

Alma Mater Studiorum - Università degli studi di Bologna

FACOLTÀ DI CHIMICA INDUSTRIALE
Dipartimento di Chimica Industriale e dei Materiali

Corso di Laurea Magistrale
Chimica Industriale

Classe Lm-71 - Scienze E Tecnologie Della Chimica Industriale

**Valorizzazione del *Pisum Sativum* L. tramite
tecniche di bioliquefazione: studio e
caratterizzazione**

TESI DI LAUREA SPERIMENTALE

Presentata da:

AGNESE GIACINTI

Relatore:

DOTT. LEONARDO SETTI

Correlatrice:

DOTT.SSA ELENA ANSALONI

III Sessione

ANNO ACCADEMICO 2009 - 2010

SOMMARIO

1	INTRODUZIONE.....	1
1.1	Materie prime derivanti da fonti rinnovabili per l'industria chimica di sintesi	1
1.1.1	Primary chemical building blocks	4
1.1.2	Secondary chemical building blocks	5
1.1.3	Biofenoli derivanti da fonti rinnovabili come secondary chemical building blocks	7
1.2	La parete cellulare vegetale.....	11
1.2.1	Funzioni	11
1.2.2	Costituenti polisaccaridici.....	12
1.2.3	Costituenti non polisaccaridici	14
1.2.4	Monocotiledoni e dicotiledoni.....	15
1.3	Pisello (<i>Pisum sativum</i> L.).....	18
1.4	Baccello	23
1.5	Biocatalizzatori industriali per l'idrolisi di matrici vegetali	27
1.5.1	Cellulasi	28
1.5.2	Emicellulasi	29
1.5.3	Pectinasi	29
1.5.4	Aril esterasi.....	31
1.5.5	Proteasi	33
1.5.6	Xilanasi	34
1.5.7	Amilasi.....	35
2	SCOPO.....	37

3	MATERIALI E METODI	39
3.1	Determinazione rapporto ottimale matrice vegetale:acqua di reazione	39
3.2	Trattamento meccanico, termico ed enzimatico della matrice vegetale	39
3.3	Enzimi idrolitici per la disgregazione della matrice vegetale	40
3.4	Determinazione degli zuccheri riducenti (Metodo dell'ADNS)	41
3.5	Determinazione delle proteine totali (Metodo Bradford).....	44
3.6	Determinazione dei polifenoli totali (Metodo di Folin-Ciocalteu)	44
3.7	Determinazione del potere antiossidante totale	46
3.8	Determinazione dei carboidrati totali (Metodo fenolo/solforico)	47
3.9	Determinazione dell'attività pectinasica di estratti enzimatici commerciali	49
3.10	Analisi amminoacidi con metodo della ninidrina	50
3.11	Materiali e strumentazione utilizzati	52
4	RISULTATI E DISCUSSIONI.....	55

4.1	Determinazione del rapporto ottimale tra la matrice vegetale e il volume d'acqua di reazione in funzione del trattamento meccanico, termico ed enzimatico dei semi di pisello.....	55
4.2	Cinetica di rilascio di alcune componenti chimiche del campione di <i>Pisum Sativum L.</i> con trattamento meccanico, termico ed enzimatico	55
4.2.1	Determinazione del rilascio di zuccheri riducenti	57
4.2.2	Determinazione dei carboidrati totali	58
4.2.3	Determinazione del rilascio di polifenoli totali	59
4.3	Determinazione del rapporto ottimale tra la matrice vegetale e il volume d'acqua di reazione in funzione del trattamento meccanico, termico ed enzimatico dei baccelli di pisello.....	63
4.3.1	Determinazione del rilascio di zuccheri riducenti	63
4.3.2	Determinazione dei carboidrati totali	65
4.3.3	Determinazione del rilascio di polifenoli totali	66
4.3.4	Determinazione del Potere Antiossidante Totale	67
4.4	Analisi delle proteine sugli idrolizzati di semi di pisello e di baccelli	68
4.4.1	Determinazione del contenuto di proteine totali del seme di <i>Pisum Sativum L.</i>	68
4.4.2	Determinazione del contenuto di proteine totali nel baccello di pisello	70
4.4.3	Analisi amminoacidi con metodo della ninidrina.....	74
4.5	Studio dell'influenza di differenti trattamenti enzimatici nella determinazione delle componenti chimiche del <i>Pisum Sativum L.</i> trattato meccanicamente e termicamente.....	75
4.5.1	Determinazione del rilascio di zuccheri riducenti nei campioni di semi di pisello trattati enzimaticamente	77
4.5.2	Determinazione del rilascio dei carboidrati totali nei campioni di seme di pisello trattati enzimaticamente	78

4.5.3	Determinazione del rilascio di polifenoli totali nei campioni di seme di pisello trattati enzimaticamente	79
4.5.4	Determinazione del Potere Antiossidante Totale nei campioni di seme di pisello trattati enzimaticamente	80
4.5.5	Determinazione del contenuto di proteine totali nei campioni di seme di pisello trattati enzimaticamente	81
5	CONCLUSIONI.....	83
6	BIBLIOGRAFIA	85

1 INTRODUZIONE

1.1 Materie prime derivanti da fonti rinnovabili per l'industria chimica di sintesi

Negli ultimi anni, la ricerca universitaria e lo sviluppo industriale stanno sempre più focalizzando l'attenzione su metodi innovativi per lo sfruttamento delle biomasse naturali al fine di ottenere materie prime strategiche da fonti rinnovabili in sostituzione a quelle più consolidate derivanti da fonti fossili non rinnovabili.

Tale ricerca, ha già permesso di mettere in atto produzioni che, sfruttando materie prime derivanti da biomasse, riescono ad ottenere prodotti di interesse commerciale con un maggior valor aggiunto.

Un esempio in tal senso riguarda la produzione di resine fenoliche, utilizzate principalmente nella fabbricazione di prodotti quali i pannelli di legno compensato, pannelli di fibre a media densità e laminati. Mediante un semplice processo termodegradativo (pirolisi) di truciolo di legni morbidi, si ottiene infatti un olio ricco di sostanze a base fenolica impiegabili per la polimerizzazione di resine senza che si richiedano particolari processi di depurazione. Tale olio è generalmente usato in una miscela al 50% con fenolo puro. Mantenendo la qualità del manufatto inalterata, si ottengono comunque vantaggi significativi, tra i quali:

- utilizzo di materie prime derivanti da fonti rinnovabili;
- risparmio economico dovuto alla natura della materia prima ed al processo di *upgrading* del *chemical*;
- ritorno economico correlato allo sfruttamento dei sottoprodotti di pirolisi (gas e carbone) utilizzabili come vettori per la produzione di energia.

Complessivamente, oltre ad un risparmio economico dovuto ai fattori sopracitati che può raggiungere il 25%, si deve considerare anche il ritorno di immagine correlato allo sfruttamento di risorse rinnovabili.

Le fonti rinnovabili, oltre ad avere un ruolo innovativo per quanto riguarda la produzione di *chemicals*, stanno sempre più acquisendo un

ruolo essenziale nel campo dei servizi, in particolare quelli correlati alla produzione di energia.

Lo sviluppo tecnologico e industriale degli ultimi decenni ha portato infatti la società occidentale ad un relativo grado di benessere economico e sociale, benessere che ha però comportato un crescente consumo di risorse e la produzione di enormi quantità di rifiuti.

Un aspetto che sta diventando molto attuale e sempre di più rilevante per quanto riguarda le politiche internazionali, è costituito dal continuo aumento della domanda di energia per rispondere al crescente fabbisogno internazionale (in particolare da parte dei paesi in via di sviluppo).

Attualmente, la produzione di energia è in gran parte correlata al consumo di fonti fossili non rinnovabili. In particolare il petrolio ed il carbone sono tutt'oggi i capisaldi alla base delle tecnologie per la produzione della maggior parte dell'energia quotidianamente consumata.

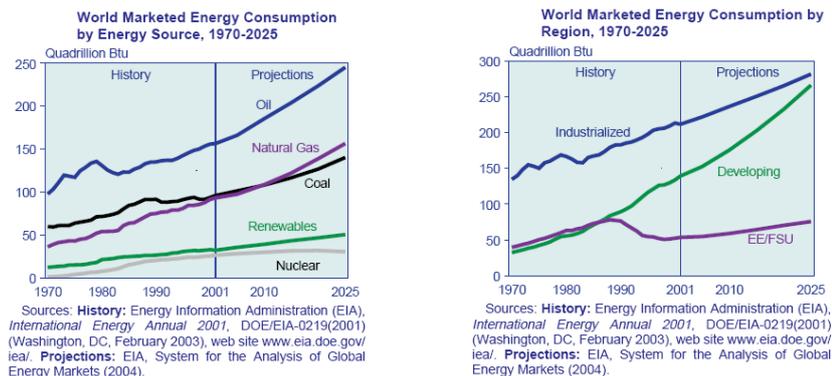


Figura 1-1: consumo energetico mondiale (1970-2025) e consumo energetico per tipo di combustibile.

Le fonti fossili attualmente in uso, date le disponibilità, le tecnologie e le rese energetiche, hanno permesso sin ora di rispondere in maniera ottimale alla domanda del mercato globale.

Tali fonti sono però per natura non rinnovabili e quindi esauribili; nasce dunque un concreto problema connesso alla ricerca di nuovi giacimenti per il reperimento della materia fossile e lo sviluppo di nuove tecnologie per uno sfruttamento più efficiente delle risorse.

Oltre al settore energetico anche il settore chimico deve fare i conti con questi problemi dovuti all'esaurimento delle fonti fossili. Il petrolio, risulta infatti essere uno dei piedistalli più importanti dell'industria

chimica che, tramite la raffinazione del grezzo e la trasformazione dei *chemicals* ricavati è in grado di generare le *specialties* ad alto valore aggiunto che costituiscono la porzione più grande del mercato dei prodotti chimici di largo consumo.

L'attuale industria petrolchimica e chimica è dunque strettamente correlata ed interessata dalle vicende riguardanti il settore petrolifero.

Il valore stesso dei prodotti chimici di largo impiego è strettamente correlato al costo delle materie prime fossili. Il petrolio è sempre stato sfruttato per ottenere materie prime a basso costo da trattare e trasformare in manufatti dalle proprietà uniche a prezzi molto competitivi.

Il problema dell'approvvigionamento delle risorse energetiche pone quindi seri problemi anche al reperimento delle materie prime per l'industria chimica la quale, molto probabilmente, vivrà un periodo di aumento costi in un futuro prossimo.

Questo problema ha spinto ed incoraggia continuamente i governi ad investire sempre di più in energie rinnovabili (eolica, solare, geotermica...), in tecnologie alternative, e nelle ricerche di nuovi combustibili.

Il binomio ricerca-sviluppo, la forte spinta industriale ed una crescente sensibilità pubblica e politica hanno già consentito di realizzare straordinari progressi.

La comunità internazionale ha già preso atto dell'importanza di un nuovo sistema basato su fonti di energia rinnovabili; iniziative comuni sono già state promosse a livello globale e molti stati stanno spontaneamente modificando le proprie politiche economiche in materia di energia.

Secondo l'International Energy Agency, le fonti rinnovabili potranno arrivare a soddisfare il 20% della richiesta di elettricità mondiale nel 2020, e il 50% della domanda energetica nel 2050.

Governi come quelli del Canada o del Brasile hanno invece avviato programmi operativi altrettanto vasti sulla produzione di "biofuels". Il primo sfrutterà le sue sovrabbondanze di cereali, mentre il secondo la sua capacità di trasformare in etanolo lo zucchero di canna, di cui il Brasile è uno dei primi produttori al mondo.

Le nuove tecnologie, sono dunque sempre più mirate ad ottimizzare i processi correlati alla generazione di energia in modo da ottenere:

- sistemi innovativi per lo sfruttamento di fonti alternative di energia e materie prime;
- sistemi più efficienti in grado di diminuire il consumo delle materie prime;
- una diminuzione dell'impatto ambientale dei sistemi produttivi.

Attualmente oltre l'80% delle emissioni provocate dall'uomo sono causate dall'uso di combustibili fossili; l'attività dell'uomo apporta circa 7 miliardi di ton/anno di CO₂ che si stima diventeranno di circa 12 miliardi di ton/anno nel 2020¹.

La comunità europea sta puntando fortemente a sviluppare concetti legati alla bioraffinazione, cioè a processi che partendo dalle biomasse, quali risorse rinnovabili, possano produrre:

- vettori energetici, come ad esempio i biocombustibili;
- materie prime per la chimica industriale del dopo petrolio.

Questo rappresenta il tipico approccio già visto nelle raffinazioni in cui le filiere energetiche costituiscono l'asse portante anche per la produzione di materiali.

1.1.1 Primary chemical building blocks

I *chemical building blocks* sono le molecole di base dalle quali parte e si sviluppa tutta la chimica di sintesi. Attualmente essi sono ottenuti dalla raffinazione di idrocarburi fossili (petrolio, carbone e gas naturale), ma vi è un crescente interesse verso la sintesi di tali molecole a partire da biomassa. Essi si dividono in *primary chemical building blocks* e *secondary chemical building blocks*.

I *primary chemical building blocks* sono prodotti chimici di base per la sintesi di una vasta gamma di componenti per l'industria chimica. Fenolo e cresoli, la cui produzione annua in Europa si aggira intorno alle 2,8 milioni di tonnellate, rappresentano un buon esempio di *primary chemical building blocks*.

Consultando il database Sci Finder Scholar si possono trovare più di 30000 reazioni per il fenolo e più di 17000 reazioni per i cresoli. Attualmente, questi *primary chemical building blocks* sono prodotti da

processi di raffinazione di idrocarburi fossili: il 5% della produzione mondiale proviene dal carbone (che contiene lo 0,2% di fenoli), attraverso la distillazione del catrame residuo dopo la produzione di coke, mentre il 95% della produzione mondiale di fenolo si ottiene tramite l'ossidazione di 1-metiletilbenzene (cumene), che a sua volta è prodotto dalla reazione tra benzene e propene. Questi ultimi sono prodotti tramite cracking e distillazione del petrolio greggio. Il cumene è poi trasformato in fenolo ottenendo acetone come sottoprodotto.

Il costo attuale di questi *primary chemical building blocks* è di circa 1-3 €/kg.

Oggi queste produzioni sono rese possibili dalla filiera energetica che sostiene i costi di estrazione del petrolio.

1.1.2 Secondary chemical building blocks

I *secondary chemical building blocks* sono derivati chimici di medio valore aggiunto, utilizzati come composti intermedi per la sintesi di sostanze chimiche ad alto valore.

Attualmente queste molecole sono ottenute partendo da *primary chemical building blocks*; Sci Finder Scholar riporta più di 300 reazioni per ogni molecola, per un totale di oltre 4000 reazioni.

La minore quantità di reazioni rispetto ai *primary chemical building blocks* è sintomo evidente del fatto che appartengono ad una chimica secondaria. Fanno parte di questa categoria diversi derivati fenolici di origine naturale come il tirosolo, l'idrossitirosolo, l'acido ferulico, l'acido *p*-cumarico, la catechina, l'acido gallico, l'acido caffeico, l'acido vanillico e la vanillina, tutti quanti utilizzati per la produzione di prodotti ad elevato valore aggiunto come, ad esempio, additivi alimentari e aromi, prodotti della chimica fine e polimeri.

L'acido ferulico è un ottimo esempio per confermare ciò che è stato appena detto; esso è infatti un acido carbossilico utilizzato come materiale di partenza dal quale è possibile ricavare aromi come la vanillina², prodotti per la chimica fine come farmaci non steroidei anti-infiammatori (ibuprofene e flurbiprofene³) e polimeri come il poli-

vinilfenolo, un polimero fotosensibile per applicazioni elettroniche e optoelettroniche⁴ (Figura 1-2).

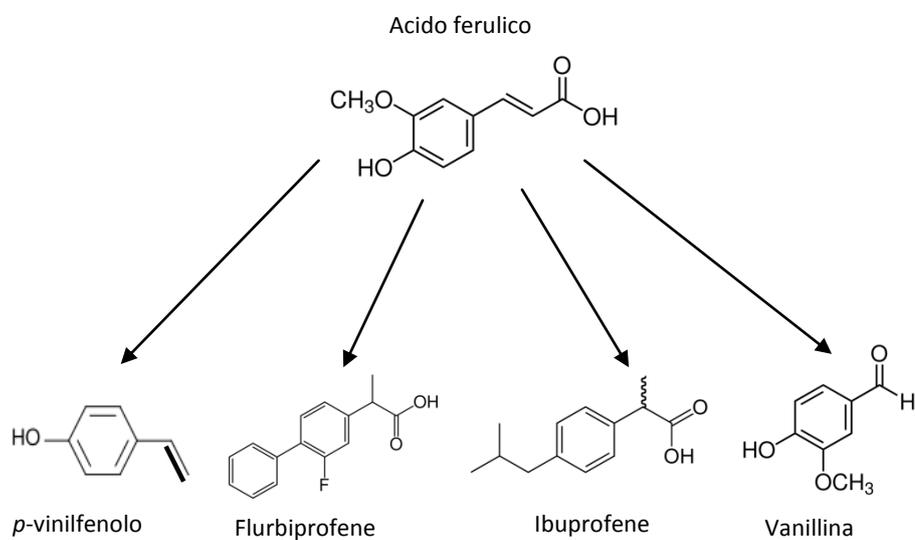


Figura 1-2: Possibili prodotti di sintesi che utilizzano acido ferulico come secondary chemical building block

Il costo attuale dei *secondary chemical building blocks* di derivazione fenolica va da 40 € / kg a 60.000 € / kg (Tabella 1).

Product name (CAS n°)	Cost €/kg	Product name (CAS n°)	Cost €/kg
Vanillin (121-33-5)	40	Gallic acid (149-91-7)	180
Vanillic acid (121-34-6)	270	Catechin (154-23-4)	6.000
Chlorogenic acid (327-97-9)	35.000	p-Coumaric acid (7400-08-0)	1.800
Caffeic acid (331-39-5)	2.300	Ferulic acid (1135-24-6)	450
Epicatechin gallate (1257-08-5)	20.000	Tyrosol (501-94-0)	8.800
Syringic acid (530-57-4)	1.600	Sinapic acid (530-59-6)	60.000

Tabella 1: costo attuale dei *secondary chemical building blocks* di derivazione fenolica (quotazioni per forniture bulk Sigma-Aldrich s.p.a)

1.1.3 Biofenoli derivanti da fonti rinnovabili come *secondary chemical building blocks*

La sintesi dei composti fenolici è uno dei tratti distintivi dei metabolismi secondari di piante superiori e felci mentre è sostanzialmente assente nei microrganismi e nel regno animale. Le biomasse vegetali derivanti dalle trasformazioni agroindustriali, che contengono il 3-8% (p/p secco) di fenoli, rappresentano una ricca fonte di *secondary chemical building blocks* al momento non sfruttata. La classe di composti fenolici contenuti in queste matrici vegetali sono essenzialmente:

- acidi fenolici;
- derivati cinnamici;
- flavonoidi;
- lignine.

Su questa base, una grande opportunità per avere *secondary chemical building blocks* da fonti a basso costo è rappresentata dai sottoprodotti del settore agroalimentare, che attualmente sono usati come materie prime

per la produzione di mangimi o smaltiti come rifiuti speciali non pericolosi. In entrambi i casi la frazione fenolica contenuta in essi rappresenta un problema in quanto:

- riduce il potere nutrizionale dei mangimi;
- ostacola la decomposizione microbiologica negli impianti di trattamento.

Viste le quantità di questi *chemicals* nelle biomasse vegetali, allora, come nel caso della produzione di coke, la rimozione del contenuto fenolico da biomasse potrebbe costituire una valida via di valorizzazione di tali matrici in un processo integrato di recupero di sostanze chimiche e di valorizzazione energetica, cioè di bioraffinazione.

Il settore agro-alimentare costituisce uno dei comparti produttivi a cui sono attribuite le più elevate produzioni di rifiuti speciali, in massima parte non pericolosi. A livello Europeo gli scarti agricoli si stimano nell'ordine di 250 milioni di tonnellate l'anno^{5,6}. I sottoprodotti del settore agroalimentare europeo rappresentano quindi una abbondante fonte di materie prime a basso costo, che non sottraggono territorio e risorse necessarie per la produzione alimentare. Questo consente di ovviare alla necessità per l'Europa di dedicare grandi superfici coltivabili per usi non alimentari a differenza di quanto succede negli Stati Uniti e in Brasile. I sottoprodotti delle più importanti filiere agro-alimentari dell'area mediterranea e centro Europa, correlati a diverse catene di produzione agro-alimentare contengono grandi quantità di specifici composti fenolici:

- acidi idrossicinamici nel settore dei cereali;
- tirosolo e idrossitirosolo nel settore della produzione dell'olio d'oliva;
- catechine dalla trasformazione dell'uva.

A livello italiano la produzione di cereali è stata nel 2004 di circa 22,1 milioni di ton, quella di vite di 9 milioni di ton e quella di olivo di 4,7 milioni di ton⁷. I residui della lavorazione dei cereali costituiscono circa 11 milioni di ton/anno su base secca di cui il 40-60% viene utilizzato come mangime per animali e per la produzione della carta in vari comparti⁸. Negli altri due comparti la quantità di scarti è di rilevante entità e portano ad una produzione di circa 0,9 milioni di tonnellate

l'anno di scarti enologici e 4 milioni di tonnellate l'anno di scarti oleari, dei quali solo il 25% viene riutilizzato.

Settore agroalimentare e tipologia di sottoprodotto	Quantità prodotta (Milioni di Ton)	Quantità e principali fenoli recuperabili (Ton)
Produzione di olio d'oliva Acque di vegetazione	4	40.000 Oleuropeina Idrossitirosolo
Sfarinati di grano duro Crusca	1,7	11.200 Acido ferulico Acido cumarico
Trasformazioni enologiche Vinacce	0,9	30.000 Catechine Antocianine

Tabella 2: quantità di sottoprodotti delle principali filiere agroalimentari Italiane e contenuto di biofenoli potenzialmente recuperabili da esse ogni anno.

La gestione e lo smaltimento di questi scarti è un problema complesso, da affrontare in chiave sociale, economica e ambientale con l'obiettivo di un uso razionale e sostenibile delle risorse.

E' quindi necessaria un'attenta politica di gestione integrata degli scarti agro-industriali indispensabile per garantire la sostenibilità dello smaltimento attraverso varie forme di recupero successive.

Al fine di massimizzare il processo di valorizzazione di tali scarti, ottenendo da un lato un corretto trattamento che abbatta il loro impatto ambientale, dall'altro un ritorno economico che renda sostenibili tali trattamenti, è necessario un approccio razionale. Data la complessità e la diversità delle matrici di partenza, generalmente trattamenti singoli risultano difficili o scarsamente sostenibili.

Un diverso approccio, basato su trattamenti sequenziali che consentano la valorizzazione delle diverse componenti della matrice vegetale, sebbene più complesso e oneroso, può consentire di massimizzare il recupero di valore aggiunto dallo scarto, ottimizzando al contempo le procedure di smaltimento. In Figura 1-3 è riportato uno schema di approccio metodologico per la valorizzazione multistadio di scarti agroindustriali.

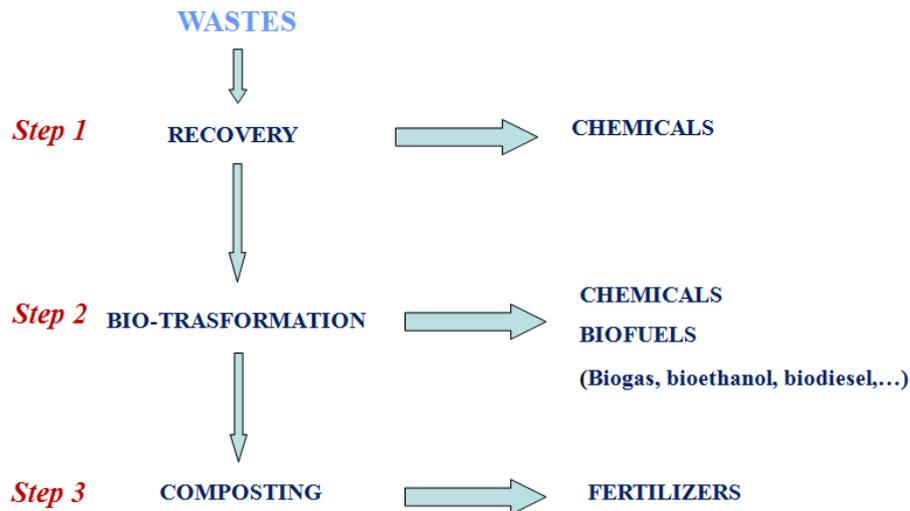


Figura 1-3: schema di approccio metodologico per la valorizzazione multistadio degli scarti agroindustriali.

Gli scarti di origine vegetale sono caratterizzati da specifici fito-composti con attività antiossidante denominati biofenoli, i quali hanno recentemente trovato un grande interesse nel mercato come prodotti antiossidanti. Le loro applicazioni nel mercato sono legate soprattutto ai prodotti per la salute dell'uomo sia come nutraceutici che come cosmeceutici e, in prospettiva, anche in campo farmaceutico.

In particolare, nel nostro caso, il pisello racchiude in sé molte proprietà biochimiche di particolare interesse cosmetico; ricco di proteine è altamente ristrutturante con un buon effetto anti-età contrastando l'azione dell'elastasi e della collagenasi, ovvero enzimi che degradano le principali proteine cellulari. Esso incrementa l'elasticità cutanea riducendo il rilassamento della pelle e il cedimento tissutale; ha un elevato contenuto di zuccheri, che aumentano l'idratazione degli strati cornei dell'epidermide riducendone la perdita di acqua, e di minerali quali ferro, potassio, magnesio e calcio che migliorano il colore e lo splendore della pelle. Ricco di β -carotene e vitamina C, ottimi antiossidanti.

Su questa base gli antiossidanti naturali rappresentano un mercato in crescita per lo sviluppo di prodotti *environmetal friendly* ovvero prodotti in grado di infliggere un danno minimo o nullo sull'ambiente.

Un efficiente processo di valorizzazione integrata degli scarti agro-industriali dovrebbe prevedere quindi anche uno stadio atto a recuperare selettivamente i biofenoli dalla matrice vegetale come *chemicals* ad alto valore aggiunto.

Il recupero dei biofenoli è anche propedeutico ai successivi stadi fermentativi di trattamento della biomassa per la produzione di *biofuels*. I processi di biotrasformazione microbica infatti sono generalmente inibiti dalla presenza di polifenoli ed in particolare i batteri acetogenici e metanogenici sono sensibili a concentrazioni di acido caffeico $> 0,25$ g/l e di acido *p*-cumarico >0.12 g/l. Queste caratteristiche anti-microbiche abbinate ad una nota fito-tossicità complica lo smaltimento di tali scarti che, quindi, costituiscono un costo per le diverse realtà produttive.

1.2 La parete cellulare vegetale

1.2.1 Funzioni

Le cellule vegetali sono cellule eucariote caratterizzate dalla presenza di una parete cellulare, assente invece in quelle animali, anch'esse eucariote.

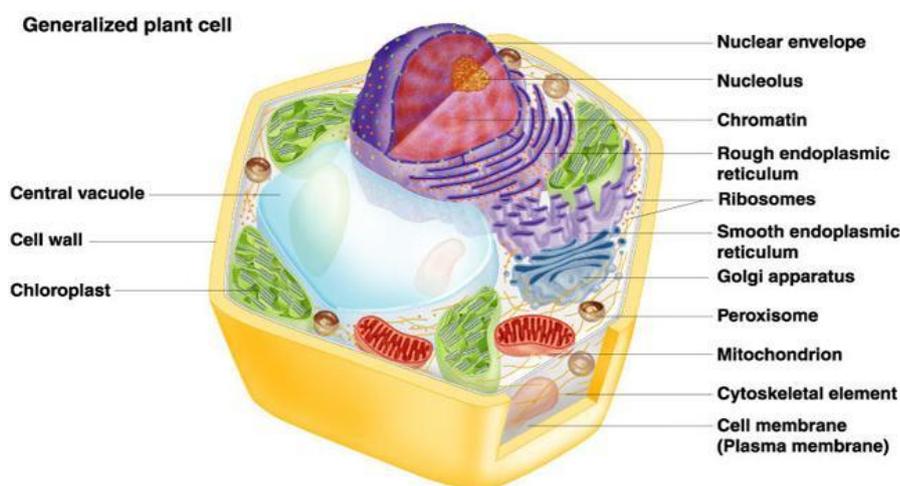


Figura 1-4: rappresentazione di una cellula vegetale vista in sezione⁹.

La parete cellulare è un organulo proprio della cellula vegetale che si sviluppa attorno alla membrana cellulare (plasma membrana) e costituisce l'involucro esterno della cellula (Figura 1-5). Essa ricopre numerose funzioni, prima tra tutte quella di agire come barriera fisica tra il contenuto della cellula e l'ambiente esterno.

Le funzioni principali della parete cellulare sono:

- conferire alla cellula rigidità e una determinata forma;
- fungere da supporto strutturale e meccanico;
- regolare la diffusione di materiale attraverso la cellula;
- proteggere da agenti patogeni, mediante il rilascio di metaboliti che ne inibiscono la crescita, ed in generale contro l'ambiente circostante;
- controbilanciare la pressione interna della cellula;
- permettere l'interazione tra cellula e cellula.

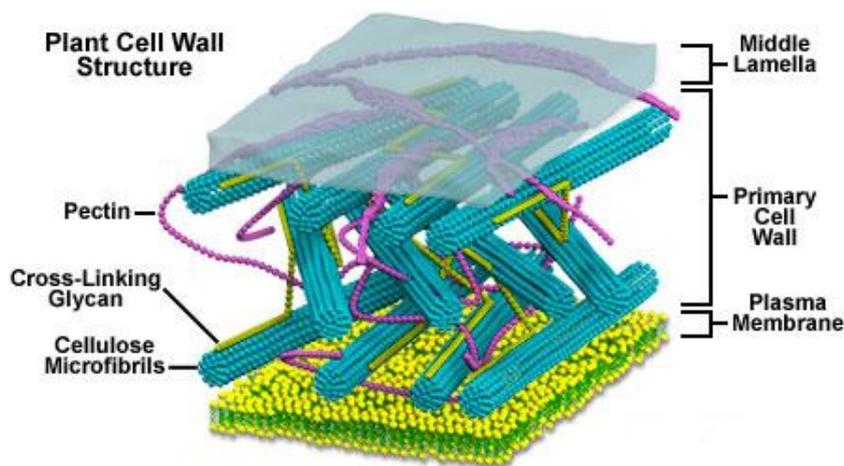


Figura 1-5: Rappresentazione schematica della struttura della parete cellulare vegetale¹⁰.

1.2.2 Costituenti polissaccaridici

La parete cellulare ha una struttura molto complessa che cambia durante la crescita della cellula. Le cellule giovani presentano una parete sottile e flessibile al contrario di quelle adulte in cui essa è più robusta.

La parete delle cellule vegetali è costituita principalmente da polisaccaridi e in misura minore da glicoproteine, esteri fenolici (acido

ferulico e cumarico), minerali ed enzimi. I principali polisaccaridi che costituiscono la parete cellulare sono cellulosa, emicellulose e pectine.

La cellulosa è un polimero lineare costituito da unità di D-glucosio legate tra loro tramite legami β -1,4 glicosidici; è la sostanza fondamentale della componente fibrillare delle pareti, è organizzata in micro fibrille di circa 5-10 nm di diametro formate da 36 catene di cellulosa sfalsate tra loro ed orientate nella stessa direzione; questo polisaccaride ha principalmente il ruolo di materiale strutturale che conferisce forza e rigidità alle piante.

Le emicellulose sono un gruppo di polisaccaridi ramificati di varia struttura, omologhi alla cellulosa in quanto possiedono una catena principale costituita per la maggior parte da zuccheri esosi (glucosio, mannosio e galattosio) e pentosi (arabinosio e xilosio) policondensati in modo analogo al glucosio nella cellulosa, ovvero mediante legami β -1,4. Tre sono i principali tipi di emicellulosa: xiloglucani, glucuronoarabinosilani e β -glucani a legami misto. Gli xiloglucani sono molecole costituite da uno scheletro lineare di β -1,4-glucani con corte ramificazioni laterali. Gli glucuronoarabinosilani sono catene polisaccaridiche composte da uno scheletro di β -1,4-xilosio.

I β -glucani a legame misto hanno uno scheletro simile agli xiloglucani ma differiscono da questi per la presenza di legami 1,3 oltre che 1,4.

Comunque la composizione chimica delle emicellulose varia con la crescita e la maturazione della pianta e dipende dalle condizioni ambientali.

Le pectine sono una famiglia di polisaccaridi complessi ad elevato peso molecolare (tra i 20 e i 400 KDa) e di natura acida, che contribuiscono largamente alla formazione dei tessuti dei frutti e delle parti vegetali eduli; sono principalmente costituite da acido galatturonico e da un numero variabile di residui di ramnosio all'interno dello scheletro stesso della molecola. Esistono due principali categorie di pectine: omogalatturonani e ramnogalatturonani I.

Le sostanze pectiche ed emicellulosiche sono prodotte nell'apparato di Golgi ed in seguito inglobate in vescicole, le quali ne permettono la migrazione attraverso la plasma membrana dove vengono rilasciate e integrate in una membrana pre-esistente; la cellulosa viene invece sintetizzata direttamente nella plasma membrana.

La composizione della parete cellulare vegetale e la sua struttura varia nel corso della vita della cellula e varia significativamente anche da cellula a cellula nonché all'interno di una stessa specie vegetale. Inoltre, nonostante si conoscano i costituenti delle pareti cellulari e si possa dire in che percentuali questi sono presenti, è ancora in discussione come questi composti siano interconnessi tra loro, quindi non si conosce ancora nel dettaglio e con certezza la precisa configurazione di queste complesse strutture vegetali.

1.2.3 Costituenti non polisaccaridici

Le glicoproteine non enzimatiche sono un componente minoritario della parete cellulare vegetale e generalmente non superano il 10% del peso secco della parete cellulare primaria. Esse sono state per lungo tempo considerate poco più che strutture addizionali e di rinforzo della parete cellulare vegetale. Le interconnessioni tra proteine e polisaccaridi infatti rinforzano le interazioni tra i polimeri che costituiscono la parete cellulare. Recentemente tuttavia il ruolo meramente strutturale delle glicoproteine non enzimatiche di membrana è stato ampiamente rivalutato. Tali strutture sembrano essere infatti coinvolte in diversi importantissimi processi del metabolismo e della crescita della cellula vegetale. Alcune proteine, come ad esempio l'estensina, sono coinvolte nei meccanismi di assemblaggio e di crescita della parete cellulare, altre proteine ricche in prolina sono invece coinvolte nei meccanismi di difesa innescati dalle aggressioni di patogeni. Queste ed altre complesse funzioni, la maggior parte delle quali ancora da chiarire, ricoperte dalle proteine della parete cellulare dimostrano che il loro ruolo non è esclusivamente strutturale ma consiste anche nell'interconnettere le diverse strutture cellulari, funzione essenziale per il recepimento dei segnali che arrivano alla cellula dall'ambiente esterno¹¹.

Un altro costituente non polisaccaridico della parete cellulare vegetale è la lignina, un polimero fenolico estremamente resistente presente in piante legnose e non, associato strettamente alla parete cellulare. La lignina è il secondo più abbondante composto organico naturale dopo la cellulosa ed è sintetizzata dai vegetali a partire da monomeri di alcoli

fenolici (*para*-cumaroil, coniferil e sinapil alcoli) tramite deidrogenazione mediata da perossidasi. Le principali funzioni della lignina sono quelle di conferire resistenza meccanica e chimica per proteggere la pianta dalle aggressioni dei patogeni, e di mantenimento del giusto grado di idratazione viste le proprietà di impermeabilizzante.

1.2.4 Monocotiledoni e dicotiledoni

I vegetali possono essere suddivisi in due grandi famiglie, che si differenziano per la composizione della parete cellulare: le monocotiledoni e le dicotiledoni.

Una tipica cellula di monocotiledone (Figura 1-6) possiede una parete cellulare costituita al 25% da cellulosa, al 55% da emicellulosa e da solo un 10% di pectina.

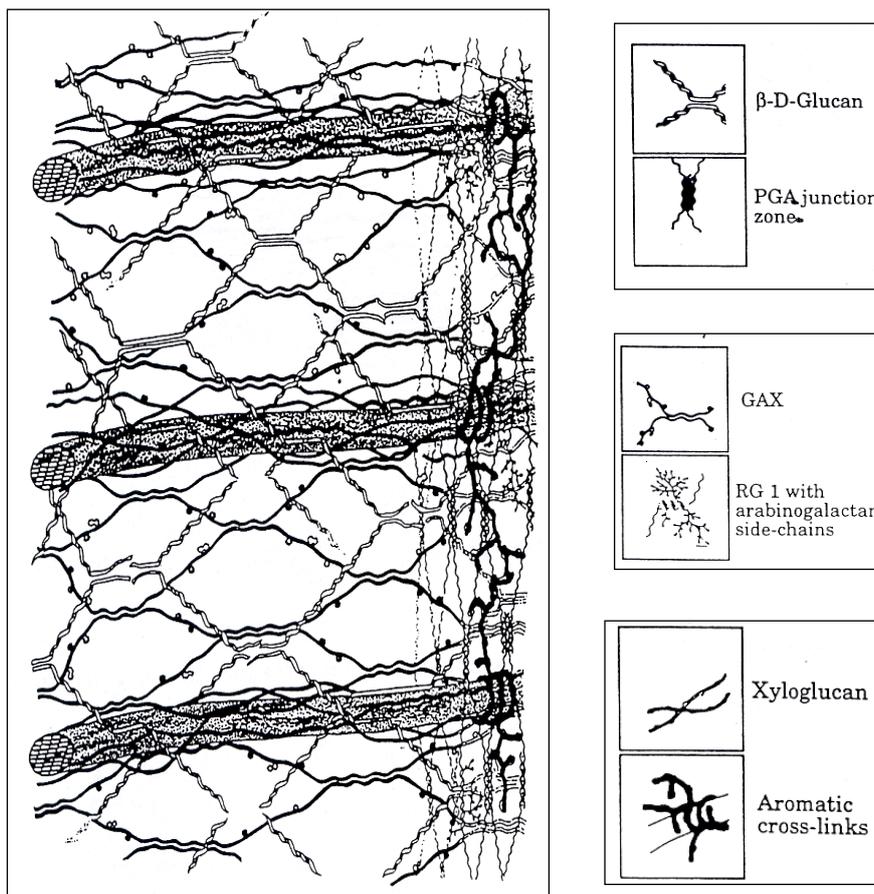


Figura 1-6: Rappresentazione schematica di una parete cellulare di monocotiledone¹²

Alcune tra le piante più importanti da un punto di vista economico appartenenti alle monocotiledoni sono grano, frumento, mais, riso, bamboo, cipolla e aglio.

Prendendo in considerazione la famiglia dei cereali, la frazione polisaccaridica principale delle loro pareti cellulari è costituita da arabinoxilani. Gli arabinoxilani consistono in una catena polisaccaridica principale, la cui unità monomerica è xilano (legami β -1,4), alla quale sono legati lateralmente residui di α -L-arabinofuranosio via legami α -(1,3) e/o α -(1,2).

Una tipica cellula di dicotiledone (Figura 1-7) possiede invece una parete cellulare costituita al 30% da cellulosa, al 30% da emicellulosa, al 35% di pectina e da un 1-5% di proteine strutturali.

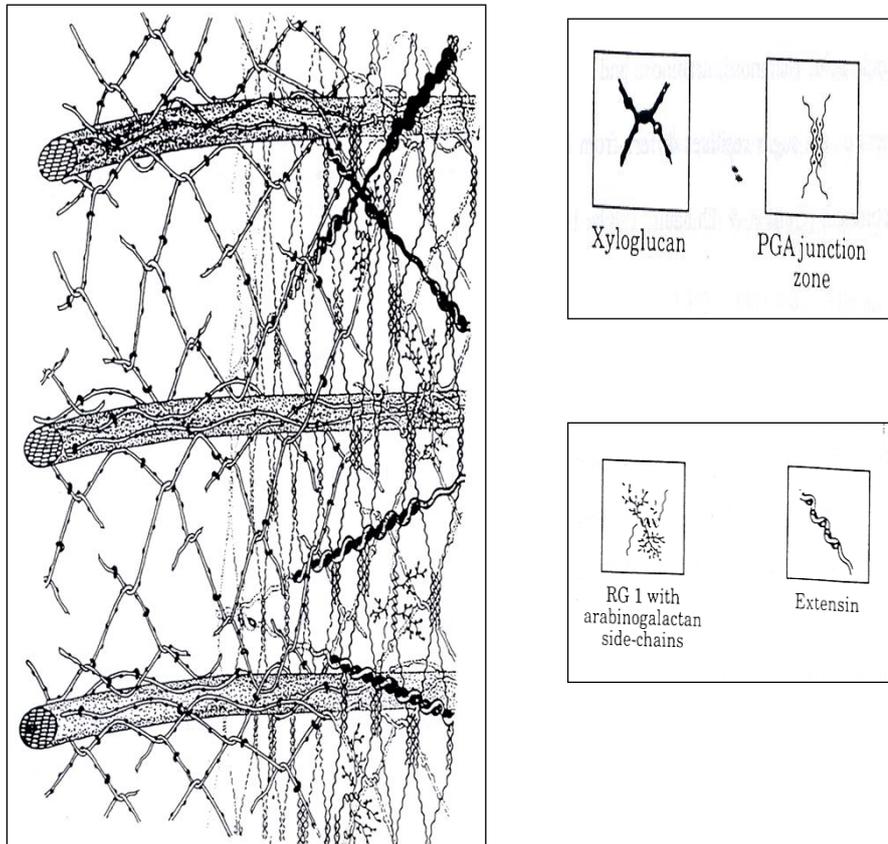


Figura 1-7: Rappresentazione schematica di una parete cellulare di dicotiledone

Fanno parte di questa famiglia il pisello, il pesco, l'albicocco, il ciliegio, il pero, il melo e il pomodoro.

Prendendo in considerazione il pisello (*Pisum Sativum* L.), la principale frazione polisaccaridica della parete cellulare dipende dal tipo di seme: se il seme è liscio, è presente prevalentemente l'amido, mentre, se il seme è rugoso, più della metà dei carboidrati di riserva è amido mentre il resto sono zuccheri semplici solubili, la cui presenza fa sì che i semi restino dolci e teneri a lungo, durante la maturazione.

Si conosce ancora poco sull'organizzazione e l'interazione fra i vari costituenti delle pareti cellulari vegetali. Sono stati proposti vari modelli di assemblaggio e interazione tra le diverse strutture macromolecolari delle pareti cellulari. Un modello di organizzazione dei polisaccaridi nella parete cellulare di una pianta dicotiledone è stato proposto da Jean-Paul Vincken *et al.*¹³ 2004 (Figura 1-8). Questo modello ipotizza che le catene di cellulosa siano legate tra loro con legami a idrogeno formando un materiale cristallino insolubile e anelastico. Le fibre di cellulosa dovrebbero poi essere interconnesse a loro volta con legami idrogeno a macromolecole emicellulosiche, incluse in una matrice complessa costituita da pectina.

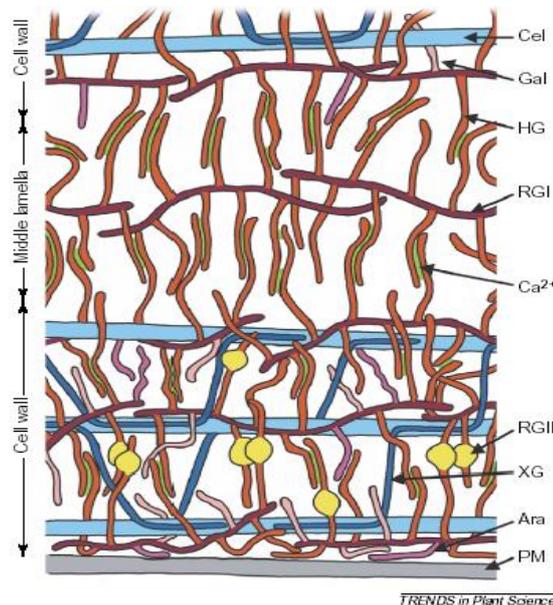


Figura 1-8: Rappresentazione del modello di organizzazione dei polisaccaridi all'interno di una parete cellulare di una cellula dicotiledone, proposto da Jean-Paul Vincken. (PM=plasma membrana; Ara=Arabinani; XG=xiloglucano; RGII=ramnogalatturonano II; RGI=ramnogalatturonano I; HG=omogalatturonano; Gal=galattani; Cel=cellulosa)

1.3 Pisello (*Pisum sativum* L.)

Il pisello (*Pisum Sativum* L.), è un legume che appartiene alla famiglia delle *papilionacee*, largamente coltivato in tutta l' Europa centrale e in quella meridionale; l'Italia è uno dei principali produttori, con una produzione di circa 2.700.000 quintali all'anno e una superficie coltivata di circa 4.000 ettari¹⁴.

La pianta del pisello¹⁵ è un'erba annua, nana o rampicante, caratterizzata da un apparato radicale fittonante e un fusto esile di altezza variabile tra i 50 e 200 cm; il suo portamento è rampicante e, con il crescere dell'altezza, in assenza di sostegni adeguati, tende ad essere prostrato.

Le foglie sono paripennate, ovvero composte da altre piccole foglioline ai lati della rachide centrale, e, alla loro base, in corrispondenza del nodo, hanno delle particolari stipule, formazioni allargate che avvolgono il fusto a guisa di corona, mentre, nella parte terminale del fusto, sono mutate in "cirri", elementi filiformi arrotolati che permettono alla pianta di aggrapparsi ai vari sostegni.

I fiori sono singoli o accoppiati a corona, all'ascella della foglia, bianchi gialli o verdastri.

I frutti sono i cosiddetti baccelli, di forma appiattita, leggermente incurvata che assumono solitamente un colore giallo o verde e contenenti un numero di semi variabile tra 3 e 12, in grado di aprirsi spontaneamente a maturazione.

I semi costituiscono la parte tipicamente commestibile della pianta e possono assumere forma, colore e aspetto (liscio o rugoso) diverso a seconda della varietà.

La struttura del seme è riportata in Figura 1-9; in esso sono riconoscibili tre parti: asse embrionale, il tessuto nutritivo o parenchima e i tegumenti.

L'asse embrionale (*embryonic axis*) riproduce la struttura della futura pianta adulta e, in esso, sono riconoscibili un abbozzo del futuro fusto, uno della radice e le foglie embrionali o cotiledoni.

Il tessuto nutritivo (*storage cotyledons*) è rappresentato dall'endosperma o albume carico di sostanze di riserva; esso contiene glucidi, lipidi e proteine. Nei semi maturi tali sostanze vengono accumulate nelle foglie cotiledonari che si ingrossano fino a sostituire l'endosperma.

I tegumenti, che prendono il nome di testa (seed coat), circondano e proteggono le parti vitali del seme dall'azione immediata degli agenti esterni e garantiscono ad esso una fase di dormienza prima della germinazione in modo tale che questa avvenga nelle condizioni ambientali più favorevoli.

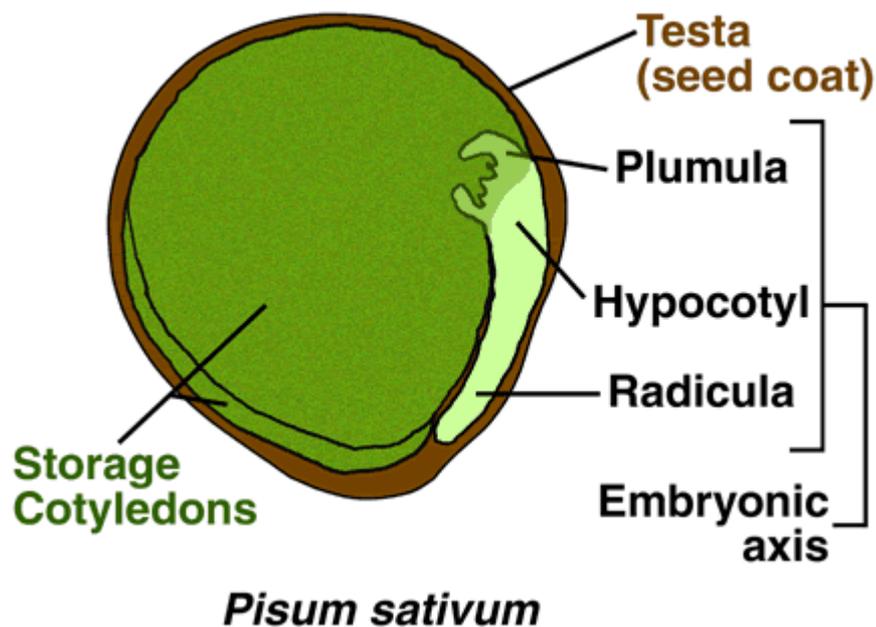


Figura 1-9: Struttura del seme del *Pisum sativum* L.

Tre sono le tipologie principali di *Pisum Sativum* L., classificate in base all'altezza della pianta:

- varietà nana (fino a 50 cm);
- varietà mezzarama (fino a 120 cm);
- varietà rampicante (fino a 200 cm e più).

Il *Pisum Sativum* L. è un legume avente una composizione nutrizionale molto interessante in quanto è ricco di carboidrati, proteine, vitamine e sali minerali (Figura 1-10)¹⁶.

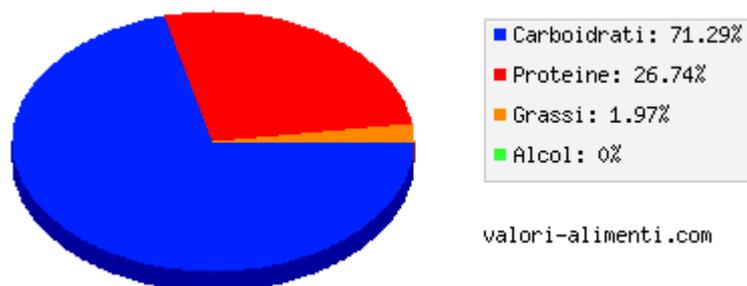


Figura 1-10: quantità riferite a 100g di prodotto di Pisum Sativum L. fresco

Il pisello è un ortaggio dal sapore particolarmente dolce a causa dell'elevato contenuto di carboidrati (71.29% in 100 g di sostanza secca). La quantità di zuccheri presenti varia con il grado di maturazione del legume: in linea generale si registra un tasso massimo e un elevato contenuto di acqua nel seme immaturo, un tasso minimo e una scarsa quantità di acqua nel seme ultramaturo. Tra i carboidrati contenuti nel pisello, il saccarosio, il fruttosio e il glucosio presentano concentrazioni diverse in funzione del grado di maturazione del seme: infatti, il fruttosio ed il glucosio hanno la massima concentrazione nel pisello immaturo, diminuendo in quello maturo per poi scomparire totalmente, come nel caso del fruttosio, nel pisello ultra maturo. Il livello di concentrazione del saccarosio, invece, aumenta notevolmente durante la maturazione del pisello fino a giungere ad un valore costante nel pisello ultra maturo.

Tra i carboidrati vengono incluse anche le fibre solubili (pectine, gomma etc.) presenti in quantità elevate infatti rappresentano circa il 4-6% del peso totale del legume.

I piselli hanno un buon contenuto di proteine (20-25% sulla sostanza secca) con elevata solubilità e degradabilità, che lo rendono, rispetto ad altri ortaggi, più equilibrato da un punto di vista nutrizionale nel rapporto energia/proteine; questo implica un elevato contenuto di amminoacidi al punto di essere i vegetali che ne sono più ricchi, anche se risultano carenti solo di amminoacidi solforati ovvero di metionina e cisteina.

I semi sono ricchi di vitamine A, C, E e tutte le vitamine del gruppo B (esclusa la B12) e di sali minerali in particolare potassio, calcio, magnesio e fosforo.

Tale composizione nutrizionale può però variare nel momento in cui l'ortaggio viene sottoposto a trattamenti come, ad esempio, la cottura¹⁷.

Questo procedimento distrugge infatti le vitamine termolabili, cioè sensibili al calore, in particolare la vitamina C e quelle del gruppo B, alcuni amminoacidi essenziali ed, infine, provoca la dispersione di alcune vitamine e sali minerali nell'acqua di cottura. Le perdite principali sono riportati in Tabella 3:

Vitamina Matrice	A	B1	B2	PP	C
Pisello	20%	25%	15%	15%	40%

Tabella 3: Perdite medie percentuali di alcune vitamine in seguito a cottura

Per quanto riguarda le proteine è da tener presente che le albumine sono solubili in acqua fredda, mentre in acqua calda coagulano.

La cottura ha anche degli effetti sul colore¹⁸: il *Pisum Sativum* L. fresco si presenta generalmente colorato nelle diverse tonalità di verde, colore attribuibile alla presenza di clorofilla, soprattutto clorofilla *a* e clorofilla *b* in rapporto 3:1, pigmenti non solubili in acqua come dimostra la leggera colorazione verde acquisita dall'acqua durante la cottura; entrambe le clorofille sono costituite da quattro anelli pirrolici legati tra di loro e dalla presenza di un atomo di magnesio collegato al resto della molecola per mezzo di un legame coniugato. La differenza tra le due clorofille è legata alla tipologia di gruppo sostituito legato all'atomo di carbonio C-3: infatti, nella clorofilla *a* (Figura 1-11 a), è presente un gruppo metilico (-CH₃), mentre, nella clorofilla *b* (Figura 1-11 b), è presente un gruppo formilico (-CHO).

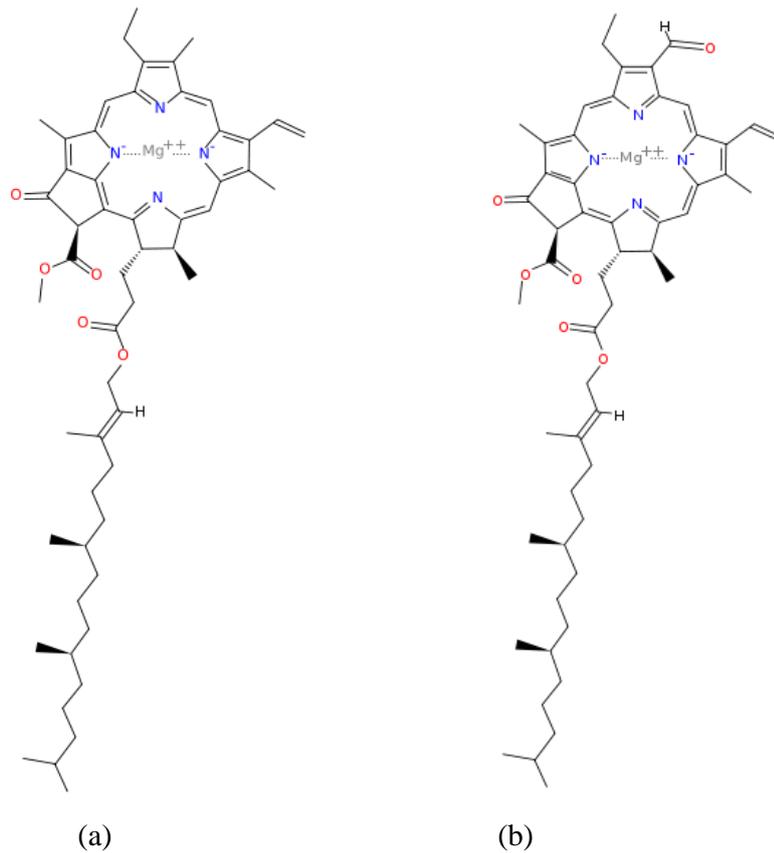


Figura 1-11: (a) struttura clorofilla *a*; (b) struttura clorofilla *b*.

Entrambe le molecole sono altamente stabili in alcali deboli, ma sono facilmente attaccabili dagli acidi, anche deboli, i quali provocano la sostituzione dell'atomo di magnesio con un atomo di idrogeno creando come residuo una sostanza color bruno-oliva definita feofitina (Figura 1-12).

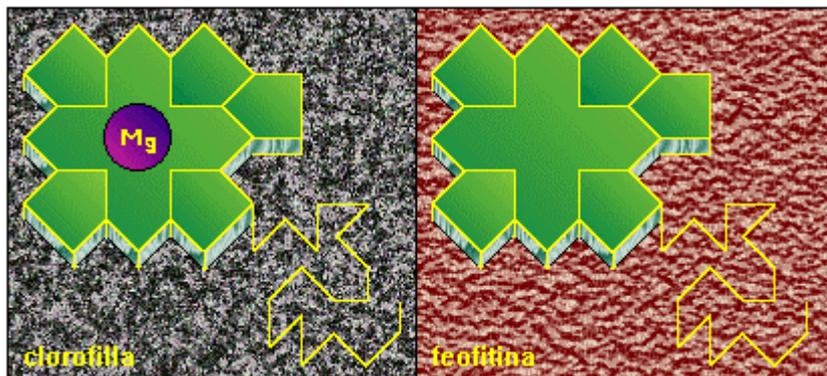


Figura 1-12: differenza strutturale clorofilla/feofitina

E' importante osservare che in natura i tessuti delle piante verdi sono a pH acido e, nonostante ciò, la molecola della clorofilla rimane intatta questo è possibile perché la clorofilla è, in situ, legata alla lipoproteine, che, in un certo qual modo la proteggono dall'azione dell'acido; durante il processo di cottura però le proteine tendono a coagulare e di conseguenza, la clorofilla si trova più esposta all'azione degli acidi.

1.4 Baccello

Il frutto del pisello è il baccello ovvero un rivestimento esterno di forma appiattita in grado di contenere da 3 a 12 semi, ricco di proteine, zuccheri, vitamine, sali minerali, ferro, fosforo e potassio. Esso agisce come protettore esterno per lo sviluppo dei semi e come serbatoio temporaneo per soluti mobilitati da parti vegetative di semi.

Il baccello è costituito da tre strati: esocarpo, mesocarpo ed endocarpo¹⁹.

L'esocarpo comprende un'epidermide esterna (Figura 1-13 A e D) di cellule cutinizzate contenenti pochi cloroplasti.

Il mesocarpo comprende i tessuti contenuti tra l'endocarpo e l'esocarpo e costituisce la parte intermedia del frutto, comunemente chiamata "polpa"; è formato da 15/20 strati di parenchima (figura 1.13 A) caratterizzati da un elevato contenuto di cloroplasti, organuli presenti nelle cellule vegetali all'interno dei quali si svolge il processo della fotosintesi ovvero dove l'energia luminosa viene catturata dai pigmenti di clorofilla e viene convertita in energia chimica. Nel mesocarpo si può notare un elevato grado di vacuolizzazione il che suggerisce che le elevate riserve di soluto del baccello possono concentrarsi in questa zona; inoltre, nelle zone ultraperiferiche di tale strato si riscontra un'elevata densità di cloroplasti mentre, in quelle più interne, si nota un'elevata densità di amido.

L'endocarpo è la porzione più interna del frutto ovvero quella che racchiude il seme ed è a sua volta formato da tre componenti: un'epidermide interna ricca di cloroplasti (quantità comunque minore rispetto a quella del mesocarpo), un'epidermide nella regione mediana di due o tre strati sottili di parenchima e, infine, uno strato interno di sclerenchima (figura 1.13 A). L'epidermide interna, a differenza di tutti

gli altri, non presenta stomi ma cellule con cuticole sottili e con contorno esterno arrotondato (figura 1.13 C e E).

Il baccello possiede un sistema molto rado di spazi d'aria, gli unici si trovano nel mesocarpo adiacenti agli stomi (figura 1.13 B).

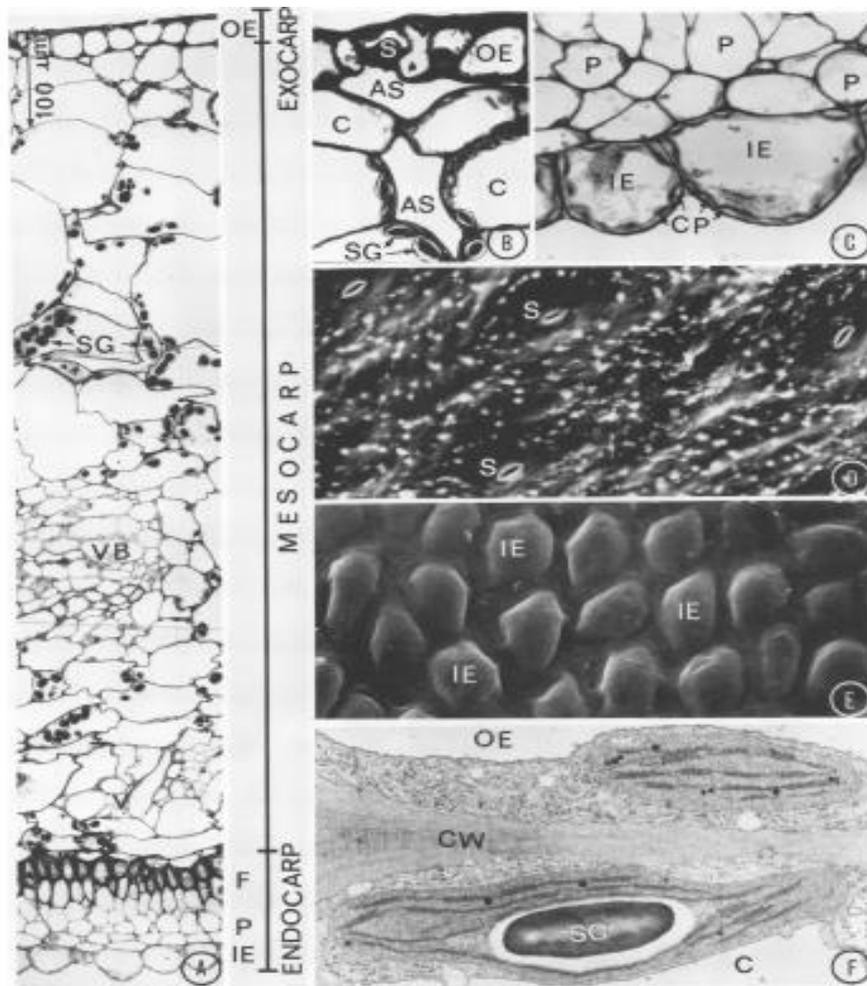


Figura 1-13: Caratteristiche strutturali del baccello di *P. sativum*. L. A: divisione strutturale del baccello; B: esocarpo e mesocarpo; C: strato interno dell'endocarpo; D: scansione al microscopio elettronico della superficie dell'epidermide esterno; E: scansione al microscopio elettronico della superficie dell'epidermide interna. AS: spazi d'aria; C: clenchima del mesocarpo; CP: cloroplasti; CW: parete cellulare; F: strato di fibre; IE: epidermide interno; OE: epidermide esterno; P: parenchima, endocarpo; S: stoma; SG: amido di cereali; V: termine dei fasci vascolari proiettati verso l'interno; VB: fasci vascolari.

Il baccello è di colore verde luminoso, ciò è dovuto al ruolo significativo che svolge nella fissazione foto sintetica della CO_2 . In particolare, tale attività è correlata agli scambi di CO_2 tra l'atmosfera interna ed esterna, all'attività respiratoria dei semi e del baccello e alle esigenze di

quest'ultimi di accumulare carbonio nella materia secca. Esso è composto da due strati fotosintetici distinti: uno esterno ed uno interno; il primo comprende la clorenchima del mesocarpo ed è strutturalmente ed enzimaticamente organizzato per catturare CO₂ dall'atmosfera esterna mediante gli stomi dell'epidermide esterna.

Lo strato interno, invece, è in grado di assimilare una frazione maggiore di anidride carbonica .

L'alta densità dei cloroplasti, l'assenza di stomi, la cuticola sottile ed il contorno delle cellule a forma di cupola sono fattori positivi per la foto assimilazione di CO₂.

Per quanto riguarda la composizione nutrizionale sono matrici vegetali ricche di proteine, zuccheri, vitamine, sali minerali, ferro, fosforo, potassio e sono una ricca fonte di composti bioattivi come gli antiossidanti fenolici; le proantocianidine, ovvero tannini condensati, sono i composti fenolici predominanti nel frutto e hanno il compito di difendere i semi da una possibile ossidazione provocata da fattori ambientali come la luce, l'ossigeno, radicali liberi e ioni metallici. Recenti studi²⁰ hanno dimostrato che la somma degli acidi fenolici, sia quelli ottenuti dall'idrolisi degli esteri che quelli ottenuti dall'idrolisi dei glicosidi, è abbastanza elevata (78.53 µg/g sostanza secca) e, in particolare, nel tegumento colorato predominano: acido gentisico, acido protocatecuico, acido siringico e acido vanillico (Tabella 4).

Acidi Fenolici	Liberi	Legame estereo	Legame glicosidico
Benzoico			
Protocatecuico	13.29	2.42	15.72
Gentisico	24.93	8.44	n.d.
Vanillico	5.44	1.13	n.d.
Siringico	0.54	1.75	n.d.
Cinnamico			
Caffeico	0.55	n.d.	n.d.
Ferulico	0.40	0.94	n.d.
p-Cumarico	0.81	0.83	n.d.
o-Cumarico	0.40	0.94	n.d.
Totale	46.36	16.45	15.72

Tabella 4: concentrazione di acidi fenolici ($\mu\text{g/g}$ d.m.) del rivestimento del *Pisum Sativum* L. (n.d. = al di sotto del limite di rilevazione)

I polisaccaridi presenti nella parete cellulare del baccello sono stati ricavati mediante un'estrazione sequenziale di diverse frazioni (S1, S2, S3, S4, S5, RES) ottenendo le composizioni riportate in tabella (Tabella 5)²¹.

	Yield (g/100 g CWM)	Monomeric composition (mg/g dry matter)								Total
		Rham	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glu	UA	
S1	5.8	nd	nd	0.3±0.1 ^a	nd	nd	2.1±0.3 ^d	0.6±0.2 ^a	19.0±0.6 ^f	22.0 ^g
S2	4.9	nd	nd	0.5±0.2 ^a	0.5±0.1 ^a	nd	1.5±0.1 ^c	0.4±0.1 ^a	9.9±0.5 ^e	12.8 ^h
S3	8	nd	nd	0.6±0.2 ^a	30.5±0.7 ^d	nd	0.4±0.1 ^a	12.4±0.5 ^e	2.4±0.4 ^a	46.3 ^d
S4	6.7	nd	0.2±0.1 ^a	0.5±0.2 ^a	21.1±0.5 ^c	0.4±0.1 ^a	1.1±0.1 ^b	3.8±0.3 ^b	1.6±0.4 ^a	28.7 ^e
S5	2.7	0.2±0.0 ^a	nd	1.3±0.2 ^b	10.5±0.3 ^b	nd	1.8±0.1 ^d	3.2±0.2 ^b	5.6±0.3 ^b	22.6 ^b
RES	71	2.3±0.3 ^b	0.1±0.0 ^a	2.7±0.2 ^c	82.3±0.9 ^a	1.6±0.2 ^b	5.0±0.3 ^a	163.9±1.5 ^d	12.0±0.9 ^d	269.9 ^a
Σ Frac	99.1	2.5	0.3	5.9	144.9	2.0	11.9	184.3	50.5	

Tabella 5: S1: frazione estratta con CDTA-ammonio ossalato. S2: frazione estratta con NaOH 0.05 M. S3: frazione estratta con KOH 1M. S4: frazione estratta con KOH 4M. S5: frazione estratta con NaOCl₂/acido acetico. RES: residuo dell'estrazione sequenziale ricco di cellulosa. Σ Frac: somma di S1, S2, S3, S4, S5 e RES. Nd: non rilevato. Le sigle indicano: Rham: ramnosio, Fuc: fruttosio, Ara: arabinosio, Xyl: xilosio, Man: mannosio, Gal: galattosio, Glu: glucosio, UA: acidi uronici.

L'isolamento dei polisaccaridi dalla parete cellulare del frutto del *Pisum Sativum* L. permette di ottenere tre estratti ricchi di pectina, due contenenti complessi pectina-emicellulosa e un residuo ricco di cellulosa.

1.5 Biocatalizzatori industriali per l'idrolisi di matrici vegetali

I biocatalizzatori enzimatici sono sempre più utilizzati in ambito industriale, in particolare nei settori chimico-farmaceutico e delle trasformazioni agroalimentari. Essi risultano infatti molto interessanti per la loro intrinseca regio e stereo-selettività, nonché per il loro potenziale come efficienti catalizzatori per la chimica verde. Inoltre l'impiego di biocatalizzatori permette di effettuare processi ad elevata efficienza in ambiente acquoso e in condizioni operative (pH, temperatura, pressione etc.) generalmente blande.

Il settore delle trasformazioni alimentari fa largo uso di preparati enzimatici come additivi tecnologici. Le lipasi, libere o immobilizzate, vengono impiegate nelle trasformazioni di acidi grassi²², le proteasi per la trasformazione delle carni²³ e la vastissima classe delle carboidrasi viene sfruttata in moltissimi settori ad esempio per la produzione di succhi e puree e prodotti da forno.

Questi prodotti enzimatici commerciali derivano principalmente da fermentazioni di funghi, lieviti e batteri, che utilizzano questi biocatalizzatori per "aggredire" tessuti vegetali o animali al fine di procurarsi i substrati di crescita di cui necessitano per il proprio sostentamento.

In questa prospettiva la continua sfida tra microrganismi e piante, tra sistemi di aggressione e di difesa, ha fatto sì che un amplissima gamma di enzimi sia stata selezionata dall'evoluzione ed oggi possa venire impiegata dall'uomo in specifici processi tecnologici. Le pareti delle cellule vegetali sono infatti la prima difesa incontrata dagli agenti patogeni durante l'aggressione della pianta. Queste strutture devono essere degradate per consentire la penetrazione e la colonizzazione da parte dei patogeni a spese dei nutrienti contenuti nella pianta stessa. Le

varie strutture polimeriche che costituiscono il tessuto vegetale sono i principali substrati per numerosi enzimi secreti dai microrganismi patogeni, fornendo esse stesse importanti elementi nutritivi.

1.5.1 Cellulasi²⁴

Le cellulasi (EC:3.2.1.4.) sono una famiglia di enzimi prodotti principalmente da funghi, batteri e protozoi che appartengono alla famiglia delle idrolasi e che catalizzano l'idrolisi del legame β 1-4 glucosidico delle fibre di cellulosa. Esse sono ampiamente utilizzate nelle industrie tessili e della produzione della pasta di cellulosa in cartiere. Sono ottenute prettamente da funghi e muffe delle specie *Pleorotus*, *Aspergillus* e *Trichoderma*.

Le cellulasi si dividono in tre classi principali:

- Endocellulasi (12-50 KDa), in grado aggredire la struttura della cellulosa in posizioni “centrali” della catena polisaccaridica, abbassando sensibilmente il peso molecolare medio delle catene;
- Esocellulasi (42-60 KDa), enzimi che attaccano le catene polisaccaridiche in posizione terminale liberando sequenzialmente oligomeri di glucosio a basso peso molecolare (cellobiosio);
- Cellobiasi o β -glucosidasi (35-218 KDa), in grado di idrolizzare il cellobiosio nei suoi monomeri di glucosio.

L'azione delle β -glucosidasi è estremamente importante ai fini industriali in quanto le cellulasi, come tutte le carboidrasi, soffrono di inibizione competitiva da prodotto soprattutto a causa di oligomeri a basso peso molecolare. La presenza di β -glucosidasi che rimuovono il cellobiosio idrolizzandolo, consente di migliorare le performance idrolitiche dei trattamenti a base di cellulasi.

1.5.2 Emicellulasi²⁵

Le emicellulasi sono una grande categoria di enzimi in grado di idrolizzare i legami glucosidici delle diverse strutture polisaccaridiche che compongono le emicellulose. La grande complessità e diversità delle emicellulose presenti in natura si rispecchia anche nei biocatalizzatori naturalmente selezionati per l'idrolisi di tali strutture, genericamente classificati come EC 3.2.1.X.. Le emicellulasi idrolizzano polisaccaridi ramificati di varia struttura, costituiti da una catena principale di zuccheri esosi (glucosio, mannosio e galattosio) e pentosi (arabinosio e xilosio) policondensati mediante legami β -1,4. Le emicellulose presenti in maggiore quantità nelle pareti cellulari vegetali sono gli xilani, i mannani, gli arabani e i galattani rispettivamente idrolizzati da xilanasi (EC:3.2.1.8.), mannanasi (EC:3.2.1.78), arabinasi (EC:3.2.1.99.) e galatturonasi (EC:3.2.1.15.).

In particolare, le xilanasi idrolizzano gli xilani con formazione di xilosio o xilo-oligosaccaridi di diverse dimensioni.

Questi enzimi sono generalmente prodotti da funghi e batteri (*Trichoderma*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureobasidium* e *Talaromyces sp.*) e sono estremamente importanti in diverse applicazioni industriali quali la sbianca di paste di cellulosa, la chiarificazione di succhi di frutta se usate in combinazione con cellulasi e pectinasi, il recupero di zuccheri fermentescibili da emicellulose²⁶. Sono inoltre impiegate nel settore alimentare, tessile e nella produzione di alimenti per animali²⁷.

1.5.3 Pectinasi²⁸

Le pectinasi sono una vasta famiglia di enzimi in grado di aggredire le diverse e complicatissime strutture poligalatturoniche dei vegetali. Questi biocatalizzatori sono tra i più diffusi per applicazioni industriali soprattutto nei settori di produzione di succhi e alimenti in generale. Si stima che questi preparati costituiscano il 25% del mercato globale degli enzimi e la più comune fonte dal quale vengono estratti è *Aspergillus niger*²⁹.

Le pectinasi sono classificate in base al tipo di legame che idrolizzano nella struttura pectica (figura 1.16):

- le polimetilgalatturonasi e le poligalatturonasi (EC 3.2.1.15) idrolizzano i legami α -1,4 tra le unità di acido galatturonico più o meno mutilato;
- le pectinesterasi (EC 3.1.1.11) rimuovono il gruppo metile delle pectine idrolizzando il legame estere, ove presente, del carbossile del galatturone;
- le pectin liasi (EC 4.2.2.10) idrolizzano i legami α -1,4 tra le unità di acido galatturonico tramite un meccanismo di trans eliminazione inusuale per le carboidrasi che produce dei galatturonati o metilgalatturonati insaturi.

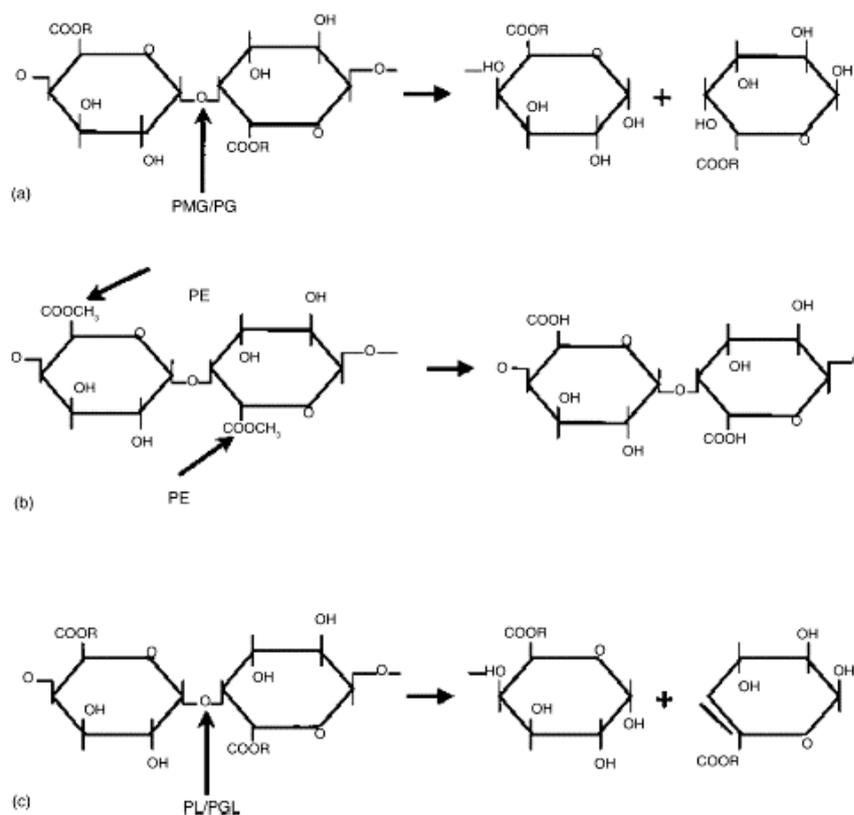


Figura 1.16: modo d'azione delle pectinasi: (a) R = H per PG e CH₃ per PMG; (b) PE; e (c) R=H per PGL e CH₃ per PL. La freccia indica il legame idrolizzato dalla pectinasi. PMG, polimetilgalatturonasi; PG, poligalatturonasi (EC 3.2.1.15); PE, pectinesterasi (EC 3.1.1.11); PL, pectin liasi (EC-4.2.2.10) (Da Jayani *et al.* 2005).

1.5.4 Aril esterasi³⁰

Le aril esterasi sono enzimi in grado di idrolizzare i legami estere tra la funzionalità carbossilica di un fenolo acido e una funzionalità idrossile di un carboidrato facente parte delle strutture polisaccaridiche della parete cellulare vegetale. I fenoli esterificati principalmente presenti nelle pareti cellulari vegetali sono l'acido cumarico, l'acido cinnamico e l'acido ferulico. Quest'ultimo è soprattutto presente anche grazie alla sua capacità di formare diverse tipologie di dimeri che consentono di creare strutture a ponte tra due catene polisaccaridi che, conferendo alla struttura una maggiore stabilità e resistenza meccanica. In piante dicotiledoni, come gli spinaci e la barbabietola da zucchero, l'acido ferulico è generalmente legato al gruppo idrossile C-6 dei β -1,4-galattani e al gruppo idrossile C-2 degli α -1,5-L arabinani. In piante monocotiledone ed erbe, come bambù, canna da zucchero, grano e granturco l'acido

ferulico esterifica i gruppi idrossile C-4 dello xilosio degli xiloglucani e i gruppi idrossile C-5 dell'arabinosio degli arabinosilani.

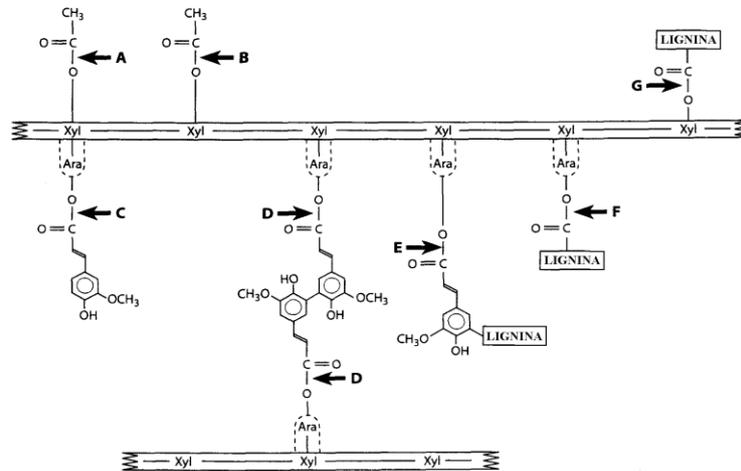


Figura 1.17: Struttura generale e semplificata dell'arabinosilano. Dalle catene xilaniche partono delle ramificazioni di arabinosio. I legami esterei substrato delle aril esterasi sono: A) gruppo 2-O-acetilico; B) gruppo 3-O-acetilico; C) gruppo 5-O-ferulico; D) gruppi 5-O-diferulici (dimero con legami 5-5'); E) 5-O-feruloil-lignina; F) arabinosio-lignina; G) xilosio-lignina³¹.

Le feruloil esterasi (EC 3.1.1.73) sono state recentemente suddivise in famiglie, A-D, in base alle proprie affinità per diverse tipologie di substrati (Tabella 6)³².

	Tipo A	Tipo B	Tipo C	Tipo D
Capacità di idrolisi dei metil esteri	MFA, MSA, MpCA	MFA, MpCA, MCA	MFA, MSA, MpCA, MCA	MFA, MSA, MpCA, MCA
Rilascio di diferulati	5-5'	No	No	5-5'
Similarità sequenziale	Lipasi	Acetil xilan esterasi (Carboidrato esterasi famiglia I)	Clorogenato esterasi tannasi	Xilanasi

Tabella 6: Classificazione delle feruloil esterasi basata sulla capacità di idrolizzare metil esteri di diversi fenoli acidi (MFA: metil ferulato, MSA: Metil senapato, MpCA: metil para cumarato, MCA: metil caffeato), rilasciare dimeri ferulici 5-5' da substrati modello e complessi e in base alle identità della sequenza amminoacidica primaria con altri enzimi.

Il rilascio enzimatico dell'acido ferulico esterificato di posizione C-2 o C-5 delle catene laterali α -L-arabinofuranosiche degli arabinossilani e dei dimeri ferulici che formano i ponti inter- e intra- catena coinvolti nel cross-linking di polimeri all'interno della parete cellulare può essere ottenuto utilizzando una batteria di enzimi che comprenda diverse esterasi (acetil xylan esterasi, feruloyl esterasi, cinnamoyl esterasi), insieme con le principali carboidrati come le endo-1, 4 xylanasi, L-arabinofuranosidasi e xylosidasi.

1.5.5 Proteasi³³

Le proteine della parete cellulare dei vegetali sono degradate da proteasi, enzimi che scindono il legame peptidico tra due amminoacidi in una proteina. Le proteasi possono agire sia in maniera endo- che eso- e a volte possono idrolizzare anche altri tipo di legami rispetto a quello peptidico.

Le proteasi³⁴ sono classificate in quattro gruppi principali a seconda del loro meccanismo di azione:

- serin-proteasi (chimotripsina, tripsina, elastasi etc.) tutte inibite dal diisopropilfosforofluoridato, contengono dei residui di serina e istidina coinvolti nel meccanismo di idrolisi al sito catalitico;

esse basano il loro meccanismo di catalizzazione alla presenza della serina, un' amminoacido polare;

- sulfidril-protesi (papaina, bromelaina, etc.) inibite da reagenti sulfidrilici, contenenti residui cisteinici e istidinici al sito catalitico;
- metallo proteasi (carbossipeptidasi A e B) esopeptidasi che richiedono un cofattore metallico;

Aspartico-proteasi (pepsina, chimosina, etc.) conosciute anche come proteasi acide per via del basso pH ottimale di lavoro, che contengono due residui di acido aspartico nel sito catalitico.

1.5.6 Xilanasi

Le xilanasi sono enzimi che catalizzano l'idrolisi dei legami glicosidici tra residui di xilano. La completa degradazione dello xilano richiede l'azione di xilanasi, endo β -1,4 xilanasi e β -1,4 xilosidasi. La catena principale del polimero polisaccaridico è composta da residui di xilosio uniti da legami glicosidici β -1,4 con catene laterali di varia natura.

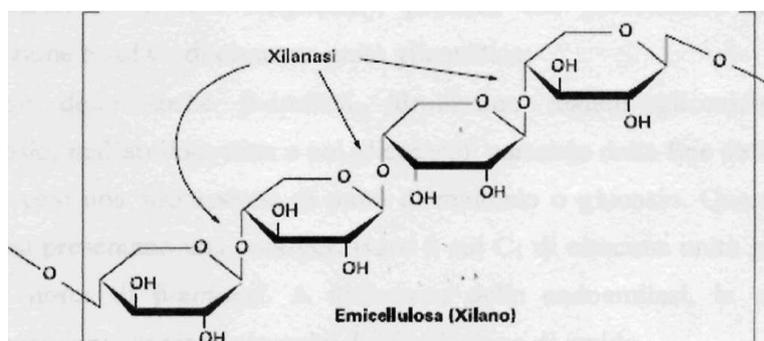


Figura 1.18: rappresentazione dello xilano e dei legami che vengono idrolizzati dalle xilanasi

Lo xilano è il polisaccaride non cellulosico più abbondante, presente nella parete secondaria delle cellule vegetali il quale forma una sorta di interfase tra la lignina e gli altri polisaccaridi. Le molecole di xilano sono legate covalentemente alla lignina attraverso residui fenolici, e interagiscono con gli altri polisaccaridi come la pectina e il glucano. Lo

xilano costituisce il composto polimerico più importante dell'emicellulosa³⁵.

Negli ultimi anni, xilanasi termostabili sono utilizzate nell'industria della carta, e si è visto che queste determinano una significativa riduzione delle quantità di cloro e di ossido di cloro usati per sbiancare la pasta di cellulosa.

Questa riduzione è di circa il 10-20% rispetto ad un processo privo di pretrattamento enzimatico. Il trattamento con le xilanasi non porta allo sbiancamento completo della pasta, ma lo facilita enormemente.

1.5.7 Amilasi³⁶

Le amilasi sono una classe di enzimi presenti nei microrganismi, nelle piante e negli animali che rompono i legami O-glicosidici nell'amido. Esse vengono suddivise in tre gruppi sulla base del loro meccanismo d'azione:

- endomilasi: sono piccole proteine enzimatiche di basso peso molecolare (20-25 kDa), dette anche α -amilasi, che catalizzano l'endoidrolisi dei legami 1,4- α -D-glucosidici di oligosaccaridi e polisaccaridi contenenti tre o più residui.

L'enzima agisce in maniera casuale su amido, glicogeno e molecole ad esse correlate. Il termine α non si riferisce al tipo di legame glicosidico che viene idrolizzato, ma alla configurazione degli zuccheri prodotti che, infatti, presentano una configurazione α sul C₁ di ciascuna unità glicosidica;

- esoamilasi: dette anche β -amilasi le quali idrolizzano i legami glicosidici α 1,4 nell'amilosio, nell'amilopectina e nel glicogeno, partendo dalla fine della catena e formando così una successione di unità di maltosio o glucosio. Questi prodotti dell'idrolisi presentano una configurazione β sul C₁ di ciascuna unità glicosidica, da qui il nome di β -amilasi. A differenza delle endoamilasi, le esoamilasi diminuiscono lentamente la viscosità della soluzione di amido;

- gamma-amilasi.

Sia le α -amilasi sia le β -amilasi non sono in grado di idrolizzare legami α -1,6.

2 SCOPO

Lo scopo del presente lavoro di ricerca è lo studio di un trattamento di valorizzazione dei semi di *Pisum Sativum* L. e dello scarto derivante dalla lavorazione, ovvero il baccello, per recuperare l'eventuale contenuto di componenti fitochimiche ad alto valore aggiunto.

La caratterizzazione delle componenti fitochimiche e la successiva loro valorizzazione richiede una destrutturazione del tessuto vegetale attraverso l'utilizzo di biocatalizzatori enzimatici già impiegati in molti settori dell'industria chimico-farmaceutica e nelle trasformazioni agroalimentari. I principali vantaggi tecnologici nel loro impiego consistono nella possibilità di effettuare processi ad elevata efficienza in ambiente acquoso e in condizioni operative (pH, temperatura, pressione etc.) generalmente blande.

La tipologia di enzimi utilizzati sono preparati industriali aventi attività amilasiche, cellulasiche e xylanasiche oltre a quelle protesiche.

L'efficacia di idrolisi è stata valutata dalla caratterizzazione (mediante determinazione di proteine, polifenoli, zuccheri riducenti, carboidrati totali e potere antiossidante totale) dell'estratto acquoso derivante dal campione costituito dalla matrice vegetale sottoposta a trattamento biocatalitico di idrolisi operato da enzimi aggiunti sia singolarmente che in mix, al fine di porre le basi per lo sviluppo di un processo di bioraffinazione.

Il lavoro prevede una serie di prove termo/meccanico/enzimatiche sui campioni di seme di pisello e di baccello in cui è stato determinato il rapporto ottimale tra matrice vegetale e acqua di reazione e sono state utilizzate diverse attività enzimatiche atte ad idrolizzare la matrice vegetale.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Determinazione rapporto ottimale matrice vegetale:acqua di reazione

Per poter effettuare analisi sulle matrici vegetali oggetto dello studio, è indispensabile determinare il rapporto matrice vegetale : acqua ottimale da utilizzare. A tale scopo, sono stati preparati diversi campioni contenenti la matrice vegetale (semi di pisello o baccello di pisello) sospesa in diverse quantità di acqua. Sono state eseguite delle prove utilizzando rapporti matrice vegetale:acqua pari a 1:3 (100 g di matrice e 300 g di acqua), 1:5 (100 g di matrice e 500 g di acqua), e 1:7 (100 g di matrice e 700 g di acqua). E' importante sottolineare che un minore utilizzo d'acqua è auspicabile anche nella prospettiva di una industrializzazione dello studio.

3.2 Trattamento meccanico, termico ed enzimatico della matrice vegetale

La procedura d'analisi utilizzata prevede che i campioni, una volta pesati, vengano addizionati dell'opportuna aliquota; fatto ciò, si procede ad un trattamento frullatura e di omogeneizzazione meccanico mediante l'utilizzo di un comune mixer da cucina.

Il sistema così ottenuto, viene fatto bollire per 15 minuti e successivamente raffreddato, avendo cura di ripristinare l'eventuale acqua persa per evaporazione.

Alla sospensione ottenuta, vengono aggiunti successivamente gli enzimi idrolitici, con una percentuale pari all'1% p/p di matrice vegetale; l'aggiunta di tali preparati deve essere effettuata solo una volta che il sistema si è raffreddato per evitarne la denaturazione.

L'azione enzimatica è stata protratta per un tempo pari a 24 ore effettuando dei prelievi ad intervalli di tempo regolari.

Ciascuna aliquota prelevata, è stata poi centrifugata (per 3 minuti ad una velocità di 130 RPMx100) per separare la fase acquosa dal residuo solido costituito da semi di pisello o da baccelli frullati; sulla fase acquosa sono poi stati condotti alcuni test per poterla caratterizzare.

Il medesimo procedimento è stato ripetuto utilizzando un sistema enzimatico diverso: dapprima si è adoperato CYTOLASE M102 e, successivamente, RAPIDASE C80 MAX sempre in quantità pari all'1% p/p di matrice vegetale.

3.3 Enzimi idrolitici per la disgregazione della matrice vegetale

L'utilizzo di selezionati enzimi idrolitici può permettere un'idrolisi mirata della matrice vegetale.

In commercio esistono molti preparati enzimatici prodotti per via fermentativa da ceppi microbici o fungini, selezionati per sovra produrre determinate classi enzimatiche; un problema che si incontra spesso sta nel fatto che la caratteristica attività per cui vengono venduti questi preparati, non rispecchia completamente la reale composizione del prodotto.

Allo scopo di idrolizzare la matrice vegetale in esame, sono stati utilizzati dei preparati commerciali enzimatici ed amilasi da laboratorio, precedentemente caratterizzati, in termini di diverse attività enzimatiche, durante un lavoro di ricerca svolto presso il gruppo di Biochimica Industriale del Dipartimento di Chimica Industriale e dei Materiali³⁷:

- Celluclast BG estratto da *Trichoderma reesei* (Novozymes): preparato enzimatico granulare di colore marrone chiaro, proposto come cellulasi, ma in cui, in realtà, l'attività cellulaseica è abbastanza bassa; presenta anche buone attività pectinasica e xilanasica;

- Fungamyl Super AX estratto da *Aspergillus Oryzae* e *Humicola Insolens* (Novozymes): preparato enzimatico granulare di colore marrone chiaro, proposto come α -amilasi, mostra buone attività feruloil e caffeil esterasiche, quindi si propone come potenziale biocatalizzatore per il recupero di fenoli; presenta inoltre buona attività pectinasica;
- Rapidase C80 Max preparazione enzimatica poligalatturonica estratto da *Aspergillus niger*;
- Cytolase M102 ottenuto dalla fermentazione di ceppi selezionati di *Aspergillus niger* : preparato enzimatico liquido di color marrone che contiene attività pectinasiche (pectin-liasi, poligalatturonasi) che effettuano la depolimerizzazione delle pectine e attività secondarie emicellulasiche;
- Maxazyme preparato enzimatico liquido di colore marrone ottenuto da proposto come cellulasi.

3.4 Determinazione degli zuccheri riducenti (Metodo dell'ADNS)

La procedura è basata sul metodo di Bailey *et al.* 1992³⁸ e consente la determinazione spettrofotometrica degli zuccheri riducenti liberati tramite reazione ossidativa con acido 3,5 dinitrosalicilico (ADNS)*.

La reazione che avviene tra il reattivo ADNS e uno zucchero alla base del metodo è riportata in Figura 3-1.

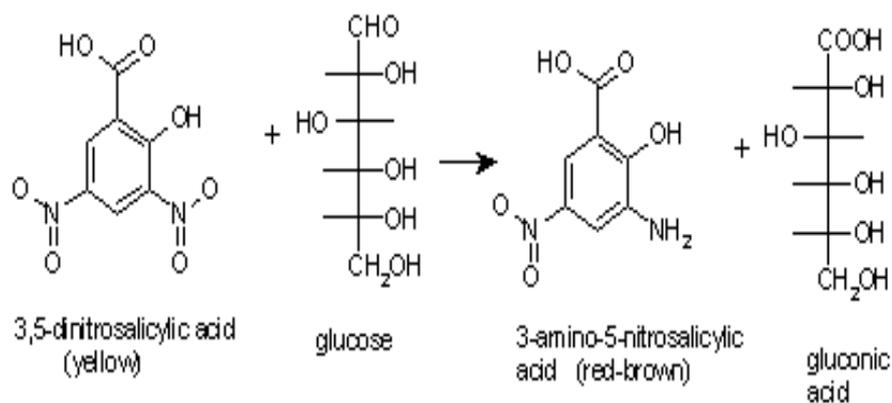


Figura 3-1: reazione ossidoriduttiva fra glucosio e acido 3,5-dinitrosalicilico (giallo) con formazione di acido gluconico e acido 3-ammino-5-nitrosalicilico (rosso).

Per determinare la concentrazione degli zuccheri riducenti di interesse presenti nei campioni si costruiscono le rette di taratura preparando soluzioni standard di D(+)-glucosio (M.W. $C_6H_{12}O_6$ 180,16 g/mol) (Sigma) a concentrazioni da 0,2 a 0,8 mg/ml in H₂O e acido galatturonico (M.W. 212,2 g/mol) (Sigma) a concentrazioni da 0 a 1 mg/l in tampone di Mc Ilvaine a pH 4.8. A 400 μ l di tali soluzioni si aggiungono 600 μ l di ADNS.

*75g di sodio potassio tartrato vengono scolti in 50 ml di NaOH 2M, portando a volume di circa 100 ml di acqua distillata. A questa soluzione si aggiungono 0,25 g di Acido DinitroSalicilico (la dissoluzione di ADNS è lenta ma non bisogna riscaldare, e nemmeno ricorrere al bagno ultrasuoni). Quando ADNS è perfettamente sciolto si porta a volume fino a 250 ml con H₂O distillata e si conserva a 4°C e al riparo dalla luce.

I campioni così preparati sono tenuti in acqua bollente per 5 minuti, centrifugati e l'assorbanza è letta a 550 nm contro il campione a concentrazione di zucchero nulla.

Le concentrazioni di D(+)-glucosio e acido galatturonico liberati si ottengono usando le seguenti rette di taratura (Figura 3-2):

$$\text{D(+)-glucosio rilasciato [mg/ml]} = (\text{Abs}_{550\text{nm}} + 0,0363) / 1.0998$$

$$\text{Acido Galatturonico rilasciato [mg/ml]} = (\text{Abs}_{550\text{nm}} + 0,0448) / 1.1127$$

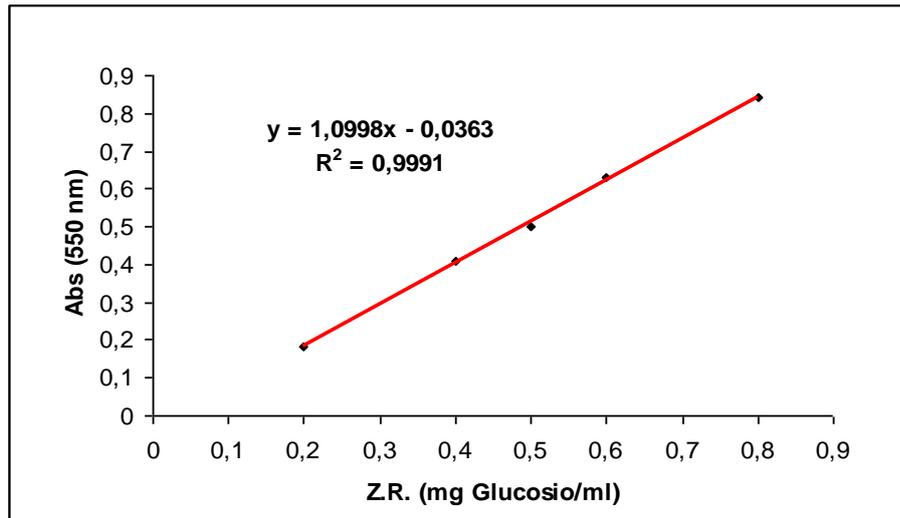


Figura 3-2: retta di taratura per la determinazione dell'attività amilasica

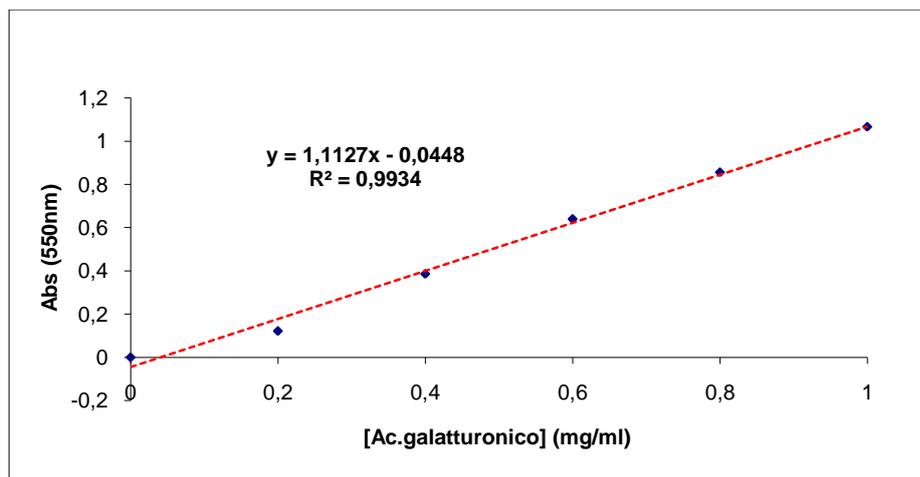


Figura 3-3: retta di taratura per la determinazione dell'attività pectina sica

Per la determinazione degli zuccheri riducenti nei campioni si aggiungono a 400 μ l di campione 600 μ l di ADNS e si lascia il tutto in acqua bollente per 7 minuti. Dopo raffreddamento e centrifugazione (13000 rpm per 5 min) si esegue la lettura spettrofotometrica a 550 nm contro un bianco a concentrazione nulla di zucchero.

3.5 Determinazione delle proteine totali (Metodo Bradford)

Per la determinazione delle proteine totali viene utilizzato un semplice saggio colorimetrico che utilizza il reattivo di Bradford. La retta di taratura (Figura 3-4) è costruita con soluzioni standard di BSA (albumina di siero bovino) alle concentrazioni di 0,25, 0,5, 1, 1,4 mg/ml. In una provetta si introducono 1,5 ml di reattivo di Bradford e successivamente 50 μ l di campione standard di BSA. Si lascia sviluppare il colore per un tempo di circa 5 min e successivamente si effettuano le letture di assorbanza alla lunghezza d'onda di 595 nm contro un bianco costituito da acqua distillata e 1,5 ml di reattivo³⁹.

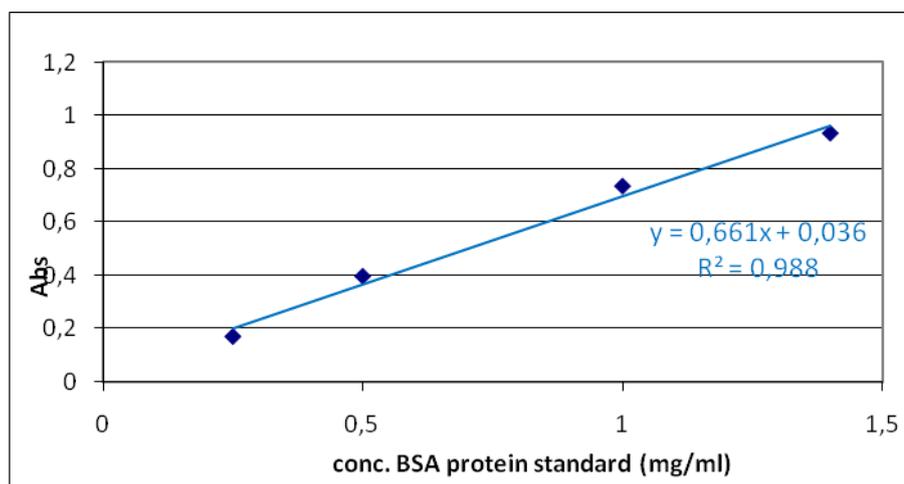


Figura 3-4: Retta di taratura per la determinazione delle proteine totali con il metodo di Bradford.

3.6 Determinazione dei polifenoli totali (Metodo di Folin-Ciocalteu)⁴⁰

Questo metodo sfrutta la reazione redox in ambiente basico tra composti fenolici e il reattivo di Folin-Ciocalteu, che è una miscela di acido fosfotungstico e fosfomolibdico. Da tale reazione si formano complessi

blu di ossidi di W_8O_{23} e Mo_8O_{23} che presentano un massimo di assorbimento nel visibile a 700 nm.

Si preparano 5 soluzioni di catechina (Sigma), utilizzata come polifenolo di riferimento, in metanolo a concentrazioni comprese tra 20 e 300 mg/l. In matracci da 20 ml, ad 1 ml di ciascuna soluzione, sono aggiunti: 1 ml di metanolo, 5 ml d'acqua, 1 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu e, dopo 5 minuti, 4 ml di carbonato di calcio 10% w/v. Si porta a volume con acqua distillata e si legge l'assorbanza a 700 nm dopo 90 minuti d'incubazione a 30°C. La concentrazione di polifenoli in soluzione è calcolata tramite la seguente retta di taratura (Figura 3-5):

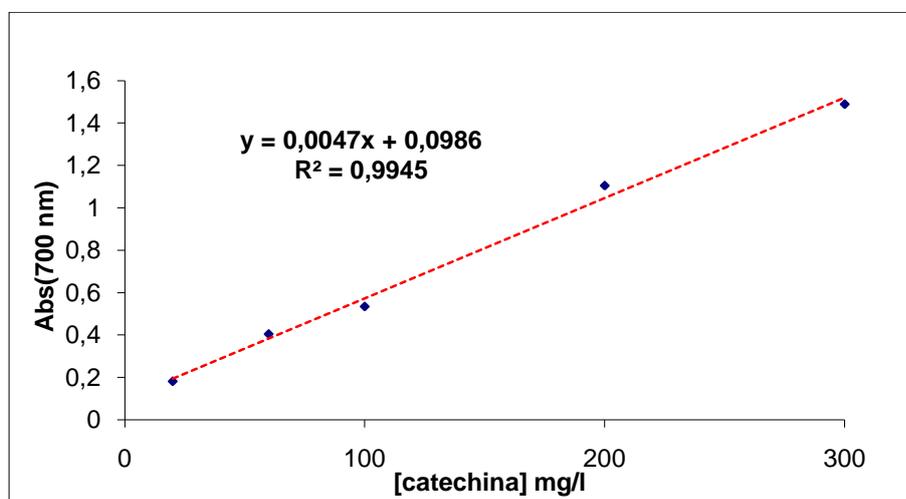


Figura 3-5: Retta di taratura per la determinazione dei polifenoli totali a 30 °C.

La concentrazione di polifenoli, espressa come mg/L di catechina, viene quindi determinata tramite l'equazione della retta:

$$[\text{Polifenoli}] \text{ (mg/l)} = \text{Abs}_{700 \text{ nm}} * 212.8 * l \text{ (cammino ottico)}$$

Per la determinazione dei polifenoli totali presenti nei campioni, al fine di eliminare sostanze organiche che possono interferire nella lettura, si effettua un passaggio in cartuccia C-18 end-capped, Phenomenex-Strata, 1.0g/ 6ml, secondo il metodo descritto di seguito: si lava la cartuccia con 2 ml di metanolo e si condiziona con 5 ml d'acido solforico 0.01 N. Si adsorbe 1 ml di campione, opportunamente diluito in acido solforico 0.1 N per ottenere un'assorbanza compresa nel range della retta di taratura, e

si aggiungono 2 ml d'acido solforico 0.01 N. Si collega la cartuccia ad un matraccio da 20 ml e si eluisce con 2 ml di metanolo e 5 ml d'acqua distillata. Al contenuto del matraccio si aggiunge 1 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu e, dopo 5 minuti, 4 ml di carbonato di sodio 10 % w/v portando poi a volume con acqua. Dopo 90 minuti si legge l'assorbanza a 700 nm, avendo cura di centrifugare il campione per sedimentare il precipitato di carbonato che si forma, contro un bianco preparato in un matraccio da 20 ml contenente tutti i reagenti e 2 ml di metanolo non contenente fenoli.

3.7 Determinazione del potere antiossidante totale⁴¹

Per la determinazione del potere antiossidante, ovvero la capacità di determinate molecole di comportarsi da *scavenger* di radicali liberi, si sfrutta una molecola target, il DPPH (2,2-difenyl-1-picrylhydrazyle).

A 0,5 ml di estratto acquoso ottenuto in seguito a centrifugazione dei campioni ed opportunamente diluito, sono aggiunti 1,5 ml di una soluzione di DPPH 0,1 mM in metanolo. E' necessario preparare anche una soluzione denominata "controllo" costituita da 1,5 ml della soluzione di DPPH e 0,5 ml di acqua; questa soluzione è estremamente importante in quanto la determinazione del potere antiossidante si basa sulla differenza tra l'assorbanza della stessa specie letta dopo l'azione delle sostanze antiossidanti eventualmente contenute nel campione in esame con cui si è trovata in contatto. Il bianco contro cui sono state effettuate le misure spettrofotometriche è costituito da 1,5 mL di metanolo e 0,5 mL di acqua distillata.

Preparati i campioni in provette, queste, vanno tappate immediatamente (al fine di limitare l'evaporazione del solvente), agitate vigorosamente per pochi secondi e poste in un ambiente buio per un tempo di reazione di 60 min.

Infine si eseguono letture allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 517 nm.

3.8 Determinazione dei carboidrati totali (Metodo fenolo/solforico)

La procedura si basa sul metodo fenolo/solforico che è stata ricavata da una metodica di analisi dei carboidrati totali attraverso analisi spettrofotometrica⁴².

Il metodo è quindi basato su di una retta di taratura costruita con soluzioni standard di D(+)-glucosio alle concentrazioni comprese tra 0,01-0,1 mg/ml.

A 200 μ L di standard, posti in un tubo di reazione, si aggiungono 200 μ L di soluzione acquosa di fenolo 5% w/v (soluzione stabile nel tempo). Successivamente si aggiunge 1 ml di acido solforico conc.

(98% w/w) e rapidamente si chiude il tubo di reazione. Dopo una energica agitazione si lascia sviluppare la reazione per 30 min a 30°C e successivamente si fanno le letture di assorbanza alla lunghezza d'onda di 490 nm contro un bianco costituito da 200 μ L di H₂O distillata quindi a concentrazione di zucchero nulla.

Dai valori di concentrazione degli standard e di assorbanza a 490 nm si costruisce la retta di taratura (Figura 3-6).

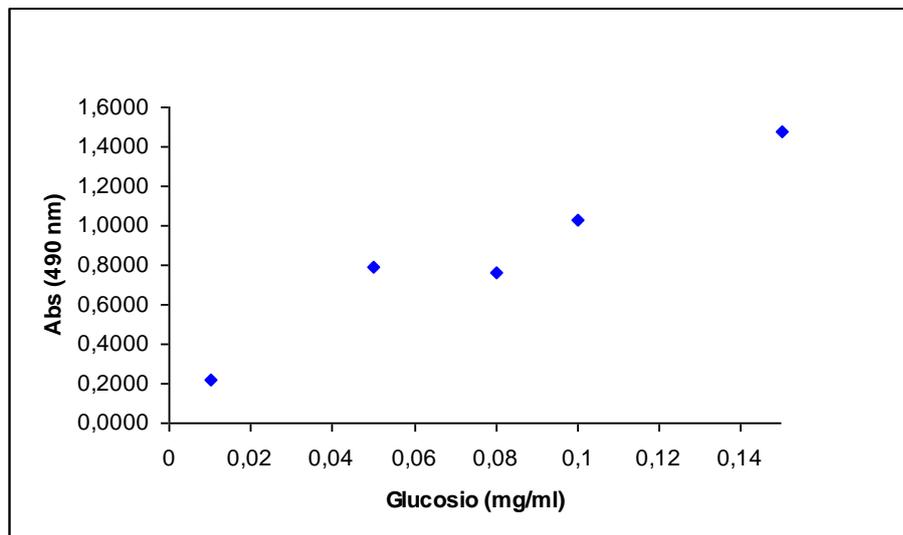


Figura 3-6: Retta di taratura per la determinazione dei carboidrati totali con il metodo fenolo/solforico e operando il raffreddamento a 30°C dei tubi dopo aggiunta di acido solforico conc.

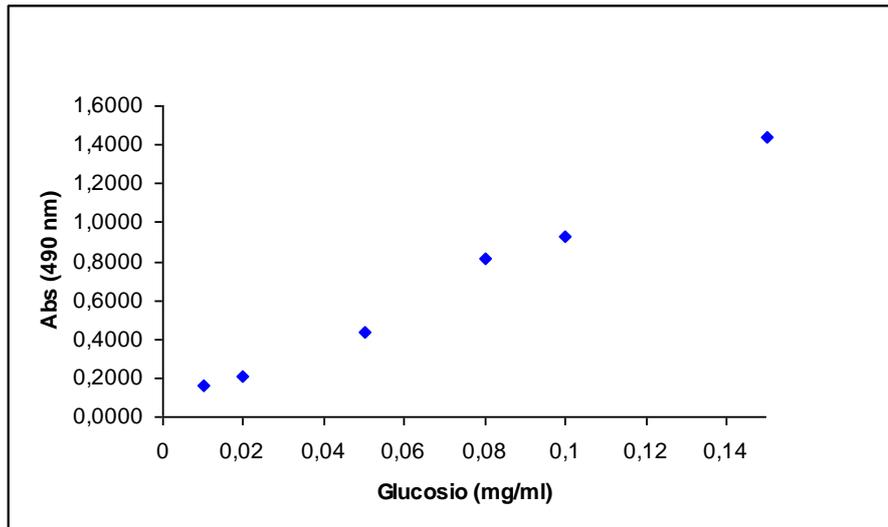


Figura 3-7: Retta di taratura per la determinazione dei carboidrati totali con il metodo fenolo/solforico non operando il raffreddamento dei tubi dopo aggiunta di acido solforico conc.

La retta in Figura 3-7 è stata costruita operando un raffreddamento a 30 °C dei campioni all'interno dei tubi ma come si può osservare tale operazione non garantisce la linearità che si è invece ottenuta effettuando il saggio senza un raffreddamento dei campioni (figura 3.8).

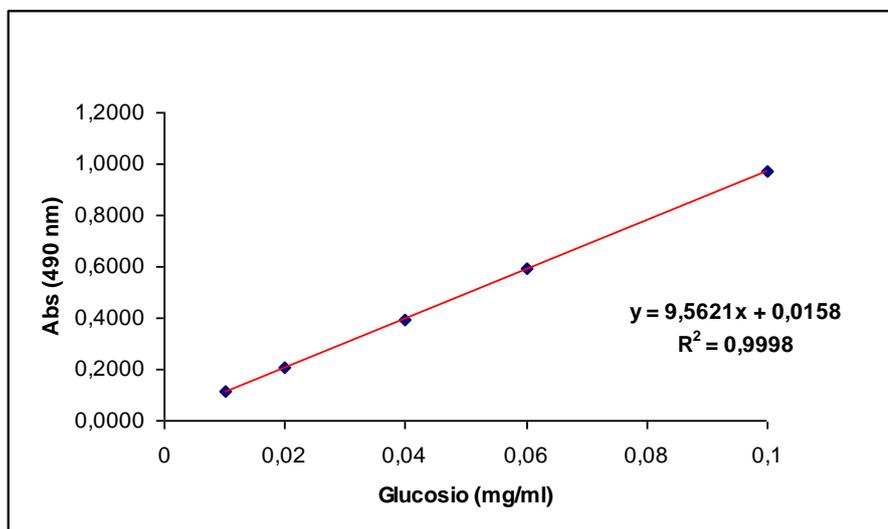


Figura 3-8: Retta di taratura per la determinazione dei carboidrati totali con il metodo fenolo/solforico non operando il raffreddamento dei tubi dopo aggiunta di acido solforico conc.

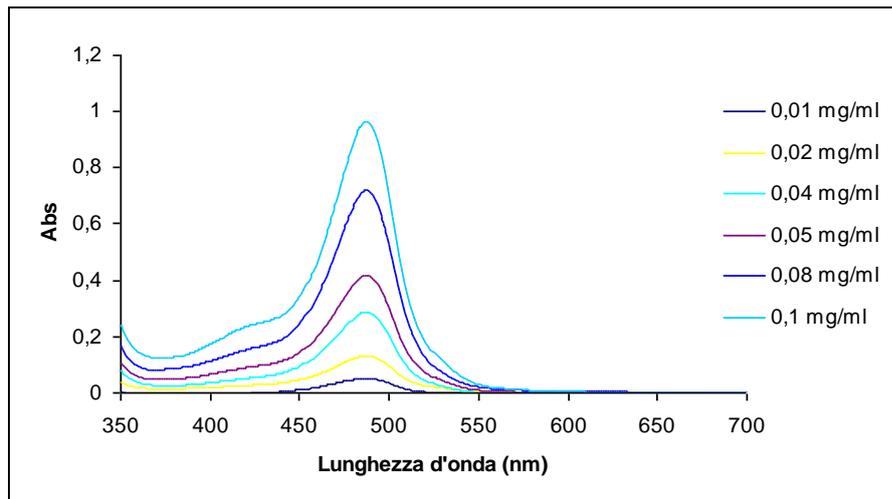


Figura 3-9: Spettri di assorbimento (350-700nm) dei campioni di standard trattati con il metodo fenolo/solforico.

Come si può osservare in Figura 3-9 gli spettri di assorbimento dei campioni di standard di glucosio, dopo il saggio fenolo/solforico, hanno un massimo di assorbimento a lunghezze d'onda di 490 nm e inoltre si ha una proporzionalità diretta tra assorbanza e concentrazione di glucosio e ciò è in linea con i risultati ricercati in letteratura⁴³.

La retta di taratura di Figura 3-8, relativa agli spettri di Figura 3-9, verrà utilizzata per le determinazioni sui campioni reali. Un'aliquota di estratto viene centrifugata e il surnatante, opportunamente diluito per ottenere concentrazioni pari a quelle della retta di taratura, viene sottoposto al saggio nelle quantità di 200 μ l. Attraverso il saggio si hanno valori relativi alla quantità di carboidrati totali espressi come concentrazione di glucosio proveniente dall'idrolisi delle catene polisaccaridiche.

3.9 Determinazione dell'attività pectinasi di estratti enzimatici commerciali

Si è preparata una soluzione di pectina di mele (Fluka) allo 0,3% (p/v) in tampone Mc Ilvine (0,3 g in 100 ml di tampone) a pH 5, facendo solubilizzare il polimero lasciando la soluzione ad ebollizione per 3 minuti sotto agitazione magnetica. Si è scelta questa concentrazione di

substrato perché permette di ottenere valori di assorbanza apprezzabili e allo stesso tempo riduce i problemi operativi dovuti alla gelificazione della pectina. Dopo aver lasciato raffreddare il substrato fino a temperatura ambiente si è proceduto con la reazione enzimatica e il saggio per la determinazione degli zuccheri riducenti come descritto nel paragrafo 3.1.

La concentrazione di acido galatturonico liberato si ottiene tramite la retta di taratura riportata in Figura 3-3.

3.10 Analisi aminoacidi con metodo della ninidrina

Il metodo della ninidrina (1,2,3-indantrione monoidrato) secondo *Moore-Stain et al.*, è un metodo riconoscitivo e quantitativo per l'analisi degli aminoacidi mediante reazione ossido riduttiva tra il reattivo e l'alfa-amminoacido (Figura 3-10)

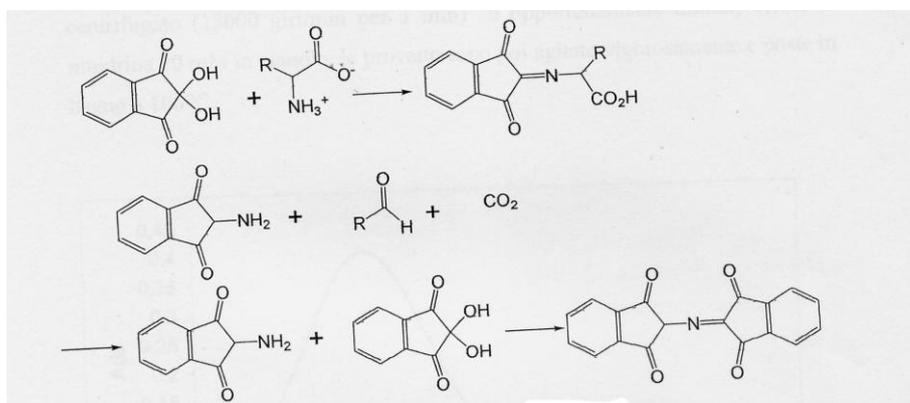


Figura 3-10: Schema di reazione della ninidrina con un aminoacido

Questa è una reazione a tre fasi con una prima condensazione tra la ninidrina e l'amminoacido per ottenere l'acido 2-(1,3 diosso-inden-2-ilidenammino)-2-alchilacetico, seguita da una di sproporzione.

Da cui si ottiene: l'alchilchetone derivante dal gruppo R dell'amminoacido, CO_2 e il 2-ammino-1,3-indendione il quale reagisce con un'altra molecola di ninidrina con una seconda reazione di condensazione.

Dalla stechiometria si evince che è necessario lavorare con concentrazioni di reattivo almeno doppie rispetto a quella di un aminoacido.

Il prodotto della reazione è un composto colorato, generalmente viola, dosabile spettrofotometricamente che può presentare coefficienti di assorbimento (ϵ) diversi per diversi aminoacidi e in alcuni colori diversi come ad esempio la prolina che da una colorazione gialla. Il reattivo è inibito dalla presenza di metalli quali Cu^{2+} , Fe^{3+} , fattori che in soluzioni complesse possono ridurre la precisione del metodo.

Esso è basato su di una retta di taratura costruita con soluzioni standard di acido α -ammino butirrico alle concentrazioni comprese tra 0 e 250 $\mu\text{g/ml}$; questo standard non è un aminoacido naturale ma ne presenta le caratteristiche strutturali e, vista la risposta differente tra tutti gli aminoacidi naturali, si è scelto un composto simile ma non specifico.

A 0,7 ml di standard posti in una heppendorf, si aggiungono 0,7 ml di ninidrina 20 mM in etanolo e in seguito, vengono poste in un bagno d'acqua a 100 °C.

Il tempo di riscaldamento è un parametro critico per ottenere il completo decorso della reazione di formazione del prodotto. In letteratura diversi tempi sono indicati come ottimali quindi si è deciso di determinare il tempo ottimale per le nostre condizioni operative, effettuando le stesse procedure di analisi con soluzioni a diverse concentrazioni per tempi compresi tra 3 e 20 minuti (Figura 3-11).

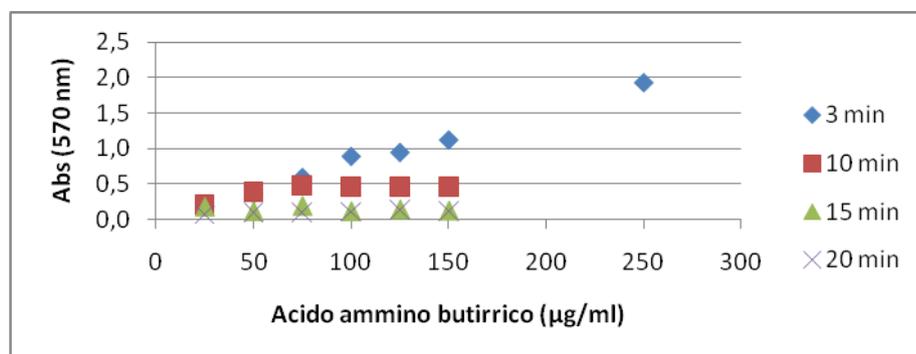


Figura 3-11: confronto dei tempi di riscaldamento delle heppendorf in un bagno d'acqua a 100 °C.

Come si può osservare dalla figura, con tre minuti di riscaldamento a 100 °C si ottiene una buona linearità di risposta tra i 50 e 250 µg/ml di acido α-ammino butirrico; aumentando il tempo di riscaldamento a 10 minuti si nota un significativo aumento della colorazione a parità di concentrazione di acido α-ammino butirrico, tuttavia per concentrazioni superiori a 150 µg/ml la colorazione rimane costante come se iniziasse una reazione secondaria inibente lo sviluppo del colore. Aumentando il tempo di riscaldamento questo fenomeno sembra ancora più evidente tanto da mostrare un fenomeno di inibizione già a concentrazioni basse. Per tale motivo si sceglie di effettuare tale saggio con un tempo di riscaldamento di 3 minuti.

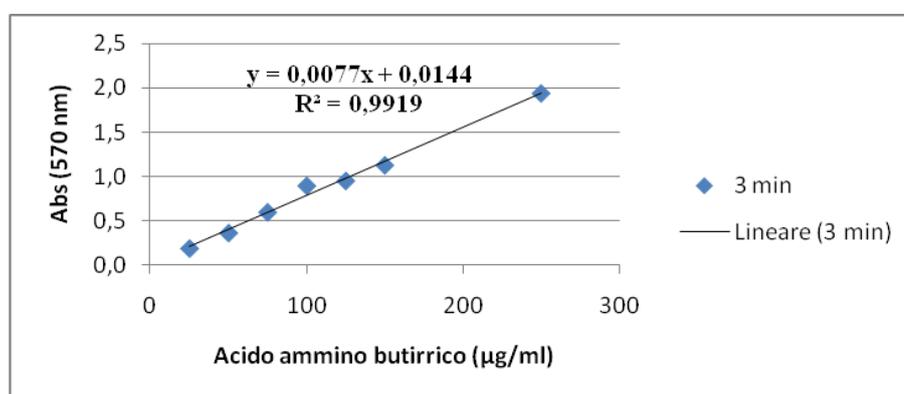


Figura 3-12: retta di taratura per la determinazione dell'acido α-ammino butirrico operando il riscaldamento a 3 minuti in un bagno d'acqua a 100 °C.

La retta di taratura di Figura 3-12 verrà utilizzata per le determinazioni sui campioni reali di estratto di pisello e baccello. Entrambi gli estratti vengono opportunamente diluiti per ottenere delle concentrazioni pari a quelle della retta di taratura (150 µg/ml) e sottoposti al saggio.

3.11 Materiali e strumentazione utilizzati

Gli strumenti utilizzati durante le prove di laboratorio sono i seguenti:

- centrifuga “MIKRO 20” (Hettich Zentrifugen).

Questa centrifuga è stata utilizzata sempre alla velocità di 130 RPMx100;

- spettrofotometro “UVIKON 923 Double beam UV/Vis spectrophotometer” (Bio-tek Kontron Instruments);
- centrifuga “ALC 4239R High Speed Refrigerated Centrifuge;

questa centrifuga è stata utilizzata sempre ad una temperatura interna di 20 °C per un tempo di 15 minuti.

I solventi e i reagenti utilizzati durante le prove di laboratorio sono i seguenti:

- acetone puro al 99% per analisi (Polichimica);
- n-esano, purezza 99% per analisi (Riedel-de Haen);
- etanolo, purezza 99.8% (v/v) (Fluka);
- Cellulast BG (Novozymes);
- Fungamyl Super AX (Novozymes);
- Cytolase M102 (Ferrari s.r.l.);
- Rapidase C80 Max (DSM);
- Maxazyme (DSM);
- Pectin from apples (Fluka);
- Ninidrina (Merck).

4 RISULTATI E DISCUSSIONI

4.1 Determinazione del rapporto ottimale tra la matrice vegetale e il volume d'acqua di reazione in funzione del trattamento meccanico, termico ed enzimatico dei semi di pisello

La determinazione del rapporto ottimale tra la matrice vegetale (semi di pisello varietà nana o baccello di pisello) e l'acqua è stata studiata al fine di ottenere un sistema omogeneo, facile da campionare per le successive analisi e che permettesse un ottimo contatto tra enzima e matrice sospesa.

Da una semplice osservazione iniziale si può dire che, per quanto riguarda i semi di pisello, già dopo il trattamento meccanico di frullatura si ottiene un sistema omogeneo e facile da trattare per tutti i rapporti semi di pisello:acqua considerati mentre, nel caso del baccello, il sistema tende a rimanere piuttosto disomogeneo dopo tale trattamento in tutti i casi considerati.

4.2 Cinetica di rilascio di alcune componenti chimiche del campione di *Pisum Sativum* L. con trattamento meccanico, termico ed enzimatico

Per il campione di semi di pisello, i risultati vengono espressi in termini di rilascio in soluzione nel tempo delle varie componenti chimiche investigate ovvero proteine, zuccheri riducenti, carboidrati totali, polifenoli e potere antiossidante. Al fine di raggiungere una buona idrolisi del sistema è stato scelto un tempo di 24 ore per il trattamento enzimatico in quanto rappresenta il tipico periodo "overnight" ampiamente utilizzato nelle pratiche di laboratorio.

La determinazione delle rese di rilascio dei vari componenti in soluzione acquosa, ci permette di capire quanto i trattamenti meccanici ed enzimatici portino ad una disgregazione della matrice stessa con conseguente rilascio di sostanze solubili in acqua.

Come sistema enzimatico è stato utilizzato il mix Celluclast BG e Fungamyl Super AX ad una concentrazione relativa pari all'1% p/p del seme di pisello. Tali enzimi sono caratterizzati dalle seguenti attività enzimatiche (Tabella 7).

Attività Enzimatiche ($\mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$)	Fungamyl Super AX	Celluclast BG
PECTINASICA	10515,71	6899,18
XILANASICA	1808,34	2238,97
AMILASICA	33153,03	943,69
GLUCOSIDICA	5,33	3,46
CELLULASICA	0,39	0,71
FERULOILESTERASICA	4032,26	0,00
CAFFEILESTERASICA	7807,69	0,00

Tabella 7: attività enzimatiche dell'enzima Fungamyl Super AX e Celluclast BG

Le analisi sono state eseguite sul surnatante acquoso ottenuto dai campione preparati come descritto nel paragrafo precedente.

4.2.1 Determinazione del rilascio di zuccheri riducenti

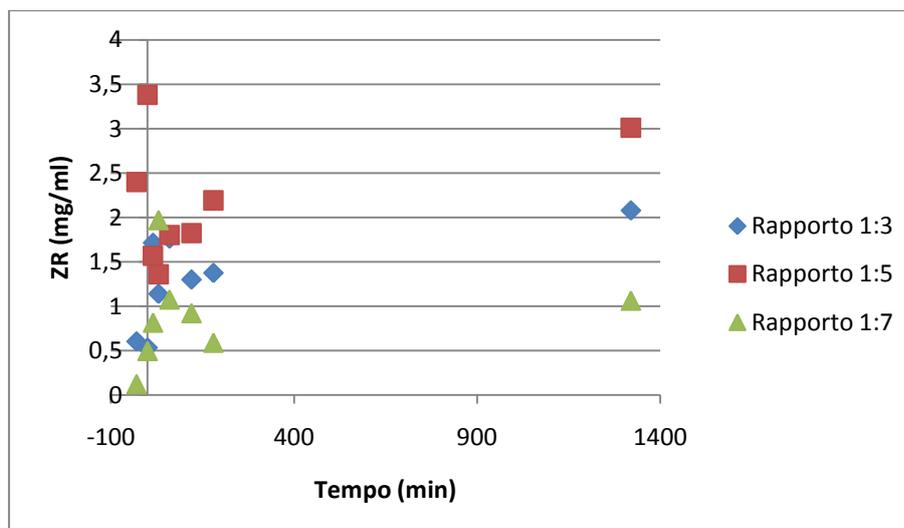


Figura 4-1: rilascio nel tempo di zuccheri riducenti, espresso come $\text{mg}_{\text{glucosio}}/\text{ml}_{\text{soluzione}}$ relativo ai diversi rapporti semi di pisello:acqua sottoposti a trattamento meccanico, termico ed enzimatico

Il tempo zero di tutte le cinetiche coincide con l'aggiunta degli estratti enzimatici dopo il trattamento termico (Figura 4-1) mentre i valori di concentrazione degli zuccheri riducenti riportati in funzione di tempi "negativi" sono quelli determinati dopo il trattamento meccanico.

Dal grafico riportato in Figura 4-1, è possibile osservare come, per tutti i rapporti semi di pisello:acqua considerati, si registra un aumento nelle rese di rilascio degli zuccheri riducenti durante tutto il periodo per il quale è stata seguita la cinetica enzimatica. La maggiore concentrazione di zuccheri riducenti si è riscontrata con il rapporto 1:5 mentre la minima ad un valore di 1:7. Tali differenze possono essere imputabili in parte a fenomeni di diluizione infatti la quantità assoluta di zuccheri rilasciati è di 2,07 mg/ml per il rapporto 1:3, 3,00 mg/ml per il rapporto 1:5 e 1,06 mg/ml per il rapporto 1:7. Il maggiore rilascio osservato nel 1:5 rispetto al 1:3 può essere attribuito al fatto che, nel secondo, la quantità di acqua usata non sia sufficiente per estrarre tutti gli zuccheri potenzialmente estraibili in queste condizioni a causa probabilmente di una condizione di saturazione.

4.2.2 Determinazione dei carboidrati totali

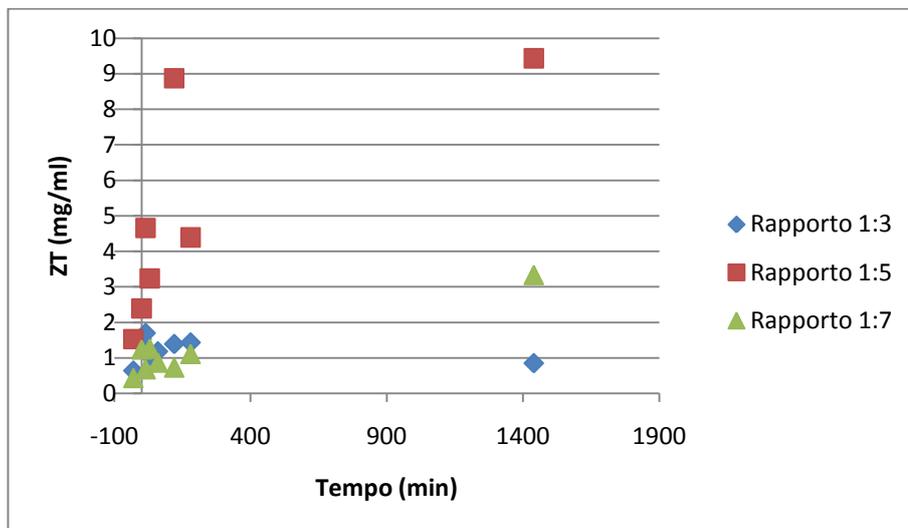


Figura 4-2: rilascio nel tempo di carboidrati totali, espresso come mg glucosio equivalente/ml soluzione, relativo ai diversi rapporti semi di pisello:acqua sottoposti a trattamento meccanico, termico ed enzimatico

Dal grafico riportato in Figura 4-2 si può notare che, aumentando la quantità di acqua utilizzata nel trattare la matrice vegetale, si raggiungono valori più elevati di carboidrati totali rilasciati sia in termini di concentrazione che in quelli di valore assoluto. Ciò potrebbe essere attribuito al fatto che, nel caso del rapporto 1:3, la quantità di acqua usata non sia sufficiente per estrarre tutti gli zuccheri potenzialmente estraibili in queste condizioni probabilmente perchè il sistema si trova in una condizione di saturazione. Il rapporto 1:5 sembra rappresentare il miglior compromesso in termini di quantità di acqua e di rilascio complessivo dei carboidrati. Il rendimento inferiore osservato nel rapporto 1:7 può essere dovuto ad un'attività enzimatica più diluita e quindi meno efficace rispetto al rapporto 1:5.

4.2.3 Determinazione del rilascio di polifenoli totali

La determinazione della quantità totale di polifenoli liberata può essere un indice significativo dell'azione idrolitica degli enzimi sul tessuto vegetale.

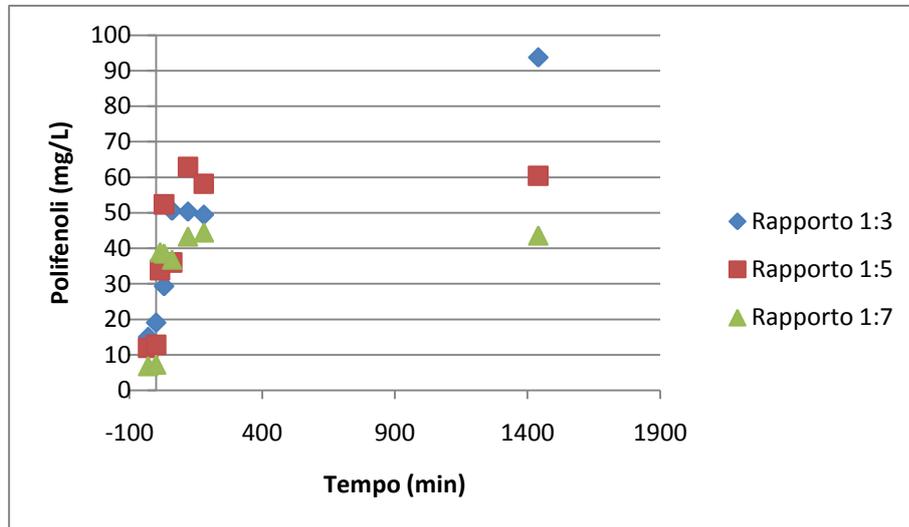


Figura 4-3: rilascio nel tempo di polifenoli totali espresso come $\text{mg}_{\text{catechina}}/\text{L}_{\text{soluzione}}$, relativo ai diversi rapporti semi di pisello:acqua sottoposti a trattamento meccanico, termico ed enzimatico

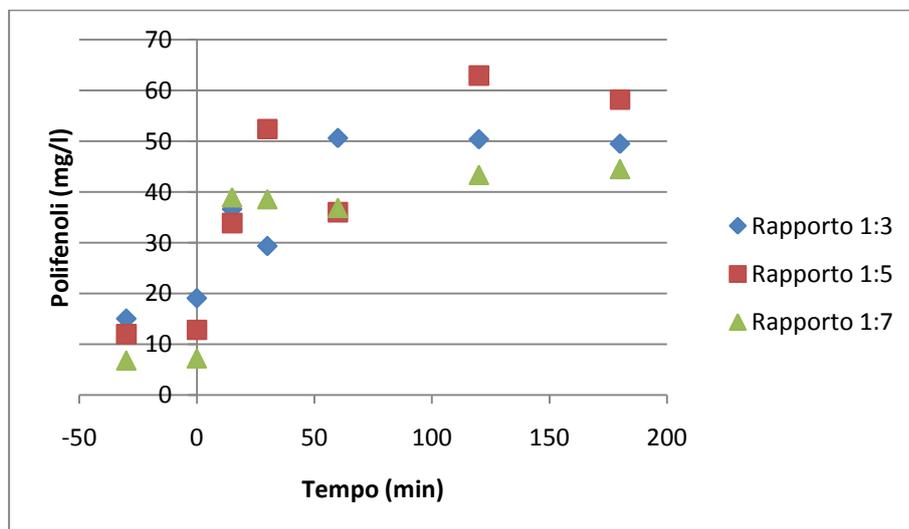


Figura 4-4: rilascio nel tempo di polifenoli totali, espresso come $\text{mg}_{\text{catechina}}/\text{L}_{\text{soluzione}}$, nelle prime tre ore di trattamento enzimatico

Dal grafico riportato in Figura 4-3 è possibile constatare che il contenuto dei polifenoli totali per i diversi campioni caratterizzati da rapporti semi di pisello:acqua differenti, rimane praticamente costante dopo la frullatura e la bollitura, ovvero 19,07 mg/l per il rapporto 1:3, 12,81 mg/l per il rapporto 1:5 e 7,25 mg/l per il rapporto 1:7, mentre, una volta effettuato il trattamento enzimatico, il rilascio aumenta notevolmente arrivando a valori pari a 93,74 mg/L per il rapporto 1:3, 60,40 mg/l per il rapporto 1:5, e 43,61 mg/l per il rapporto 1:7. Tali differenze possono essere semplicemente attribuite ad un effetto diluizione legato alla maggior quantità di acqua utilizzata nei sistemi relativi ai rapporti 1:5 e 1:7 rispetto al rapporto 1:3. Gli aumenti nel tempo si riscontrano durante tutto il periodo di registrazione della cinetica di rilascio, come messo in evidenza anche dal grafico in Figura 4-4, dove è possibile osservare come già dopo 15 minuti dall'aggiunta del mix enzimatico scelto si abbia un aumento dei polifenoli in soluzione.

La quantità di fenoli rilasciati in valore assoluto è coerente con il contenuto di fenoli riportati in bibliografia, ovvero di circa 80,00 µg/g sostanza secca⁴⁴; ciò significa che il pretrattamento meccanico/termico/enzimatico presenta una buona efficienza nella disgregazione della matrice permettendo un eccellente rilascio della componente fenolica contenuta nei semi del pisello. Questo risultato sta ad indicare come i biofenoli presenti nella matrice dei semi di pisello siano prevalentemente strutturali come si può evincere anche dalla loro natura chimica di fenoli acidi. Una situazione simile è riscontrabile nelle matrici cerealicole anch'esse caratterizzate da acido ferulico e acidi cinnamici in genere. Le attività enzimatiche per destrutturare le pareti vegetali delle monocotiledoni dei cereali sembrano le medesime utili per idrolizzare quelle delle dicotiledoni del pisello a sostenere il fatto che probabilmente queste due matrici vegetali non sono molto dissimili. In realtà, mentre nel caso del pisello abbiamo un recupero completo dei polifenoli presenti nella struttura vegetale di tale matrice, per la crusca di grano, matrice di tipo monocotiledone, utilizzando le stesse attività enzimatiche, si riesce a recuperare solamente un 30% dell'acido ferulico (fenolo acido che rappresenta più dell'80% del contenuto fenolico) in essa presente. Questo indica che mentre la matrice vegetale amidacea del

pisello viene completamente destrutturata dagli enzimi Celluclast BG e Fungamyl Super AX, quella della crusca di tipo più celluloso, risulta essere un substrato meno affine e quindi più difficile da disgregare⁴⁵.

4.2.4. Determinazione del Potere Antiossidante Totale

Una volta determinata la concentrazione di polifenoli nell'estratto acquoso, si è passati alla determinazione del potere antiossidante.

Da un punto di vista chimico, gli antiossidanti sono sostanze (molecole, ioni, radicali) che rallentano o prevengono l'ossidazione di altre sostanze. L'azione antiossidante di alcuni composti delle matrici vegetali, in particolare i polifenoli, è mirata a contrastare o inibire la formazione dei composti reattivi dell'ossigeno (radicali liberi) che si formano durante il normale metabolismo cellulare e che possono indurre danni alle strutture cellulari tra cui le membrane cellulari e gli acidi nucleici.

L'indice di misurazione del potere antiossidante è l'ORAC (Oxygen Radicals Adsorbance Capacity), un'unità di misura che determina appunto la capacità di assorbire i radicali liberi; i risultati vengono riportati come μmol di Trolox Equivalenti per litro di idrolizzato (TE/L).

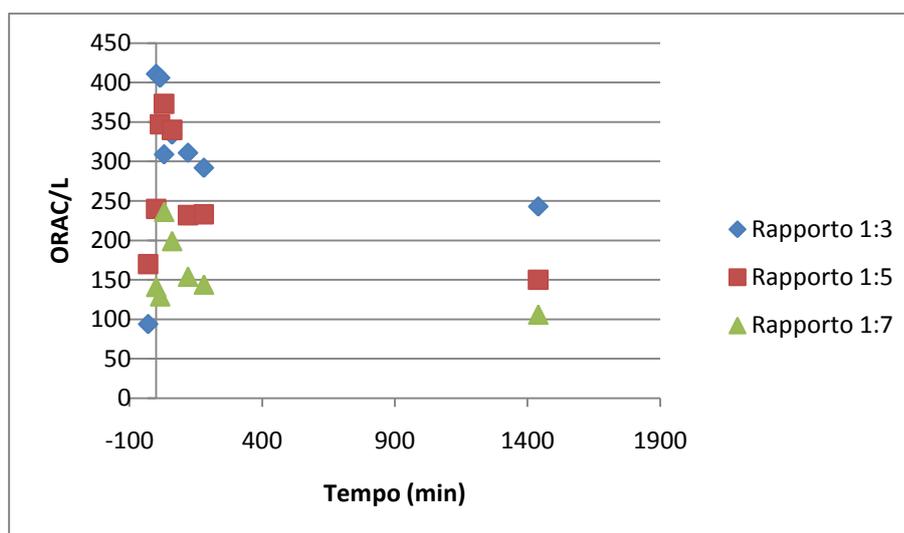


Figura 4-5: variazione indice ORAC nel tempo relativo ai diversi rapporti semi di pisello:acqua sottoposti a trattamento meccanico, termico ed enzimatico

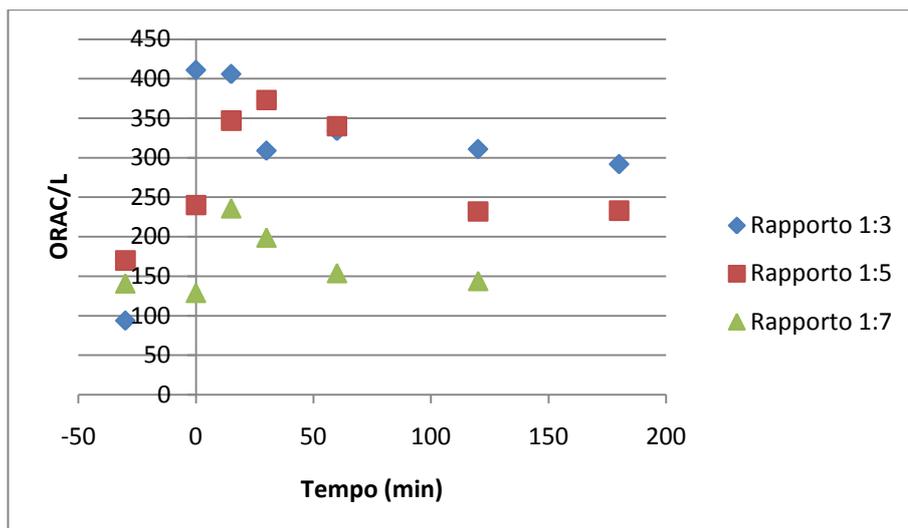


Figura 4-6: variazione indice ORAC nelle prime tre ore di trattamento enzimatico

Dal grafico riportato in Figura 4-6 è possibile notare come, per tutti i rapporti semi di pisello:acqua considerati, si registra un aumento del potere antiossidante dopo il trattamento meccanico, termico ed i primi minuti del trattamento enzimatico; tali differenze possono essere semplicemente attribuite ad un effetto diluizione legato alla maggior quantità di acqua utilizzata nei sistemi relativi ai rapporti 1:5 e 1:7 rispetto al rapporto 1:3.

Inoltre, dal grafico riportato in Figura 4-5, si può notare che il potere antiossidante dei diversi campioni tende a diminuire progressivamente nel tempo fino a valori pari a 243 ORAC/l per il rapporto 1:3, 150 ORAC/l per il rapporto 1:5 e 106 ORAC/l per il rapporto 1:7; ciò potrebbe essere causato dal fatto che essendo il trattamento enzimatico protratto per un arco di tempo elevato, si possono verificare fenomeni di ossidazione dovuti ad esempio ad un contatto del campione con l'ossigeno atmosferico che va a ridurre la quantità di molecole antiossidanti non fenoliche in soluzione.

4.3 Determinazione del rapporto ottimale tra la matrice vegetale e il volume d'acqua di reazione in funzione del trattamento meccanico, termico ed enzimatico dei baccelli di pisello

Per lo studio del baccello viene applicata una procedura analoga a quella precedente e, anche in questo caso, i risultati vengono espressi in termini di rilascio in soluzione nel tempo delle varie componenti chimiche studiate.

4.3.1 Determinazione del rilascio di zuccheri riducenti

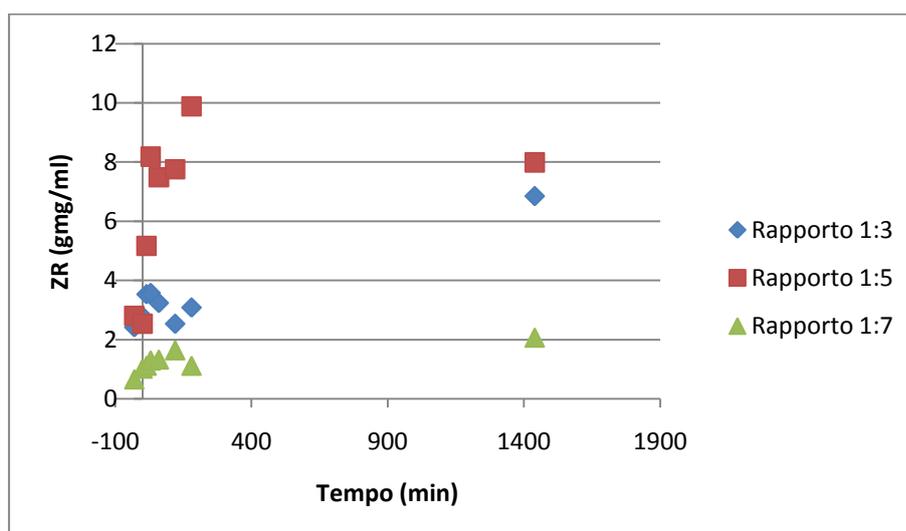


Figura 4-7: Rilascio nel tempo di zuccheri riducenti espresso come $\text{mg}_{\text{glucosio}}/\text{ml}_{\text{soluzione}}$ relativo ai diversi rapporti baccello:acqua sottoposti a trattamento meccanico, termico ed enzimatico

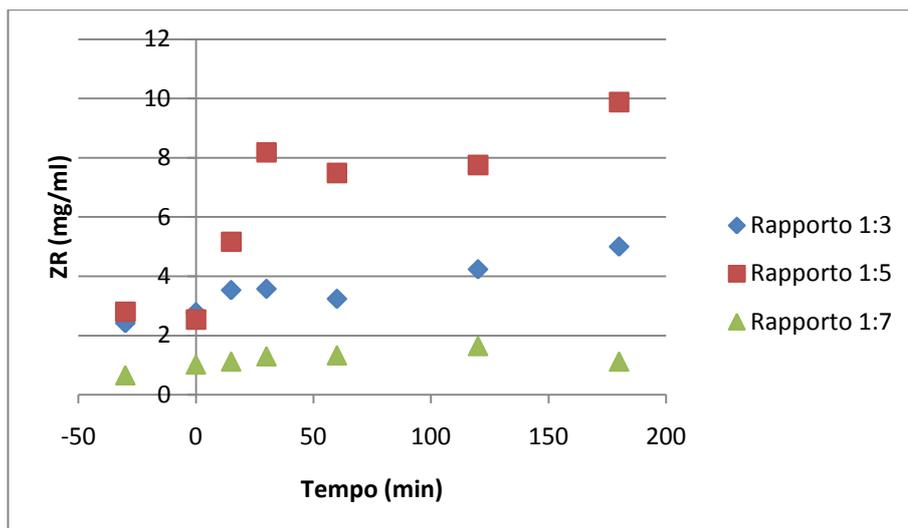


Figura 4-8: rilascio nel tempo di zuccheri riducenti, espresso come $\text{mg}_{\text{glucosio equivalente}} / \text{ml}_{\text{soluzione}}$ dopo trattamento meccanico, termico e dopo tre ore di trattamento enzimatico

Dal grafico riportato in Figura 4-7 è possibile osservare come, per tutti i rapporti baccello:acqua considerati, si ha un aumento del contenuto di zuccheri riducenti al termine del trattamento enzimatico. Per ciò che riguarda il rilascio di zuccheri riducenti, prima e dopo l'operazione di bollitura, non si osserva un incremento di concentrazione in soluzione rispetto a quanto accade dopo l'aggiunta degli enzimi in cui la concentrazione aumenta fino a 4 volte come nel caso del rapporto 1:5 (Figura 4-8). Tale fenomeno giustifica il fatto che nel baccello non vi è la presenza una elevata quantità di zuccheri semplici poiché il rilascio diventa significativo soltanto dopo l'idrolisi enzimatica. Anche in questo caso come in quello dei semi di pisello, possiamo notare che il rapporto 1:5 è quello ottimale per il rilascio degli zuccheri che si assestano a valori assoluti di 7,98 mg/ml per il rapporto 1:5, 6,85 mg/ml per il rapporto 1:3 e 2,07 mg/ml per il rapporto 1:7, rispettivamente.

4.3.2 Determinazione dei carboidrati totali

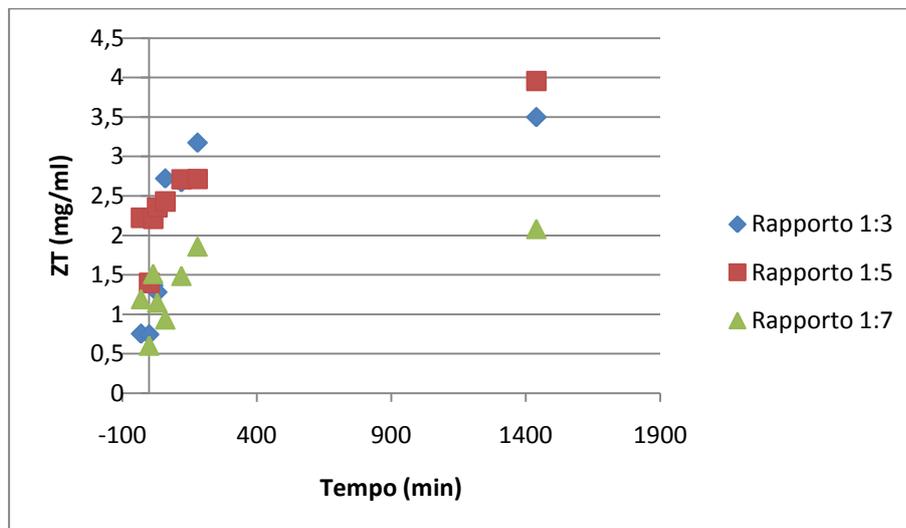


Figura 4-9: rilascio nel tempo di carboidrati totali espresso come media $\text{mg}_{\text{glucosio}} \text{equivalente}/\text{ml}_{\text{soluzione}}$, relativo ai diversi rapporti baccello:acqua sottoposti a trattamento meccanico, termico ed enzimatico

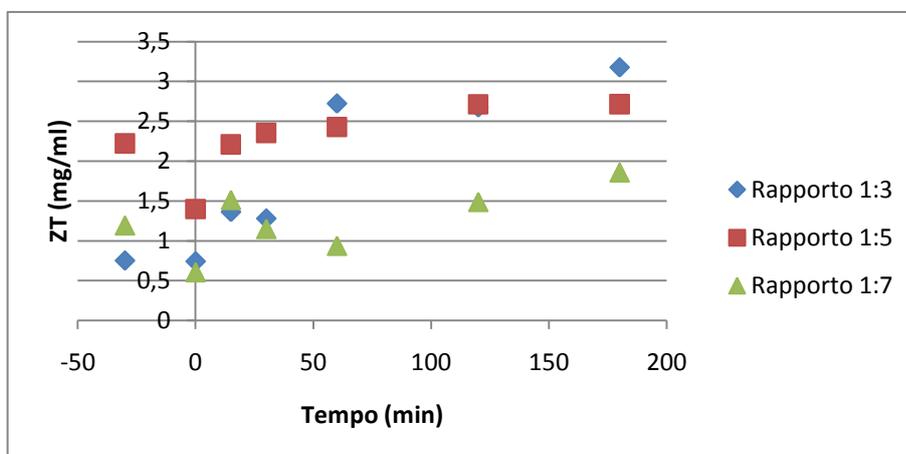


Figura 4-10: rilascio nel tempo di carboidrati totali, espresso come $\text{mg}_{\text{glucosio}} \text{equivalente}/\text{ml}_{\text{soluzione}}$ dopo trattamento meccanico, termico e dopo tre ore di trattamento enzimatico

L'andamento della distribuzione dei carboidrati totali è molto simile a quella rilevata per gli zuccheri riducenti in cui il rilascio massimo si è osservato per il rapporto 1:5 (Figura 4-9). Tuttavia, i valori assoluti del rilascio presentano il rapporto 1:7 come la condizione peggiore in quanto le quantità assolute rilasciate sono 3,95 mg/ml per il rapporto 1:5, 2,08

mg/ml per il rapporto 1:7 e 3,50 mg/ml per il rapporto 1:3, rispettivamente. La quantità di zuccheri semplici nella matrice è comunque bassa come dimostrano le scarse concentrazioni dopo il trattamento meccanico e termico.

4.3.3 Determinazione del rilascio di polifenoli totali

La determinazione della quantità totale di polifenoli liberata può essere un indice significativo dell'azione idrolitica degli enzimi sul tessuto vegetale.

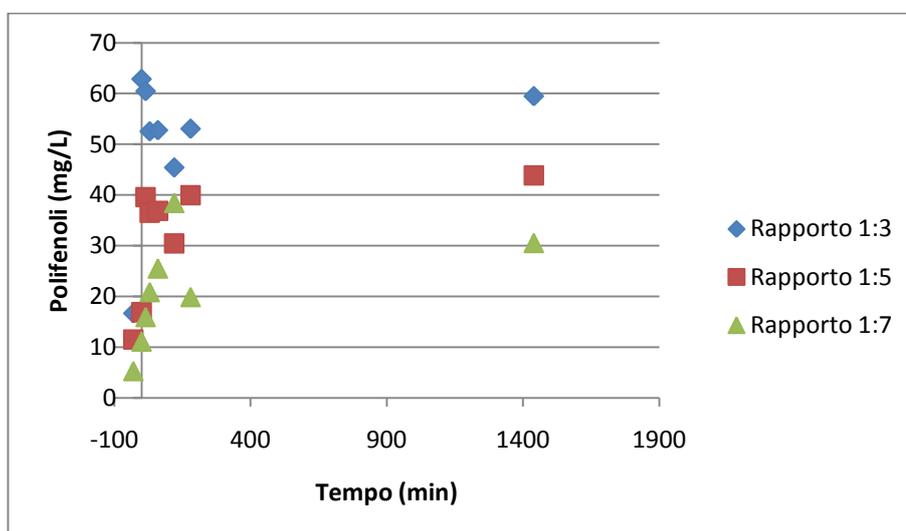


Figura 4-11: rilascio nel tempo di polifenoli totali espresso come $\text{mg}_{\text{catechina}}/\text{L}_{\text{soluzione}}$ relativo ai diversi rapporti baccello:acqua sottoposti a trattamento meccanico, termico ed enzimatico

Dal grafico riportato in Figura 4-11 è possibile osservare come, per tutti i rapporti baccello:acqua analizzati, si ha un netto aumento del rilascio di polifenoli in soluzione acquosa già dopo i primi 15 minuti di trattamento enzimatico al quale il campione viene sottoposto. Inoltre, è possibile notare come le differenze che si riscontrano negli andamenti dei vari campioni sottoposti a trattamento meccanico, termico ed enzimatico siano attribuibili ad un effetto diluizione legato ad una maggior quantitativo di acqua dei rapporti 1:5 e 1:7 rispetto al rapporto 1:3.

4.3.4 Determinazione del Potere Antiossidante Totale

Una volta determinata la concentrazione di polifenoli nell'estratto acquoso, si è passati alla determinazione del potere antiossidante.

Da un punto di vista chimico, gli antiossidanti sono sostanze (molecole, ioni, radicali) che rallentano o prevengono l'ossidazione di altre sostanze. L'azione antiossidante di alcuni composti delle matrici vegetali, in particolare i polifenoli, è mirata a contrastare o inibire la formazione dei composti reattivi dell'ossigeno (radicali liberi) che si formano durante il normale metabolismo cellulare e che possono indurre danni alle strutture cellulari tra cui le membrane cellulari e gli acidi nucleici.

L'indice di misurazione del potere antiossidante è l'ORAC (Oxygen Radicals Adsorbance Capacity), un'unità di misura che determina appunto la capacità di assorbire i radicali liberi; i risultati vengono riportati come μmol di Trolox Equivalenti per litro di idrolizzato (TE/L).

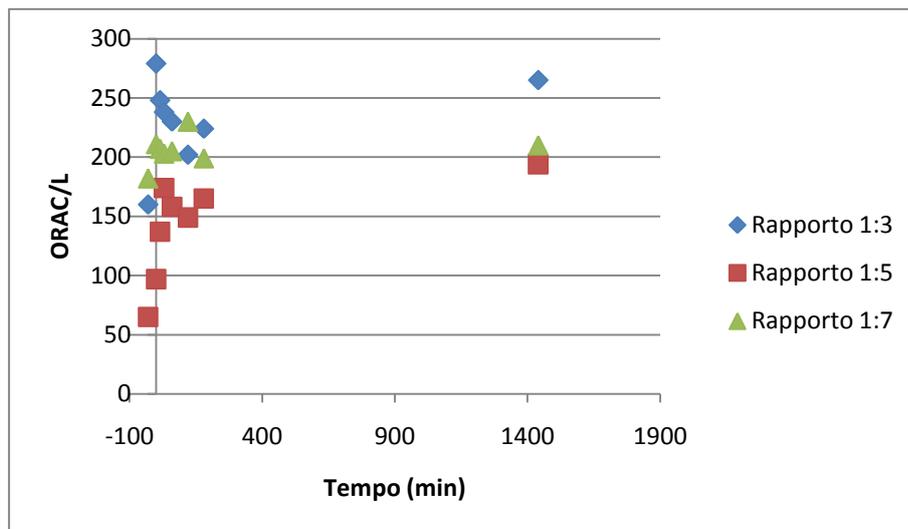


Figura 4-12: variazione indice ORAC nel tempo relativo ai diversi rapporti baccello:acqua sottoposti a trattamento meccanico, termico ed enzimatico

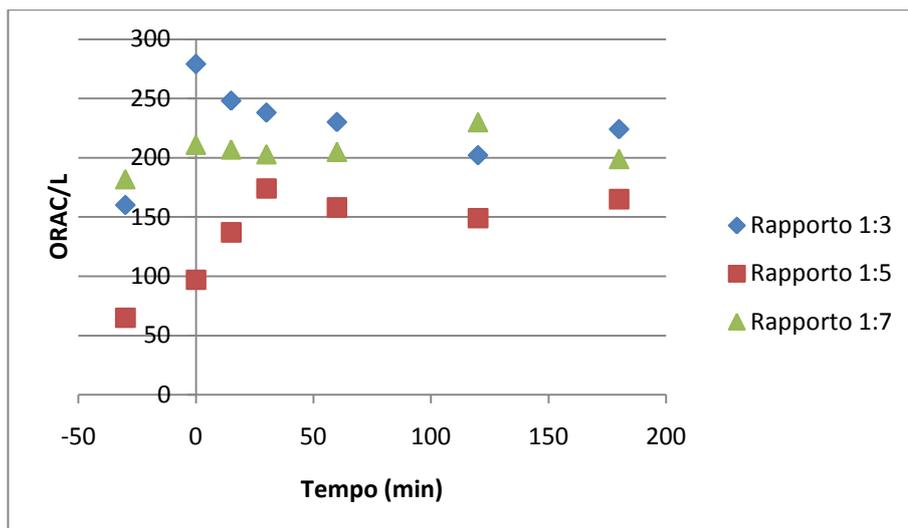


Figura 4-13: variazione indice ORAC dopo trattamento meccanico, termico e dopo tre ore di trattamento enzimatico

Dal grafico riportato in Figura 4-13 è possibile osservare come, per tutti i rapporti baccello:acqua considerati si ha un aumento del potere antiossidante subito dopo la bollitura dei diversi campioni.

Tali valori, come mostrato dal grafico riportato in Figura 4-12, sono pressoché uguali a quelli ottenuti al termine del periodo della cinetica ovvero rapporto 1:3 280 ORAC/l, rapporto 1:5 200 ORAC/l e rapporto 1:7 220 ORAC/l.

4.4 Analisi delle proteine sugli idrolizzati di semi di pisello e di baccelli

4.4.1 Determinazione del contenuto di proteine totali del seme di *Pisum Sativum L.*

Le proteine sono i costituenti fondamentali di tutte le cellule vegetali; da un punto di vista chimico sono dei polimeri di residui amminoacidi, uniti mediante un legame peptidico.

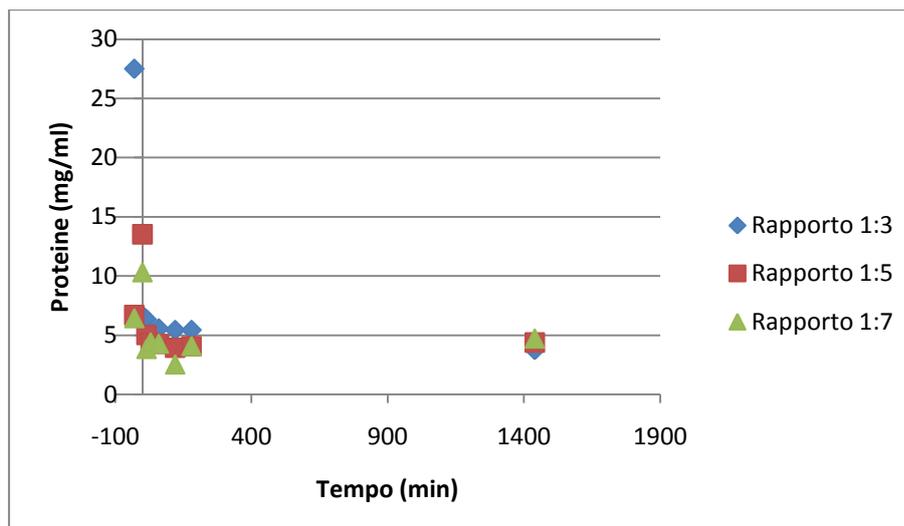


Figura 4-14: Rilascio nel tempo delle proteine totali espresso come $\text{mg}_{\text{BSA protein standard}}/\text{ml}_{\text{soluzione}}$, relativo ai diversi rapporti semi di pisello:acqua sottoposti a trattamento meccanico, termico ed enzimatico

Dal grafico riportato in Figura 4-14, è possibile osservare come, per tutti i rapporti semi di pisello:acqua considerati, si ha un netto calo del contenuto proteico subito dopo la bollitura dei diversi campioni. Tali valori pressoché uguali per tutti i rapporti considerati (circa 5,00 mg/ml), restano costanti durante tutto il periodo della cinetica. La netta diminuzione del contenuto proteico che si riscontra subito dopo la bollitura, è probabilmente da imputarsi ad una instabilità delle proteine contenute nei semi di pisello una volta sottoposte ad un trattamento termico ad alte temperature in particolare ad una coagulazione delle albumine⁴⁶.

4.4.2 Determinazione del contenuto di proteine totali nel baccello di pisello

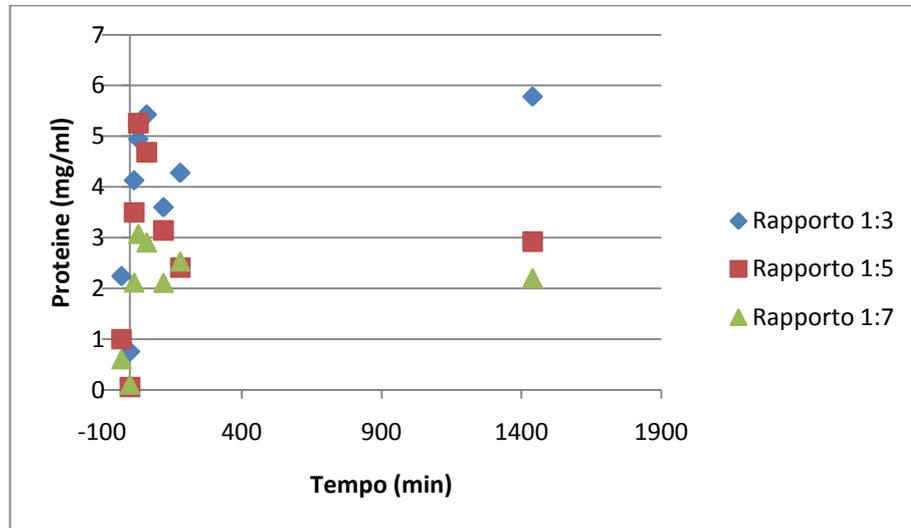


Figura 4-15: rilascio nel tempo delle proteine totali espresso come $\text{mg}_{\text{BSA protein standard}}/\text{ml}_{\text{soluzione}}$ relativo ai diversi rapporti baccello:acqua sottoposti a trattamento meccanico, termico ed enzimatico

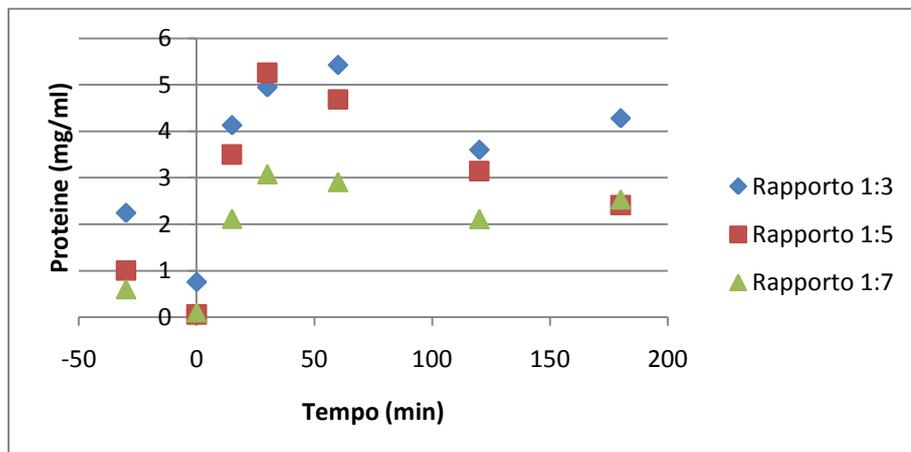


Figura 4-16: rilascio nel tempo di proteine totali, espresso come $\text{mg}_{\text{BSA protein standard}}/\text{ml}_{\text{soluzione}}$, nelle prime tre ore di trattamento enzimatico

Dal grafico riportato in Figura 4-16, è possibile osservare come, per tutti i rapporti baccello: acqua considerati, si ha un calo del contenuto proteico subito dopo la bollitura dei diversi campioni come già riscontrato in precedenza nel caso dei semi di pisello; probabilmente ciò è da imputare

ad una instabilità delle proteine una volta sottoposte ad un trattamento termico ad alte temperature.

In questo caso però a differenza del precedente, una volta aggiunto il mix enzimatico Fungamyl Super AX e Celluclast, si osserva un aumento di proteine rilasciate in soluzione che tende poi a rimanere costante già dopo le prime ore di trattamento enzimatico (Figura 4-15).

Al fine di dimostrare quanto ipotizzato nei paragrafi precedenti relativamente al calo proteico in soluzione riscontrato per entrambe le matrici dopo il trattamento termico della bollitura, sono stati analizzati campioni di matrice vegetale:acqua in rapporto 1:3; essi sono stati trattati meccanicamente mediante frullatura servendosi di un mixer da cucina; la frazione liquida è stata centrifugata al fine di ottenere un surnatante limpido (nel caso in cui è presente del solido occorre effettuare un'ulteriore filtrazione su carta); il sistema, munito di termometro, è stato riscaldato fino ad ebollizione effettuando inizialmente prelievi a temperature diverse e, una volta iniziata l'ebollizione, facendo dei prelievi a tempi diversi.

Successivamente il calcolo delle proteine è stato effettuato utilizzando la procedura descritta nel paragrafo 3.5. La concentrazione di proteine in soluzione cala progressivamente aumentando la temperatura della soluzione (Figura 4-17) e, dopo la bollitura, il surnatante ha assunto una colorazione giallo limone con una notevole quantità di precipitato. L'analisi delle proteine ha evidenziato un calo di 5 volte della concentrazione iniziale (Figura 4-18).

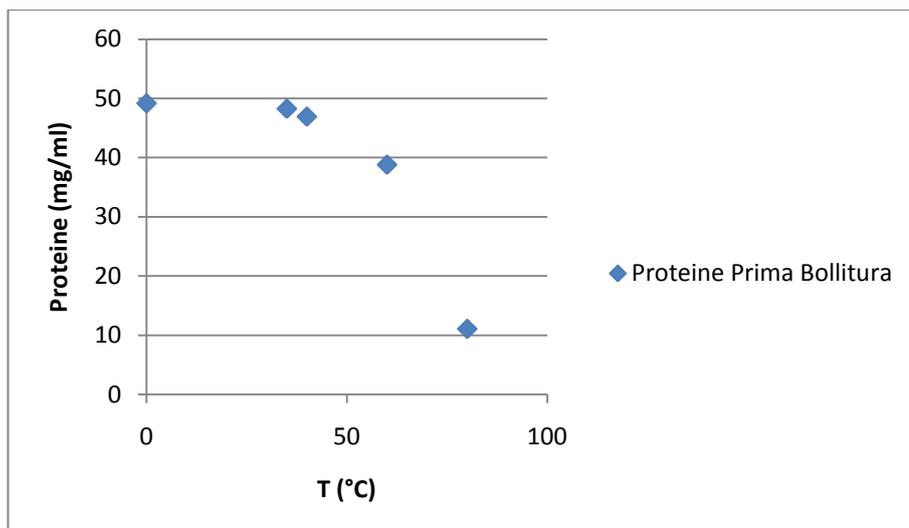


Figura 4-17: rilascio delle proteine totali in funzione della temperatura espresso come $\text{mg}_{\text{BSA protein standard}}/\text{ml}_{\text{soluzione}}$.

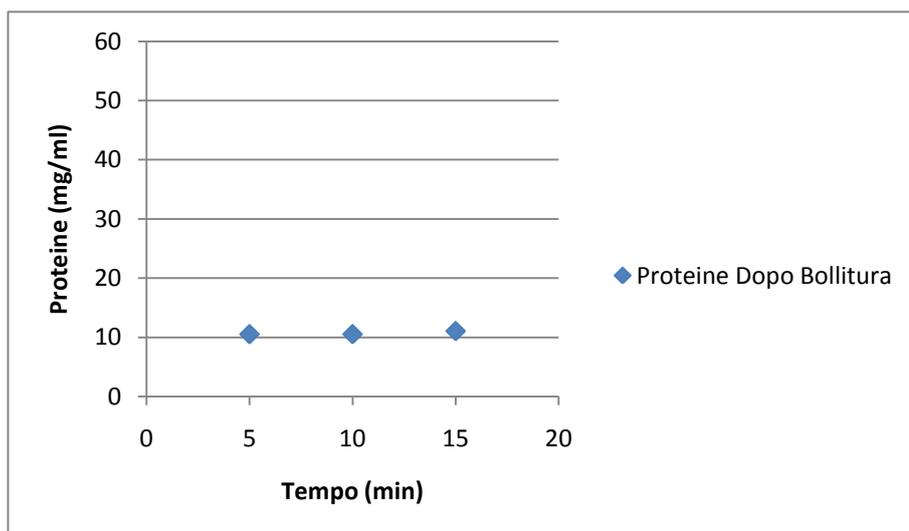


Figura 4-18: rilascio delle proteine totali in funzione del tempo espresso come $\text{mg}_{\text{BSA protein standard}}/\text{ml}_{\text{soluzione}}$.

Ciò è dovuto al fatto che il trattamento di cottura al quale è sottoposto il pisello, è in grado di modificarne in maniera irreversibile la composizione nutrizionale, in particolare, per ciò che riguarda il suo contenuto proteico⁴⁷.

La concentrazione iniziale di proteine nel surnatante derivante dal baccello risulta inferiore rispetto a quella osservata nel seme di pisello. Tuttavia, il comportamento rispetto alla temperatura non risulta dissimile con una riduzione consistente dopo i 50°C (Figura 4-19); dopo bollitura il

surnatante, il quale ha assunto una colorazione giallo arancio, presenta una concentrazione di proteine ridotta di 3 volte rispetto a quella iniziale (Figura 4-20).

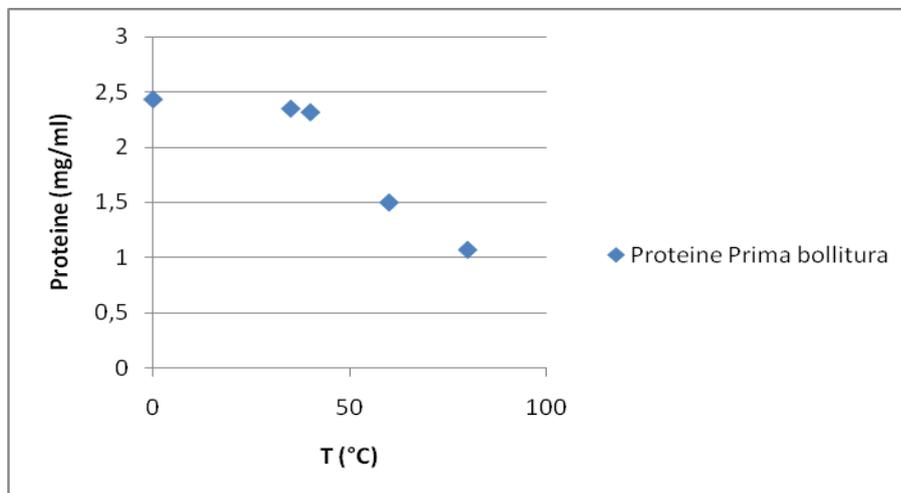


Figura 4-19: rilascio delle proteine totali del baccello di pisello in funzione della temperatura espresso come $\text{mg}_{\text{BSA protein standard}}/\text{ml}_{\text{soluzione}}$

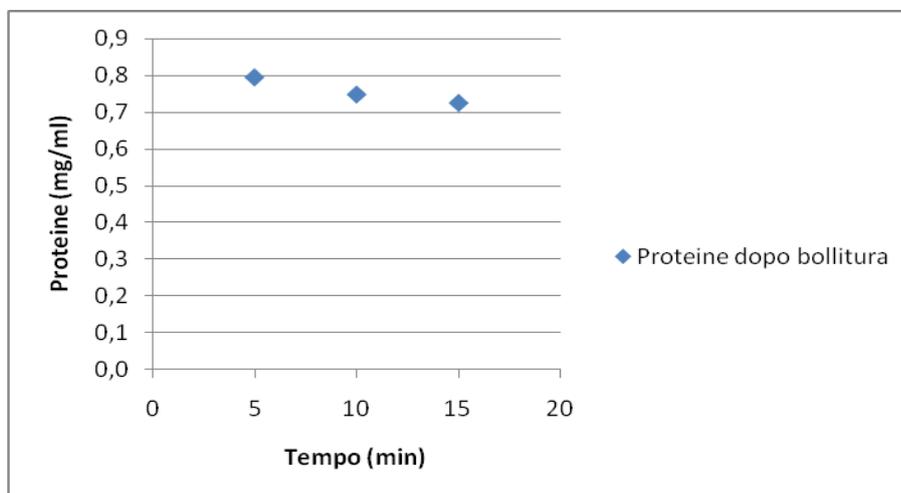


Figura 4-20: rilascio delle proteine totali del baccello di pisello in funzione del tempo espresso come $\text{mg}_{\text{BSA protein standard}}/\text{ml}_{\text{soluzione}}$.

4.4.3 Analisi amminoacidi con metodo della ninidrina

Il metodo riconoscitivo e quantitativo utilizzato per l'analisi degli amminoacidi è il metodo alla ninidrina secondo *Moore-Stain et al.*; la ninidrina (1,2,3-indantrione monoidrato) è un indicatore altamente specifico per il rilevamento degli amminoacidi con gruppo amminico primario in quanto reagisce con essi dando una colorazione azzurro-violetto (assorbimento a 570 nm), tranne che con la prolina con il quale forma un complesso giallo (assorbimento a 440 nm); tale reazione è abbastanza veloce ma, talvolta, per velocizzare è necessario riscaldare per pochi minuti ovvero, nel caso specifico, per tre minuti (Paragrafo 3.8).

Tale saggio viene effettuato su entrambi i solidi derivanti dalla bollitura dei surnatanti ottenuti previa frullatura di entrambe le matrici oggetto dello studio: semi di pisello e baccello di pisello. Entrambi gli estratti vengono opportunamente diluiti per ottenere delle concentrazioni pari a quelle della retta di taratura (150,00 µg/ml); a tali soluzioni viene poi aggiunto il preparato enzimatico Maxazyme e viene fatta partire la cinetica effettuando dei prelievi ai vari tempi; il contenuto di ogni prelievo è successivamente posto in heppendorf contenenti già 0,7 ml di ninidrina e poste in un bagno d'acqua a 100°C per 3 minuti; al termine di tale tempo ogni aliquota viene centrifugata (3 minuti ad una velocità di 130 RPM x 100) e viene effettuata la lettura dell'assorbanza a 550 nm.

La prima osservazione fatta è che, mentre il solido derivante dal trattamento del surnatante ottenuto dalla frullatura in acqua dei semi del pisello è a carattere ceroso e si scioglie pochissimo in acqua rendendola torbida, il solido derivante dal trattamento del baccello del pisello non si solubilizza in acqua, ma va a formare due fasi ben distinte.

Per quanto riguarda i campioni di solido da baccello del pisello, questi una volta trattati con l'enzima Maxazyme e successivamente analizzati con ninidrina come descritto in precedenza, non danno alcuna colorazione, rendendo quindi impossibile valutare se effettivamente tale solido è costituito da proteine precipitate. La matrice costituita da baccello del pisello aveva comunque permesso un recupero estremamente basso di proteine in soluzione pari a 2,50 mg/ml. Di queste proteine solo la metà veniva persa durante la fase di bollitura, una quantità probabilmente

troppo bassa per essere messa in evidenza con l'analisi della ninidrina per il contenuto amminoacidico.

Nel caso del solido da semi del pisello, l'andamento del rilascio di amminoacidi in soluzione ad opera dell'enzima Maxazyme è riportato nel grafico di Figura 4-21.

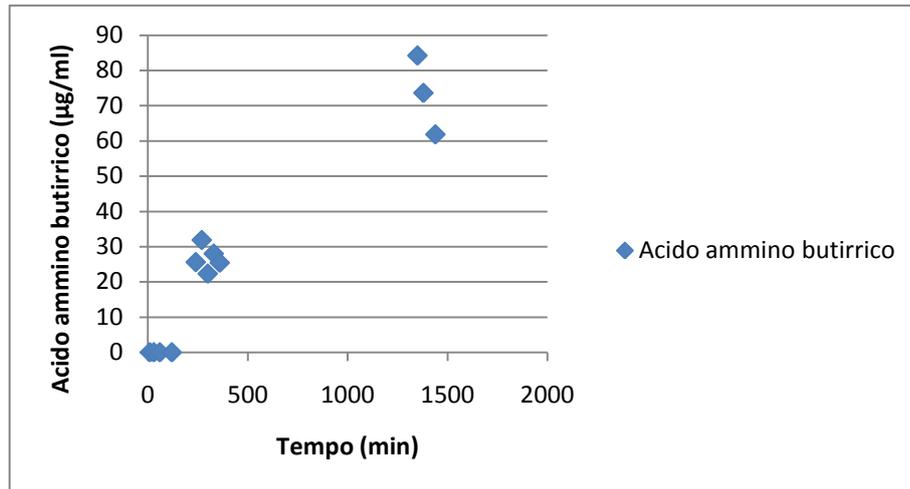


Figura 4-21: rilascio dell'acido ammino butirrico del campione sottoposto a trattamento enzimatico

È possibile osservare la presenza di amminoacidi rilasciati in soluzione nei campioni solo dopo 4 ore di trattamento enzimatico con proteasi, tale rilascio aumenta fino a circa 60,15 µg/ml dopo le 24 ore di proteolisi.

4.5 Studio dell'influenza di differenti trattamenti enzimatici nella determinazione delle componenti chimiche del *Pisum Sativum* L. trattato meccanicamente e termicamente.

Dopo lo studio relativo al rapporto fra matrice vegetale e acqua, finalizzato a identificare il rapporto ottimale, è stato valutato l'utilizzo di selezionati enzimi idrolitici per permettere un'idrolisi mirata della matrice vegetale. A questo scopo sono stati utilizzati sia dei preparati commerciali enzimatici che amilasi da laboratorio.

Si è deciso di trattare il campione separatamente con due diversi enzimi, Cytolase M102 e Rapidase C80 Max le cui attività caratteristiche sono riportate in Tabella 8 e confrontate con quelle del Celluclast BG e del Fungamyl precedentemente utilizzati.

Attività Enzimatiche (µmol/ml*min)	Cytolase M 102	Rapidase C80 MAX
PECTINASICA	10709,47	2001,90
XILANASICA	1584,85	293,25
AMILASICA	1031,51	35,23
GLUCOSIDICA	5,76	0,31
CELLULASICA	18,50	/
FERULOILESTERASICA	118,55	/
CAFFEILESTERASICA	63,72	/

Tabella 8: attività enzimatiche dell'enzima Cytolase M102 e Rapidase C80 Max

Il trattamento enzimatico è stato protratto per un tempo complessivo di 24 ore facendo dei prelievi ad intervalli di tempo regolari.

4.5.1 Determinazione del rilascio di zuccheri riducenti nei campioni di semi di pisello trattati enzimaticamente

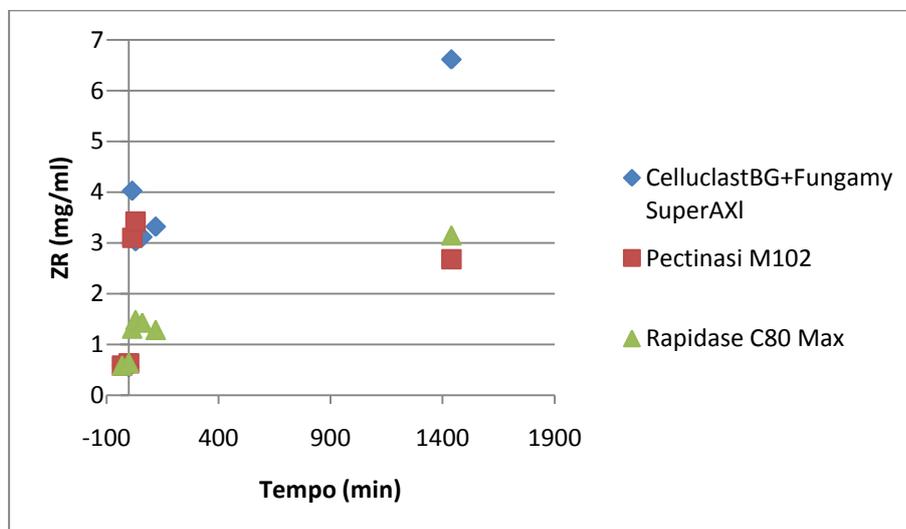


Figura 4-22: Rilascio nel tempo di zuccheri riducenti espresso come $\text{mg}_{\text{glucosio}}/\text{equivalente}/\text{ml}_{\text{soluzione}}$ per i campioni di seme di pisello in rapporto 1:3 trattati con enzimi diversi sottoposti ad azione meccanica e a riscaldamento

Dalla Figura 4-22 è possibile osservare che i sistemi enzimatici costituiti dal mix Celluclast BG e Fungamyl Super AX e dall'enzima Rapidase C80 Max permettono di ottenere un aumento della quantità di zuccheri riducenti rilasciati durante tutto il periodo di registrazione della cinetica. Per il mix enzimatico si riesce a rilasciare in soluzione una concentrazione di zuccheri riducenti pari a 6,61 mg/ml, mentre per l'enzima Rapidase C80 max, il rilascio è di 3,15 mg/ml e per l'enzima Cytolase M102 è di 2,68 mg/ml. Questi risultati confermano che la matrice di seme di pisello è particolarmente ricca di strutture arabinoxilaniche e di amidi in quanto le attività enzimatiche di questi preparati sono appunto xylanasiche e amilasiche.

4.5.2 Determinazione del rilascio dei carboidrati totali nei campioni di seme di pisello trattati enzimaticamente

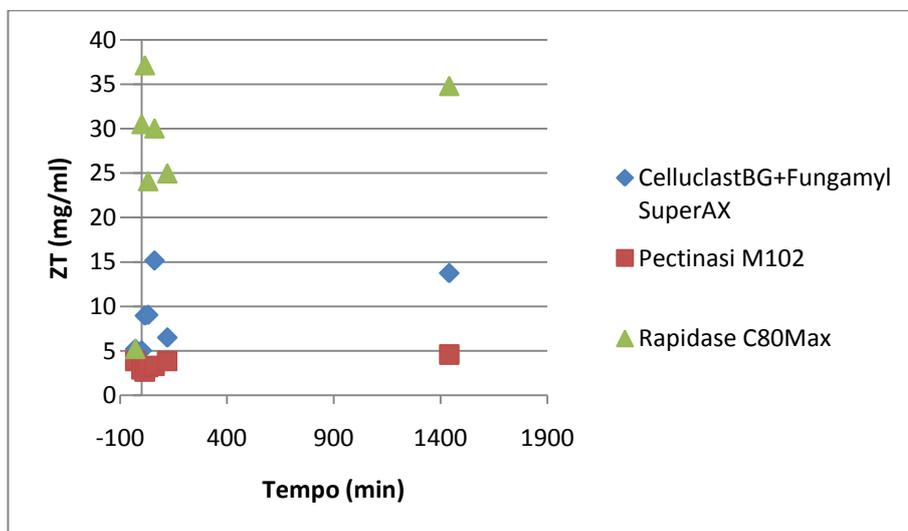


Figura 4-23: rilascio nel tempo di carboidrati totali espresso come media $\text{mg}_{\text{glucosio equivalente}}/\text{ml}_{\text{soluzione}}$, per i campioni di seme di pisello in rapporto 1:3 trattati con enzimi differenti, sottoposti ad azione meccanica e a riscaldamento

Dal grafico riportato in Figura 4-23 è possibile osservare andamenti diversi per ogni sistema enzimatico considerato: l'enzima Cytolase M102 non sembra apportare un aumento nel rilascio in soluzione dei carboidrati totali dopo i trattamenti meccanico e termico; aumenti nel rilascio delle componenti zuccherine si possono invece constatare nel caso del mix Celluclast BG e Fungamyl Super AX ed, in maniera ancora più evidente, con il Rapidase C80 Max che permette il rilascio in soluzione di 34,79 mg/ml di carboidrati totali dopo le 24 ore di trattamento enzimatico.

Il Rapidase C80 Max presenta ragionevolmente delle attività carboidrasiche in grado di idrolizzare la matrice vegetale senza produrre grandi quantità di zuccheri riducenti. L'attività del Rapidase potrebbe essere molto più simile a quella di una endo-carboidrasi a differenza di Celluclast BG e Fungamyl Super AX che presentano anche eso-carboidrasi.

4.5.3 Determinazione del rilascio di polifenoli totali nei campioni di seme di pisello trattati enzimaticamente

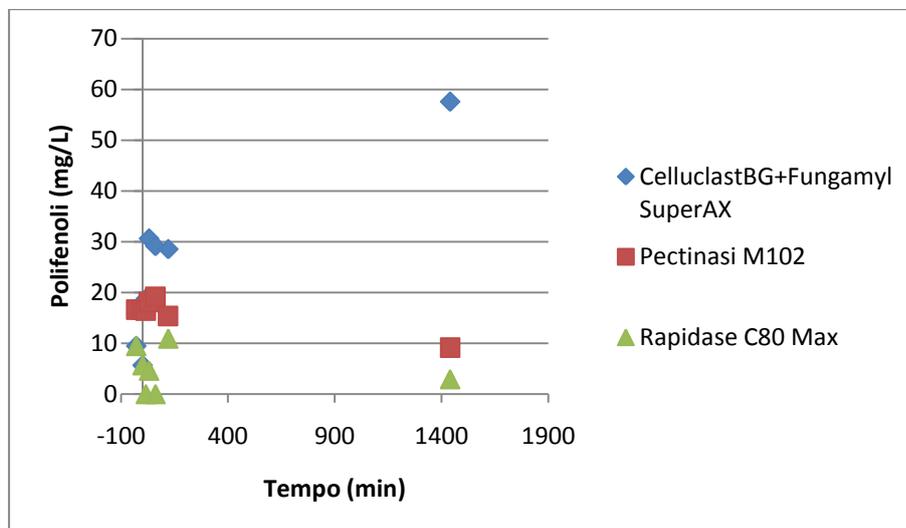


Figura 4-24: rilascio nel tempo dei polifenoli totali espresso come media $\text{mg catechina} / \text{L}_{\text{soluzione}}$, per i campioni di seme di pisello in rapporto 1:3 trattati con enzimi differenti, sottoposti ad azione meccanica e a riscaldamento

Dal grafico riportato in Figura 4-24 è possibile osservare che l'enzima più adatto per la liberazione dei polifenoli in soluzione acquosa è il mix Celluclast BG e Fungamyl Super AX in quanto è l'unico che permette di aumentare la resa di rilascio al termine del trattamento enzimatico arrivando a liberare in soluzione una concentrazione di polifenoli totali pari a $57,57 \text{ mg/L}$. Cytolase M102 e Rapidase C80 Max non risultano essere particolarmente adatti al recupero di queste componenti in quanto entrambe, alla fine del trattamento enzimatico, portano ad un quantitativo di polifenoli presenti in soluzione acquosa inferiore a $10,00 \text{ mg/l}$. Questo risultato conferma la presenza di eso-carboidrasi abbinate ad aril-esterasi nel Celluclast e nel Fungamyl. Tali attività giustificano la liberazione di biofenoli strutturali come i fenoli acidi (per esempio acido sirringico) di cui la matrice dovrebbe essere ricca⁴⁸.

4.5.4 Determinazione del Potere Antiossidante Totale nei campioni di seme di pisello trattati enzimaticamente

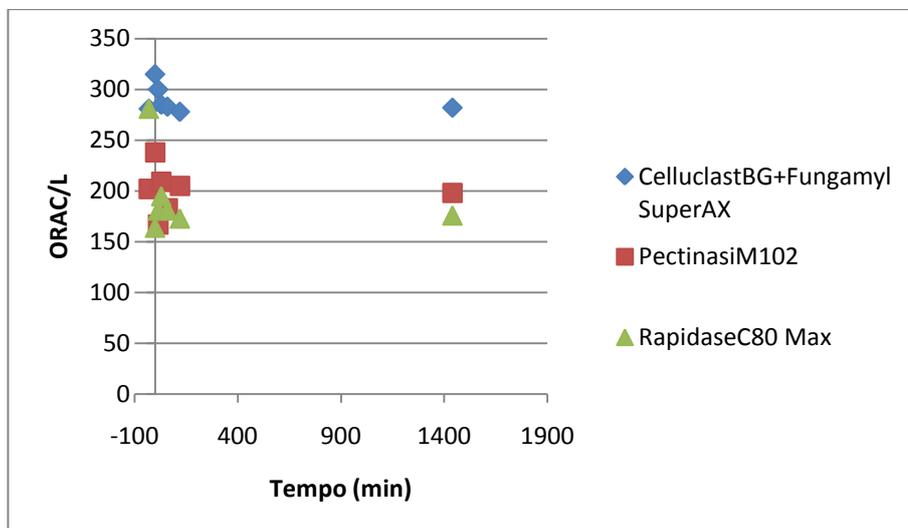


Figura 4-25: variazione indice ORAC, per i campioni di seme di pisello in rapporto 1:3 trattati con enzimi differenti, sottoposti ad azione meccanica e a riscaldamento

Dal grafico riportato in Figura 4-25 relativo all'andamento del potere antiossidante dell'idrolizzato enzimatico di semi di pisello, è possibile osservare per tutti i sistemi biocatalitici utilizzati, un leggero calo del potere antiossidante, probabilmente imputabile a reazioni di ossidazione ad opera dell'ossigeno atmosferico con cui i campioni sono venuti a contatto.

Inoltre i valori di ORAC/l osservati sembrano attestarsi su valori costanti già dopo i primi minuti di idrolisi enzimatica, e come riscontrato per il rilascio dei polifenoli, il sistema enzimatico ottimale è quello rappresentato dal mix Celluclast BG e Fungamyl Super AX.

4.5.5 Determinazione del contenuto di proteine totali nei campioni di seme di pisello trattati enzimaticamente

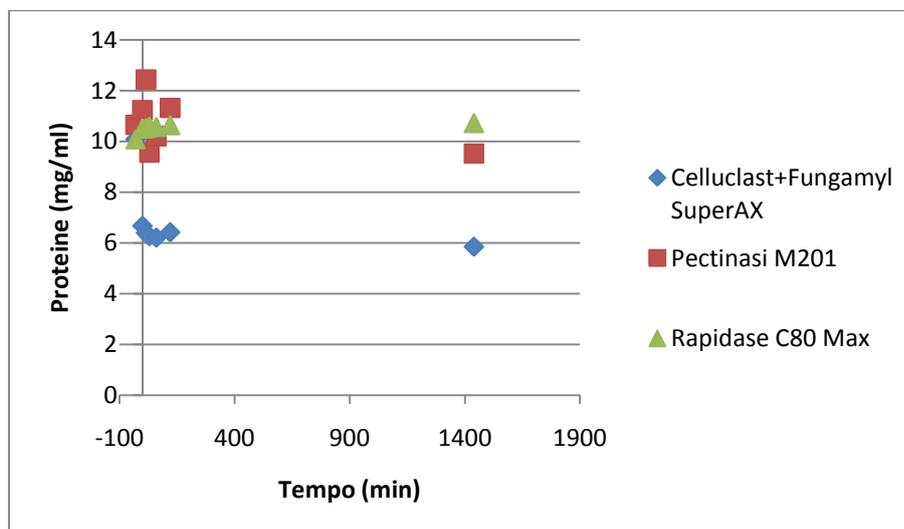


Figura 4-26: rilascio nel tempo delle proteine totali espresso come media $\text{mg}_{\text{BSA protein standard}}/\text{ml}_{\text{soluzione}}$, per i campioni di seme di pisello in rapporto 1:3 trattati con enzimi differenti, sottoposti ad azione meccanica e a riscaldamento

Dal grafico riportato in

Figura 4-26 è possibile osservare come per i sistemi enzimatici Cytolase M102 e Rapidase C80 Max, il contenuto proteico rimane pressoché costante dopo ogni trattamento al quale il campione viene sottoposto, ovvero trattamento meccanico, termico ed enzimatico; nel caso del mix Celluclast BG e Fungamyl Super AX, come già riscontrato dalle prove precedenti, si ha un calo netto del contenuto proteico subito dopo la bollitura che si attesta intorno a 6,0 mg/ml di concentrazione di proteine in soluzione, rimanendo costante per tutto il periodo di registrazione della cinetica.

5 CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi, si è valutata la possibilità valorizzare matrici vegetali mediante trattamenti biocatalitici; in particolare l'attenzione è stata focalizzata sul seme di pisello e sul suo scarto principale di lavorazione, il baccello.

Nella fase preliminare, sono state compiute prove caratterizzate da differenti rapporti fra la quantità di matrice vegetale ed i volumi di acqua nel quale sospenderla al fine di determinare la quantità ottimale di "solvente" necessaria per l'attività enzimatica ed i successivi campionamenti/test analitici. Tali prove erano anche mirate a verificare quale fosse il minor quantitativo di acqua indispensabile nella prospettiva di una industrializzazione dello studio.

Da tali prove è risultato che il rapporto ottimale di lavorazione è 1:5 in quanto, in queste condizioni, non sono stati riscontrati né problemi di saturazione del sistema, che impedirebbero il rilascio totale dei costituenti studiati, né processi di fermentazione paralleli che andrebbero a diminuire la quantità di zuccheri, sia riducenti che totali, rilasciati in soluzione.

Il confronto tra i risultati ottenuti per i semi di pisello ed il baccello, in termini di rilascio in soluzione delle varie componenti chimiche investigate, evidenzia che:

- il baccello è particolarmente ricco di frazioni polisaccaridiche prontamente idrolizzabile rispetto al seme in quanto rilascia una quantità maggiore di zuccheri riducenti e di carboidrati in soluzione;
- il seme risulta avere un potere antiossidante maggiore; ciò è confermato da valori più elevati di indice ORAC/l e da un maggior rilascio di polifenoli in soluzione;
- il contenuto proteico di entrambe le matrici risulta piuttosto simile sia in termini quantitativi che qualitativi in merito alla termostabilità delle proteine.

Allo scopo di preservare il contenuto proteico, quale frazione ad alto valore nutrizionale, in un'ottica di industrializzazione, è ipotizzabile saltare il trattamento termico e di sottoporre la matrice solo a trattamento

meccanico ed enzimatico in quanto la frazione proteica tende a precipitare quando l'idrolizzato viene sottoposto a 50-60°C.

Successivamente sono stati studiati diversi processi idrolitici attraverso selezionati enzimi al fine di valutare quali attività enzimatiche fossero più idonee alla destrutturazione della matrice vegetale. Gli enzimi utilizzati sono Rapidase C80 Max e Cytolase M102 in quantità pari all'1% p/p dei semi di pisello; effettuando un confronto tra i risultati ottenuti dai trattamenti dei vari enzimi, si può affermare che il mix Celluclast BG e Fungamyl Super AX è quello più efficace per l'idrolisi della matrice. Tale risultato risulta coerente con la struttura tipica dei semi di pisello che sembrano risultare sufficientemente ricchi di xylani e di amidi, ciò può essere evidenziato dal confronto delle tabelle nelle quali sono riportate i dati relativi alle attività xilanasiche ed amilasi che per il mix Celluclast BG e Fungamyl Super AX (Tabella 7) sono superiori rispetto al Cytolase M102 e Rapidase C80 Max (Tabella 8).

Le caratteristiche di matrici ricche di arabino-xylani è ulteriormente messa in evidenza dal rilascio di discrete quantità di biofenoli durante il trattamento enzimatico ragionevolmente ad opera delle attività aryl-esterasiche presenti nel Celluclast e nel Fungamyl. La quantità di biofenoli rilasciata lascia supporre strutture chimiche tipo acidi fenolici che sono riportati in letteratura come caratteristici nei baccelli.

Sia i semi di pisello che i baccelli si prestano quindi ad una valorizzazione chimica delle matrici. L'alto contenuto in proteine ed il significativo contenuto in biofenoli può rendere queste matrici interessanti per sviluppare ingredienti per il settore cosmetico ed alimentare.

Il processo di bioliquefazione può quindi incrementare la biodisponibilità dei principi attivi presenti nella matrice aprendo nuove possibili applicazioni.

6 BIBLIOGRAFIA

- ¹ Malpeli F., “I Sistemi di gestione ambientale: certificazioni ISO 14001 e registrazioni emas”, *Ingegneria Sanitaria ambientale 2002/2003*
- ² Achterholt S, Priefert H, Steinbüchel A. 2000. Identification of *Amycolatopsis* sp. strain HR167 genes, involved in the bioconversion of ferulic acid to vanillin. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:799-807
- ³ US Patent n° 6,869,974 B1.
- ⁴ Tae Ho Kim, Chang Gi Han and Chung Kun Song, (2008), “Instability of threshold voltage under constant bias stress in pentacene thin film transistors employing polyvinylphenol gate dielectric”, *Thin Solid Films*, 516, 6, 1232-1236
- ⁵ Grassi G. e Bridwater A.V. (1990) Biomass for energy and environmental, agriculture and industry in Europe – A strategy for the future. Commission of the European Communities.
- ⁶ The State of Food and Agriculture, FAO report (2005)
- ⁷ Dati ISTAT: www.istat.it
- ⁸ Di Blasi C., Tanzi V. e Lanzetta M. (1997), “A study on the production of agricultural residues in Italy”. *Biomass and Bioenergy*, 12, 321-331
- ⁹ http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/life/top_10_life.htm
- ¹⁰ <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/plants/cellwall.html>
- ¹¹ K.J. Johnson, B.J. Jones, C.J. Shultz, A. Babic, “Non enzymatic cell wall (glycol) protein”, in *THE PLANT CELL WALL Annual Plant Reviews, Vol. 8* pp.111-143, 2003.
- ¹² Craig B. Faulds, “Ferulic acid esterases from *Aspergillus niger*: their application in the biotransformation of agricultural residues”, PhD Thesis, University of East Anglia, 1997
- ¹³ S. Vorwerk, S. Somerville, C. Somerville; “The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance” *Trends in plant science*, 9, 203-209, 2004
- ¹⁴ Dal sito www.leziosa.com/piselli
- ¹⁵ Dal sito www.agraria.org/coltivazionierbacee/pisello
- ¹⁶ Dal sito www.leziosa.com/piselli
- ¹⁷ Dal sito www.ricette-cucina.eu

¹⁸ J.A. Steet and C.H. Tong; “Degradation kinetics of green color and chlorophylls in peas by colorimetry and HPLC” ; Journal of food science 61 (1996) 924-927

¹⁹ Craig A. Atkins, John Kuo and John S. Pate, Alastair M. Flinn and Treuor W. Steele “Photosynthetic pod wall of pea (*Pisum Sativum* L.). Distribution of carbon dioxide-fixing enzymes in relation to pod structure; Plant Physiol 60 (1977) 779-786

²⁰ Agnieszka Troszynska and Ewa Ciska, “Phenoli compounds of seed coats of white and coloured varieties of pea (*Pisum Sativum* L.) and their total antioxidant activity; Czech J. Food Sci. 20 (2002) 15-22

²¹ I. Mateos-Aparicio, A. Redondo-Cuenca, M. J. Villanueva-Suarez, “Isolation and characterization of cell wall polysaccharides from legume by-products: okara, pea pod and broad bean pod; Food Chemistry 122 (2010) 339-345

²² Rohit Sharma, Yusuf Chisti, Uttam Chand Banerjee, “Production, purification, characterization, and applications of lipases”, *Biotechnology Advances*, 19, 627–662, 2001

Han-Gyol Shin, Young-Min Choi, Ho-Kyoung Kim, Youn-Chul Ryu, Sang-Hoon Lee, Byoung-Chul Kim, “Tenderization and fragmentation of myofibrillar proteins in bovine *longissimus dorsi* muscle using proteolytic extract from *Sarcodon aspratu*’s, Article in Press, doi:10.1016/j.lwt.2007.08.019

²⁴ http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.4

²⁵ http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.78

http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.8

http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.151

²⁶ J’ulio Xandro Heck, Lu’is Henrique de Barros Soares, Plinho Francisco Hertz, Marco Ant’onio Z’achia Ayub, “Purification and properties of a xylanase produced by *Bacillus circulans* BL53 on solid-state cultivation”, *Biochemical Engineering Journal* 32 (2006) 179–184

²⁷ Seyis Isil, Aksoz Nilufer, “Investigation of Factors Affecting Xylanase Activity from *Trichoderma harzianum* 1073 D3”, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Vol.48, n. 2 : pp. 187-193, March 2005.

²⁸ http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.15

-
- http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.11
- http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=4.2.2.10
- ²⁹ Ranveer Singh Jayani, Shivalika Saxena, Reena Gupta, Microbial pectinolytic enzymes: A review, *Process Biochemistry*, 40 2931–2944, 2005
- ³⁰http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.15
- http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.11
- http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=4.2.2.10
- ³¹ Carloni F., “Valorizzazione degli scarti dell’industria olearia tramite il recupero di sostanze fenoliche e la produzione di alcool etilico per via fermentative”, *Tesi di Laurea in Chimica Industriale*, Università di Bologna, 2003-2004
- ³² Crepin, V.F., Faulds, C.B., Connerton, I.F., “Functional classification of the microbial feruloyl esterases”. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 647–652, 2004.
- ³³http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.15
- http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.11
- http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=4.2.2.10
- ³⁴http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.4.4.4.
- http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.4.4.5.
- http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.4.4.10.
- http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.4.2.1.
- http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.4.4.1.
- ³⁵http://rivistedigitali.com/Industria_della_carta/2009/4/.../scaricaPDF
www.psemib.com/dwn/enz3/archeappl.ppt
- ³⁶ Muralikrishna and M. Nirmala “Cereal α -amylases-an overview” *Carbohydrate Polymers* Volume 60, Issue 2, 6 May 2005, 163-173
- ³⁷ Zanichelli D., “Processi di Biorefinning per l’estrazione di secondary chemical building blocks da sottoprodotti dell’agroindustria”, tesi di dottorato (2008)
- ³⁸ Bailey M.J., Biely P., Poutanen K., “Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity”, *Journal of Biotechnology*, 23, 257-270, 1992

³⁹ Bradford, M. M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry* 72 (1976) 248-254

⁴⁰ Di Stefano, Cravero, Gentilini, Vignevini, *1/2*, 47-52, 1998

⁴¹ Donglin Zhang, Yasunori Hamauzu, "Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and its antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking", *Food Chemistry*, 88, 2004, 503-509

⁴² Chaplin M.F., Kennedy J.F., Colorimetric assay, *Carbohydrate analysis*, 1986 Mecozzi M., Acquistucci R., Amici M., Cardilli D., Improvement of an ultrasound assisted method for the analysis of total carbohydrate in environmental and food samples, *Ultrasonics Sonochemistry* 9, 219-223, 2002

⁴³ Dubois M, Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substances, Division of Biochemistry, University of Minnesota

⁴⁴ Agnieszka Troszynska and Ewa Ciska, "Phenolic compounds of seed coats of white and coloured varieties of pea (*Pisum Sativum* L.) and their total antioxidant activity; *Czech J. Food Sci.* 20 (2002) 15-22

⁴⁵ Zanichelli D., "Processi di Biorefining per l'estrazione di secondary chemical building blocks da sottoprodotti dell'agroindustria", tesi di dottorato (2008)

⁴⁶ Dal sito <http://www.innovativo.it>

⁴⁷ Dal sito <http://www.innovativo.it>

⁴⁸ I. Mateos-Aparicio, A. Redondo-Cuenca, M. J. Villanueva-Suarez, "Isolation and characterization of cell wall polysaccharides from legume by-products: okara, pea pod and broad bean pod; *Food Chemistry* 122 (2010) 339-345