazione fisica al fine di ottenere il germe di grano duro deoleato e la crusca di grano duro deoleata.

In tale processo (Fig. 1b) si evidenzia come la crusca di grano duro deoleata e germe di grano duro deoleato contengano un contenuto residuo di fibre e proteine di non trascurabile importanza.

Nel presente studio, gli estratti di germe di grano sgrassati (DWGE) sono stati ottenu-

Tabella 1 - Residuo secco e resa estrattiva del Pellet deoleato di germe e crusche di grano duro e della polvere di germe di grano con tecniche di macerazione.

Metodo	Campione	Residuo secco (g/L)	Resa estrattiva (%)
Macerazione	Pellet*	2,89	1,445
	Polvere**	4,69	0,469
Macerazione con ultrasuoni	Pellet*	0,44	0,220
	Polvere**	1,45	0,725

* Pellet deoleato di germe e crusche di grano duro

** Crusca di grano duro deoleata

ti utilizzando acqua, soluzioni acquose di etanolo ed etanolo come solventi, e ciascuno determinato per le sue attività antiossidanti da metodi *in vitro* (test di scavenging DPPH e ABTS, potere riducente e attività antiossidante in un sistema di acido linoleico) e per il suo contenuto fenolico totale (metodo di Reagente Folin-Ciocalteu). Nel presente lavoro vengono riportate prove preliminari di estrazione da materiale di scarto (frazioni molitorie derivanti dalla molitura del grano) fornito dall'azienda Casillo Next Gen Food srl (Corato, Bari) per il recupero di composti antiossidanti, effettuando il confronto fra 3 tecniche estrattive: a) macerazione, b) macerazione assistita da ultrasuoni, c) estrazione con Naviglio estrattore.

Materiali e metodi (fase I)

La prima fase di questo lavoro ha previsto la realizzazione di prove estrattive e successive analisi degli estratti. I campioni processati sono stati: a) germe di grano deoleato in pellet; b) germe di grano deoleato in polvere; c) crusca di germe di grano deoleato in polvere.

I campioni testati sono:
-germe e crusca di grano deoleati in pellet
-germe e crusca di grano deoleati in polvere
-germe di grano deoleato in polvere
-crusca di grano deoleato in polvere
Non abbiamo fornito germe di grano deoleato in pellet

Macerazione

In due contenitori di vetro sono stati posti rispettivamente 20 g di pellet deoleato di germe e crusche di grano duro e 20 g di crusca di grano duro deoleata (sotto forma di polvere micronizzata), a cui sono stati aggiunti 100 mL di etanolo 99,9% v/v. Il processo estrattivo prevede una macerazione dinamica in costante agitazione. Il processo ha avuto la durata di 16 ore per entrambi i batch. Successivamente, gli estratti sono stati filtrati usando un filtro di porosità pari a 0,45 µm, in modo da eliminare tracce di particelle in sospensione. Sugli estratti così ottenuti è stata effettuata l'analisi del peso secco residuo rispetto all'evaporazione del solvente, effettuata in stufa a 105°C fino a peso costante (Tab. 1).

Estrazione mediante macerazione assistita da ultrasuoni

In due contenitori di vetro sono stati posti rispettivamente 20 g di pellet deoleato di germe e crusche di grano duro e 20 g di crusca di grano duro deoleata a cui sono stati aggiunti 100 mL di etanolo 99,9% v/v. L'estrazione è stata effettuata inserendo

i due contenitori in un bagno ad ultrasuoni per la durata di 8 ore. Anche in questo caso gli estratti sono stati filtrati usando un filtro di porosità di 0,45 µm; successivamente, è stato determinato il peso secco del campione per essiccazione in stufa a 105°C (Tab. 1).

Estrazione mediante Naviglio Estrattore

Un sacchetto per estrazione è stato riempito con 110 g di Pellet deoleato di germe e crusche di grano duro; il sacchetto è stato poi messo a contatto con 550 mL di etanolo 99,9% v/v (rapporto materiale-solvente 20%). Il processo estrattivo è stato eseguito usando un programma definito da 2 min di fase statica e 2 min di fase dinamica per ogni ciclo di estrazione, per un totale di 60 cicli, pari a un tempo complessivo di 4 ore. Durante le prove, è stata ricavata una curva cinetica di estrazione per monitorare il processo estrattivo attraverso la determinazione del peso del materiale estratto nel tempo. A tal fine, sono stati effettuati prelievi dopo 1, 2 e 4 ore dall'inizio dell'estrazione; ogni aliquota prelevata è stata filtrata usando un filtro da 0,45 µm e, successivamente, è stata determinata la concentrazione di residuo secco. I risultati sperimentali sono riportati in **Tab. 2**, mentre la curva cinetica è stata interpolata in **Fig. 2**.

Analisi spettrofotometrica

Gli estratti ottenuti sono stati dapprima diluiti 1:100 in acqua distillata, e poi sottoposti ad analisi spettrofotometrica nell'intervallo di lunghezze d'on-

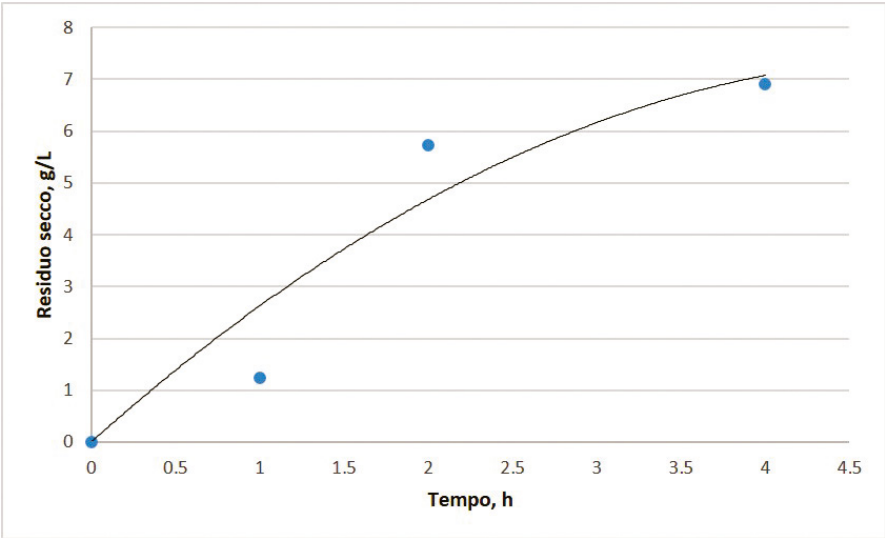


Fig. 2 - Cinetica di estrazione dei Pellet deoleati di germe e crusche di grano duro mediante impiego dell'estrattore Naviglio.

Tabella 2 - Cinetica di estrazione dei Pellet deoleati di germe e crusche di grano duro (Residuo secco e resa estrattiva percentuale).

Tempo (h)	Residuo secco (g/L)	Resa estrattiva (%)
1	1,23	0,62
2	5,73	2,86
4	6,90	3,45

da compreso tra 200 e 400 nm. Sono stati riscontrati dei picchi di massimo assorbimento in corrispondenza delle lunghezze d'onda di 225 e 275 nm (**Tab. 3**).

Analisi dell'attività antiossidante

I picchi di assorbanza riscontrati in queste misurazioni sono imputabili a molti composti naturalmente presenti in molti vegetali e caratterizzati da una elevata attività antiossidante. Pertanto, tali composti hanno suscitato molto interesse grazie alla capacità di combattere i radicali liberi, sia direttamente che indirettamente, aumentando al contempo l'efficacia di altri antiossidanti presenti nell'estratto. L'elevato potere antiossidante è dovuto

Tabella 3 - Assorbanza a lambda 275 nm e a lambda 225 nm degli estratti alcolici.

Tecnica usata	Tipologia campione	Assorbanza	
		275 nm	225 nm
Macerazione	Pellet*	0,07097	0,31248
Macerazione	Polvere**	0,12743	0,33273
Macerazione con ultrasuoni	Pellet*	0,02207	0,08132
Macerazione con ultrasuoni	Polvere**	0,08289	0,26191
Estrattore Naviglio	Pellet*	0,31201	1,15800

* Pellet deoleato di germe e crusche di grano duro

** Crusca di grano duro deoleata

to alla particolare struttura chimica; infatti, grazie ai nuclei fenolici e a una coniugazione estesa, queste sostanze danno luogo alla formazione di radicali fenossilici stabilizzati per risonanza, che hanno la proprietà di neutralizzare i radicali liberi. Al fine di quantificare l'attività antiossidante dei composti in esame, è stato effettuato un saggio colorimetrico mediante l'utilizzo del radicale DPPH in modo da verificare le proprietà antiossidanti degli estratti nei confronti dei radicali liberi. Il saggio è stato effettuato mescolando 100 μ L di campione a 900 μ L di soluzione metanolica di DPPH. Dopo 1 h di incubazione della soluzione, è stata determinata l'assorbanza mediante analisi spettrofotometrica, alla lunghezza d'onda di 517 nm (Tab. 4).

Analisi gas cromatografica degli estratti alcolici

Gli estratti alcolici sono stati sottoposti ad analisi gas-cromatografica con rivelatore FID (*Flame Ionization Detector*). I parametri operativi sono riportati in Tab. 5.

In Fig. 3a viene riportata l'analisi gas cromatografica dell'estratto alcolico del Pellet deole-

Tabella 4 - Attività antiossidante (DPPH) degli estratti alcolici.

Tecnica usata	Attività antiossidante con metodo DPPH (%)
Macerazione pellet*	16,66
Macerazione polvere**	25,00
Ultrasuoni pellet*	8,33
Ultrasuoni polvere**	25,00
Estratto Naviglio Estrattore pellet*	29,16

* Pellet deoleato di germe e crusche di grano duro
 ** Crusca di grano duro deoleata

Tabella 5 - Parametri operativi usati per l'analisi cromatografica.

Parametri operativi	Valori operativi
Programmata di temperatura	60°C per 5 min, incremento di 7°C/min fino a 250 °C
Gas carrier	azoto
Portata	4 mL/min
Colonna capillare	l=50 m; f.t 0,25 μ m; i.d. 0,25 mm
fase stazionaria	5% fenil-metilsilicone

ato di germe e crusche di grano duro, ottenuto mediante il Naviglio Estrattore (NE). In accordo con dati di letteratura, il picco relativo all'acido ferulico è compreso tra 16 e 18 min. In Fig. 3b, invece, si riporta l'analisi gas cromatografica dell'estratto dello stesso pellet ottenuto per macerazione assistita da ultrasuoni.

Come è evidenziato nel grafico, non sono presenti picchi significativi nell'intervallo dei tem-

pi di ritenzione compresi tra 16 e 18 min.

Il confronto dei risultati ottenuti ha permesso di evidenziare che l'estrazione dei Pellet deoleati di germe e crusche di grano duro con il Naviglio estrattore risulta più efficiente rispetto alla macerazione assistita con ultrasuoni e macerazione tradizionale, sia in termini di resa in estratto secco che per i valori delle assorbanze misurati, dovuti alla presenza di composti antiossidanti.

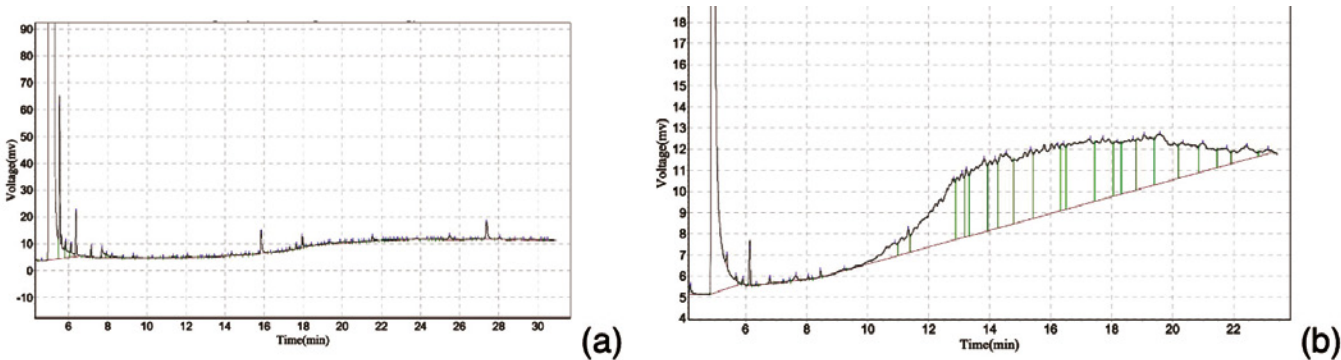


Fig. 3 - Analisi gas-cromatografica dell'estratto dal Pellet deoleato di germe e crusche di grano duro trattato con Naviglio Estrattore (a); Analisi gas-cromatografica estratto dal pellet trattato tramite macerazione assistita da ultrasuoni (b)

Materiali e metodi (fase II)

La seconda fase sperimentale ha riguardato prove di estrazione dello stesso materiale fornito dalla Casillo Next Gen Food, cambiando però il solvente estraente; in questo caso, è stato usato metanolo 99,8% v/v, che viene ritenuto più efficace nell'estrazione di molecole ad elevata attività antiossidante da matrici vegetali.

Il metodo estrattivo utilizzato è stato una macerazione dinamica, fissando il rapporto matrice/solvente del 20% w/v (nel dettaglio, 20 g di campione sono stati posti a contatto con 100 mL di metanolo). La procedura è stata

ripetuta per ciascuno dei materiali ricevuti (Pellet deoleato di germe e crusche di grano duro, Crusca di grano duro deoleata, in polvere, e Germe di grano duro deoleato). Il tempo di estrazione totale è stato di 17 h per tutti i campioni sottoposti ad analisi.

Anche per questa seconda fase sperimentale, gli estratti ottenuti sono stati sottoposti a determinazione del peso secco del materiale estratto, analisi della capacità antiossidante mediante saggio DPPH e analisi gas cromatografica (Tab. 6 e Fig. 4).

Tabella 6 - Residuo secco e resa estrattiva del Pellet deoleato di germe e crusche di grano duro e della polvere di germe di grano duro deoleata e delle cusca di grano duro deoleata (macerazione).

Tipo di Campione	Residuo secco (g/L)	Resa estrattiva (%)	Attività antiossidante (%)
Pellet*	10,89	5,45	71
Polvere**	14,37	7,19	65
Germe di grano***	19,83	9,91	88

* Pellet deoleato di germe e crusche di grano duro
** Crusca di grano duro deoleata, in polvere
*** Germe di grano duro deoleato

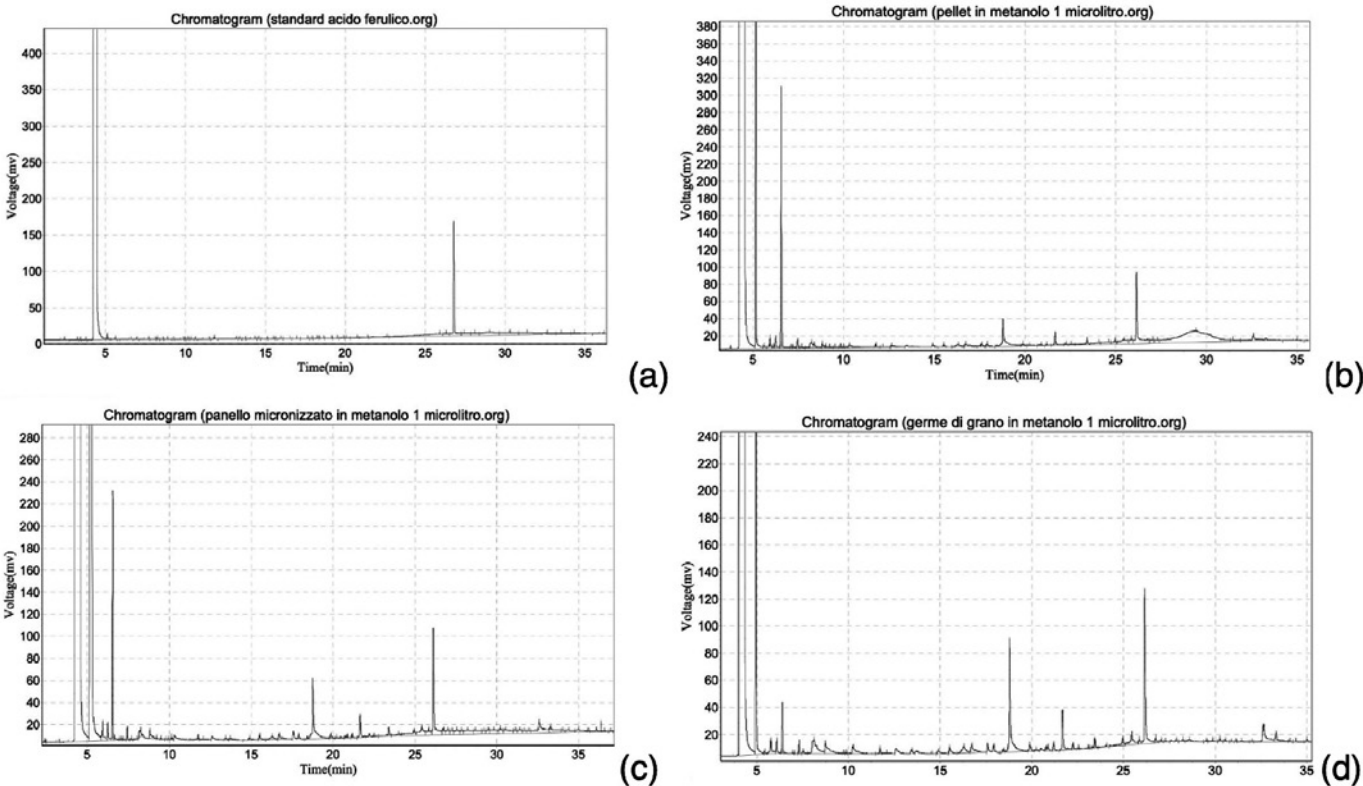


Fig. 4 - Gas cromatogramma dell'acido ferulico (a); Analisi gas-cromatografica sull'estratto dal pellet deoleato di germe e crusche di grano, ottenuto tramite macerazione in metanolo (b); Analisi gas-cromatografica sull'estratto da pannello micronizzato, ottenuto tramite macerazione in metanolo (c); Analisi gas-cromatografica estratto del germe di grano ottenuto tramite macerazione in metanolo (d)

Risultati e discussione

Lo standard dell'acido ferulico è stato analizzato per via gascromatografica (Fig. 4a) nelle stesse condizioni di analisi dei campioni estratti in metanolo e non è stato rilevato alcun picco al tempo di ritenzione dello stesso negli estratti dei campioni analizzati. Se si confrontano i tempi di ritenzione dello standard del trans-acido ferulico con i tempi di ritenzione degli estratti, si nota la presenza di un picco a un tempo di ritenzione di 26.157 min, mentre lo standard di trans acido-ferulico, nelle stesse condizioni, ha un tempo di ritenzione di 26.840 min. Questo potrebbe far ipotizzare che l'estratto contenga la forma cis dell'acido ferulico. Inoltre, gli estratti si presentano come liquidi oleosi gialli che, in accordo con quanto riportato in letteratura, lasciano ipotizzare che la forma cis-acido ferulico sia responsabile del colore giallo oleoso.

Come è possibile evidenziare dai gas-cromatogrammi degli estratti metanolici (Figg 4b, 4c e 4d), si rileva un discreto numero di composti che rendono conto della attività antiossidante degli estratti stessi (Tab. 6). Le rese in estrazione comprese tra il 4-6% (w/w) (in etanolo) e comprese tra il 5 e il 9% (w/w) (in metanolo) ci inducono a ritenere che valga la pena di effettuare un'estrazione preventiva del materiale in esame, scegliendo il solvente estraente, a seconda dei casi, fra alcol etilico e alcol metilico. Date le elevate quantità da trattare, si potrebbe adottare un metodo

per contatto in batch con agitazione impiegando serbatoi in acciaio di volume maggiore. Attualmente, la tecnica dell'estrattore Naviglio non consente di processare più di 100 kg/giorno; pertanto, risulta più indicata l'estrazione per contatto in batch con agitazione. Tuttavia, due impianti che lavorano in parallelo, di 400 litri di capacità, potrebbero consentire la lavorazione di 200 kg in 4 ore, fino a un massimo di 600 kg in 24 ore. Un ulteriore vantaggio per la messa a punto di un processo di estrazione del materiale di scarto in esame è che alla fine del processo estrattivo il materiale residuo possa essere essiccato e "pelettizzato" per impiegarlo come concime e/o ammendante del terreno oppure come coadiuvante alla fiamma nelle stufe e/o in bruciatori per la combustione della componente carboniosa.

Conclusioni

L'estrazione del materiale fornito dalla Casillo Next Gen Food Srl è di notevole interesse dal punto di vista del recupero del materiale di scarto. In particolare, utilizzare il metanolo come solvente porta ad una maggiore resa estrattiva del materiale che potrebbe essere ulteriormente incrementata se si utilizza la metodologia estrattiva che prevede l'impiego del Naviglio Estrattore. Inoltre, si nota un'attività antiossidante contro i radicali liberi che nel caso del campione "Germe di grano duro deoleato" arriva fino all'88%, indice di presenza di notevoli sostanze antiossidanti e anti-radicaliche. Purtroppo, nelle condizioni operative adot-

tate, non è stata riscontrata la presenza di acido ferulico. L'estrazione in metanolo però prevede necessariamente un processo aggiuntivo; si deve prevedere il completo allontanamento del metanolo post-estrazione. Infatti, il metanolo non è considerato Food grade dal Codex Alimentare e, pertanto, non può essere impiegato l'estratto tal quale come nel caso dell'impiego dell'etanolo. Questa operazione unitaria viene effettuata grazie a sistemi di concentratori che operano a pressioni ridotte e perciò ne accelerano l'allontanamento.

L'analisi gas-cromatografica ha evidenziato negli estratti molecole ad elevata attività antiossidante e antiradicalica che potrebbero avere interessanti impieghi sia in ambito alimentare che cosmetico. L'estrazione mediante etanolo come solvente si dimostra meno efficace del metanolo in termini di resa estrattiva sul materiale. Considerando il "Pellet" in metanolo, è stata ottenuta una resa estrattiva sul materiale del 5,45% (w/w) (incrementabile mediante impiego del Naviglio estrattore) mentre in etanolo è stata ottenuta una resa estrattiva del 3,45% (w/w). Confrontando anche le attività antiossidanti, si nota una notevole differenza tra i due solventi utilizzati: il pellet in metanolo ha un'attività contro i radicali liberi del 71% mentre utilizzando l'etanolo si ha un'attività antiossidante contro i radicali liberi del 29%.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia l'azienda Casillo Next Gen Food Srl, di Corato (BA) per la fornitura dei campioni.

Riferimenti bibliografici

- [1] Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhargwaj, V., Sahana, D. K., & Kumar, M. R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of controlled release*, 113(3), 189-207.
- [2] Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Díaz-Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food research international*, 41(3), 274-285.
- [3] Liyana-Pathirana, C. M., & Shahidi, F. (2007). Antioxidant and free radical scavenging activities of whole wheat and milling fractions. *Food chemistry*, 101(3), 1151-1157.
- [4] Liyana-Pathirana, C. M., & Shahidi, F. (2007). The antioxidant potential of milling fractions from bread-wheat and durum. *Journal of Cereal Science*, 45(3), 238-247.
- [5] Vaher, M., Matso, K., Levandi, T., Helmja, K., & Kaljurand, M. (2010). Phenolic compounds and the antioxidant activity of the bran, flour and whole grain of different wheat varieties. *Procedia Chemistry*, 2(1), 76-82.
- [6] Zhou, K., Su, L., & Yu, L. (2004). Phytochemicals and antioxidant properties in wheat bran. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(20), 6108-6114.
- [7] Vaher, M., Matso, K., Levandi, T., Helmja, K., & Kaljurand, M. (2010). Phenolic compounds and the antioxidant activity of the bran, flour and whole grain of different wheat varieties. *Procedia Chemistry*, 2(1), 76-82.
- [8] Zieliński, H., & Kozłowska, H. (2000). Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(6), 2008-2016.
- [9] Gelmez, N., Kincal, N. S., & Yener, M. E. (2009). Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from roasted wheat germ based on yield, total phenolic and tocopherol contents, and antioxidant activities of the extracts. *The Journal of Supercritical Fluids*, 48(3), 217-224.
- [10] Krings, U., El-Saharty, Y. S., El-Zeany, B. A., Pabel, B., & Berger, R. G. (2000). Antioxidant activity of extracts from roasted wheat germ. *Food chemistry*, 71(1), 91-95.
- [11] Małecka, M. (2002). Antioxidant properties of the unsaponifiable matter isolated from tomato seeds, oat grains and wheat germ oil. *Food Chemistry*, 79(3), 327-330.
- [12] Zhu, K., Zhou, H., & Qian, H. (2006). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, 41(6), 1296-1302.
- [13] Ge, Y., Sun, A., Ni, Y., & Cai, T. (2000). Some nutritional and functional properties of defatted wheat germ protein. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(12), 6215-6218.
- [14] Zhu, K. X., Zhou, H. M., & Qian, H. F. (2006). Proteins extracted from defatted wheat germ: nutritional and structural properties. *Cereal Chemistry*, 83(1), 69-75.