

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

---

SCUOLA DI SCIENZE

Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Corso di Laurea Magistrale in

**Chimica Industriale**

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

Nuovi prodotti da scarti di *Punica granatum*  
per formulazioni biocosmetiche

Tesi di laurea sperimentale

**CANDIDATO**

Federica Baroncini

**RELATORE**

**Chiar.mo Prof.** Leonardo Setti

**CORRELATORE**

**Dott.ssa** Irene Maggiore

---

**Anno Accademico 2018-2019**

---



## Sommario

1.1	Il concetto di bioraffineria ed economia circolare.....	1
1.1.1	Le biomasse: composizione e processi di trasformazione .....	3
1.2	La cellula vegetale.....	5
1.2.1	Costituenti polisaccaridici .....	7
1.2.2	Costituenti non polisaccaridici.....	9
1.2.3	Monocotiledoni e dicotiledoni .....	10
1.3	La biocatalisi e i biocatalizzatori industriali .....	11
1.3.1	La bioliquefazione molecolare.....	13
1.4	Il melograno: la pianta e il frutto .....	14
1.4.1	La bioraffineria applicata agli scarti del melograno .....	17
1.5	La biocosmesi .....	20
1.5.1	La formulazione cosmetica.....	21
1.5.2	Le emulsioni .....	22
1.5.3	Composizione di un'emulsione cosmetica.....	24
2	SCOPO .....	26
3	MATERIALI E METODI .....	27
3.1	Materiali.....	27
3.2	Strumentazione .....	27
3.3	Preparazione soluzioni tampone e reattivi .....	28
3.3.1	Soluzioni di tampone citrato 0,05 M .....	28
3.3.2	Soluzione di ADNS .....	28
3.5	Pretrattamento del campione .....	29
3.6	Trattamento termico.....	29
3.7	Reazione enzimatica .....	29
3.7.1	Primo caso: separazione surnatante e solido residuo .....	30
3.7.2	Secondo caso: matrice intera .....	30
3.7.3	Caratterizzazione dei bioliquefatti.....	30
3.8	Emulsione cosmetica.....	31
3.8.1	Caratterizzazione delle creme e prove di stabilità .....	32
3.9	Saggi colorimetrici.....	33
3.9.1	Determinazione degli zuccheri riducenti: metodo dell'ADNS .....	33
3.9.2	Determinazione dei carboidrati totali: metodo fenolo/solforico.....	35
3.9.3	Determinazione dei polifenoli totali: metodo di Folin – Ciocalteu.....	36
3.9.4	Determinazione del potere antiossidante: metodo del DPPH .....	37

<b>4</b>	<b>RISULTATI E DISCUSSIONE .....</b>	<b>40</b>
4.1	Scelta del trattamento termico .....	42
4.2	Reazione enzimatica .....	42
4.2.1	Primo caso: separazione della matrice in surnatante e solido residuo .....	46
4.2.2	Secondo caso: matrice intera .....	48
4.3	Caratterizzazione dei bioliquefatti.....	51
4.4	Funzionalizzazione dell'emulsione cosmetica .....	63
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONI .....</b>	<b>66</b>
	<b>Bibliografia .....</b>	<b>69</b>

## **Riassunto**

In questo lavoro di tesi vengono studiati due approcci di bioraffineria per la valorizzazione di uno scarto agroalimentare di *Punica granatum* (melograno) di origine italiana, al fine di produrre un ingrediente ad alto valore aggiunto per funzionalizzare un prodotto biocosmetico.

L'oggetto dello studio è il mesocarpo (parte non edibile del frutto) che contiene numerose sostanze bioattive quali polifenoli, flavonoidi, acidi fenolici e polisaccaridi con proprietà antiossidanti, antimicrobiche, antibatteriche, antinfiammatorie e antitumorali. Mediante bioliquefazione molecolare, un metodo biotecnologico e a basso impatto ambientale che sfrutta l'idrolisi enzimatica, la struttura polisaccaridica della parete cellulare del mesocarpo viene disgregata per rendere biodisponibili questi composti.

Sono state condotte varie prove di bioliquefazione molecolare con due preparati enzimatici commerciali diversi. Alla fine è stato identificato il metodo di estrazione più adatto per ottenere un'emulsione cosmetica con il maggiore potere antiossidante.

## **Abstract**

In this graduate work two biorefinery approaches are studied for the valoritation of an agri – food waste of italian *Punica granatum* (pomegranate). The aim of this study is to produce a high value – added ingredient to functionalize a biocosmetic.

The mesocarp, the non – edible part of the fruit, is an important source of bioactive substances such as polyphenols, flavonoids, phenolic acid and polysaccharides with antioxidant, antimicrobial, antibacterial, anti – inflammatory and anticancer properties. In this study the polysaccharide structure of the mesocarp cell wall is broken down to make these compounds bioavailable using molecular bioliquefaction, a biotechnological method with a low environmental impact that exploits enzymatic hydrolisis.

The molecular bioliquefaction tests are conducted with two different commercial enzyme preparations. In conclusion, the most suitable extraction method for obtain a cosmetic emulsion with the highest antioxidant power is identified.



# INTRODUZIONE

## 1.1 Il concetto di bioraffineria ed economia circolare

Le attuali politiche energetiche, l'incremento della popolazione mondiale insieme all'aumento dello standard di qualità della vita ha portato ad un aumento del consumo energetico globale. Si prevede che i consumi energetici aumenteranno del 44% dal 2006 al 2030 e con essi la quantità di gas ad effetto serra (anidride carbonica, protossido di azoto, metano) rilasciata in atmosfera <sup>1</sup>.

Come evidenziato dal quinto "Rapporto di Valutazione (2013 – 2014)" del Gruppo Intergovernativo sul Cambiamento Climatico (IPCC), il foro scientifico formato nel 1988 dalle Nazioni Unite allo scopo di studiare il riscaldamento globale, è necessario ridurre le emissioni di CO<sub>2</sub> nette globali prodotte dall'attività umana di circa il 45% rispetto ai livelli del 2010 e limitare il riscaldamento globale a 1,5 °C.

Attualmente il petrolio greggio è la materia prima di base per la produzione di carburanti e *chemical building blocks*; mentre il gas naturale rappresenta una delle fonti principali per la produzione di energia elettrica e per il riscaldamento.

Oltre agli aspetti di sostenibilità relativi all'utilizzo di combustibili fossili, bisogna affrontare anche i problemi di fornitura legati al loro progressivo esaurimento, che rende la loro disponibilità geograficamente limitata. Opzioni alternative in grado di mitigare il cambiamento climatico e ridurre la dipendenza da fonti fossili sono già in sviluppo, per esempio le fonti rinnovabili (solare, geotermica, idroelettrica) e la valorizzazione delle biomasse (prodotti, rifiuti e residui di origine biologica). L'uso della biomassa per la produzione di energia, quindi la bioenergia, è considerata una delle alternative più promettenti <sup>1</sup>.

La Direttiva Europea 2009/28/CE definisce la biomassa come la frazione biodegradabile dei prodotti, rifiuti e residui di origine biologica provenienti dall'agricoltura, dalla silvicoltura e dalle industrie connesse nonché la parte biodegradabile dei rifiuti industriali e urbani. Si tratta principalmente di residui di attività agricole e forestali, scarti di industrie alimentari, reflui derivanti dagli allevamenti e alghe marine.

Uno dei maggiori vantaggi dell'utilizzo delle biomasse è la riduzione delle emissioni di gas serra in atmosfera: il ciclo completo di produzione, lavorazione e uso di questi materiali

rilascia in atmosfera la stessa quantità di CO<sub>2</sub> che viene assorbita dal vegetale durante la crescita, purché vengano impiegate ad un ritmo complessivamente non superiore alle capacità di rinnovamento biologico.

Il più efficiente uso energetico delle biomasse è stato riscontrato per il riscaldamento, tramite combustione, la generazione di energia elettrica, che sfrutta la digestione anaerobica per produrre biogas messo direttamente in rete e la produzione di biocarburanti, ottenuti mediante fermentazione. Inoltre, le biomasse contengono sostanze bioattive come antiossidanti, flavonoidi e carotenoidi che, tramite specifici processi, possono essere estratte e utilizzate nell'industria alimentare, farmaceutica, nutraceutica e cosmetica.

Alla fine di questi processi la parte fibrosa della matrice vegetale può essere recuperata e utilizzata per la produzione di energia.

È indispensabile che la produzione agricola e la produzione di prodotti da biomasse diventino elementi dello stesso processo circolare, che almeno in parte assomigli al ciclo naturale, basato su principi di sostenibilità globale: ambientale, economica e sociale<sup>2</sup>. La bioraffineria fa parte di questo concetto di economia circolare, un modello di produzione e consumo che implica condivisione, riutilizzo, riparazione, ricondizionamento e riciclo dei materiali e prodotti esistenti (Figura 1.1).

La bioraffineria è definita dalla International Energy Agency (IEA) Bioenergy Task 42 come "l'insieme dei processi sostenibili di trasformazione della biomassa in prodotti ad alto valore aggiunto ed energia". È l'analogo della raffineria del petrolio e si compone di una rete di strutture industriali nelle quali varie tecnologie vengono combinate per trasformare la biomassa in *chemical building blocks* con la produzione contemporanea di biocarburanti, energia, sostanze chimiche e materiali ad alto valore aggiunto.

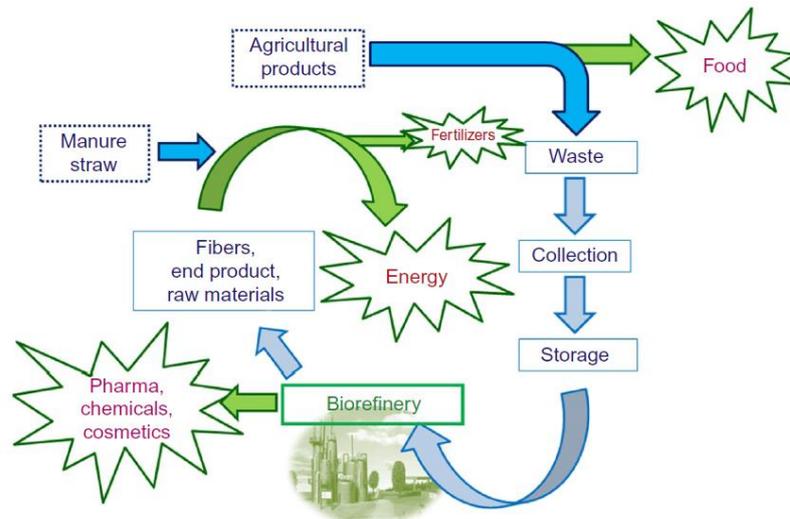


Figura 1.1 – Modello di economia circolare <sup>2</sup>

### 1.1.1 Le biomasse: composizione e processi di trasformazione

Le biomasse sono composte principalmente da organismi vivi o morti e da una varietà di altri composti. I composti quantitativamente più importanti dal punto di vista energetico sono carboidrati, lignina e trigliceridi.

I carboidrati rappresentano, insieme alla lignina, la percentuale maggiore di biomassa e sono costituiti da carbonio, ossigeno e idrogeno; includono monosaccaridi quali glucosio e fruttosio e polisaccaridi quali cellulosa, emicellulose, amido e pectine (Figura 1.2).

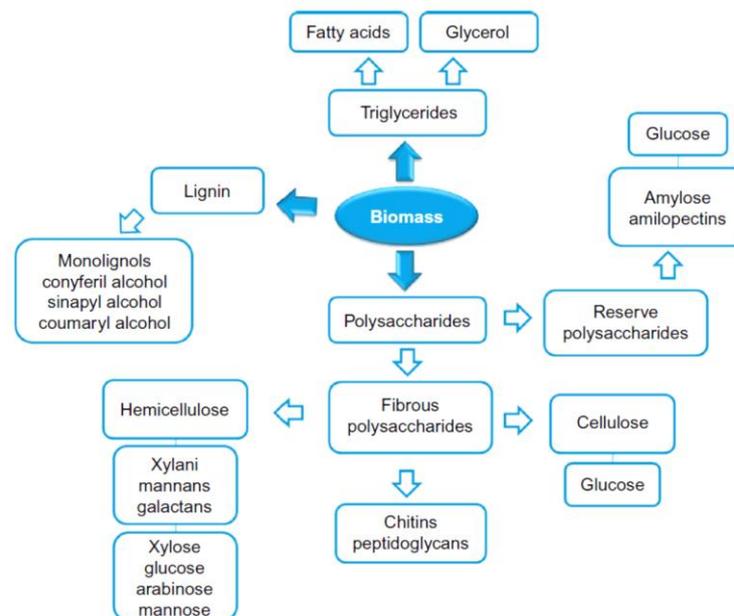


Figura 1.2 – Classificazione delle biomasse e loro componenti <sup>2</sup>

I processi di trasformazione delle biomasse comprendono (Figura 1.3):

- trattamento termochimico: comprende processi di combustione, gassificazione e pirolisi per la produzione di energia termica e un insieme di combustibili solidi, liquidi e gassosi che possono essere utilizzati per altri scopi inclusi trasporto, generazione di energia termica ed elettrica, chemical building blocks;
- conversione biochimica: include processi di fermentazione e digestione anaerobica eseguiti da enzimi, lieviti e batteri per la produzione di bioetanolo, biogas e prodotti finali o intermedi per applicazioni industriali quali, ad esempio, acido lattico, acetone butanolo, acido levulinico. Il metano prodotto da questi processi può essere utilizzato, a sua volta, per la produzione di energia elettrica e termica;
- conversione fisico – chimica: comprende un insieme di processi indirizzati, fondamentalmente, alla produzione di biodiesel da semi oleosi come estrazione dell'olio, transesterificazione con metanolo o etanolo e purificazione <sup>2</sup>.

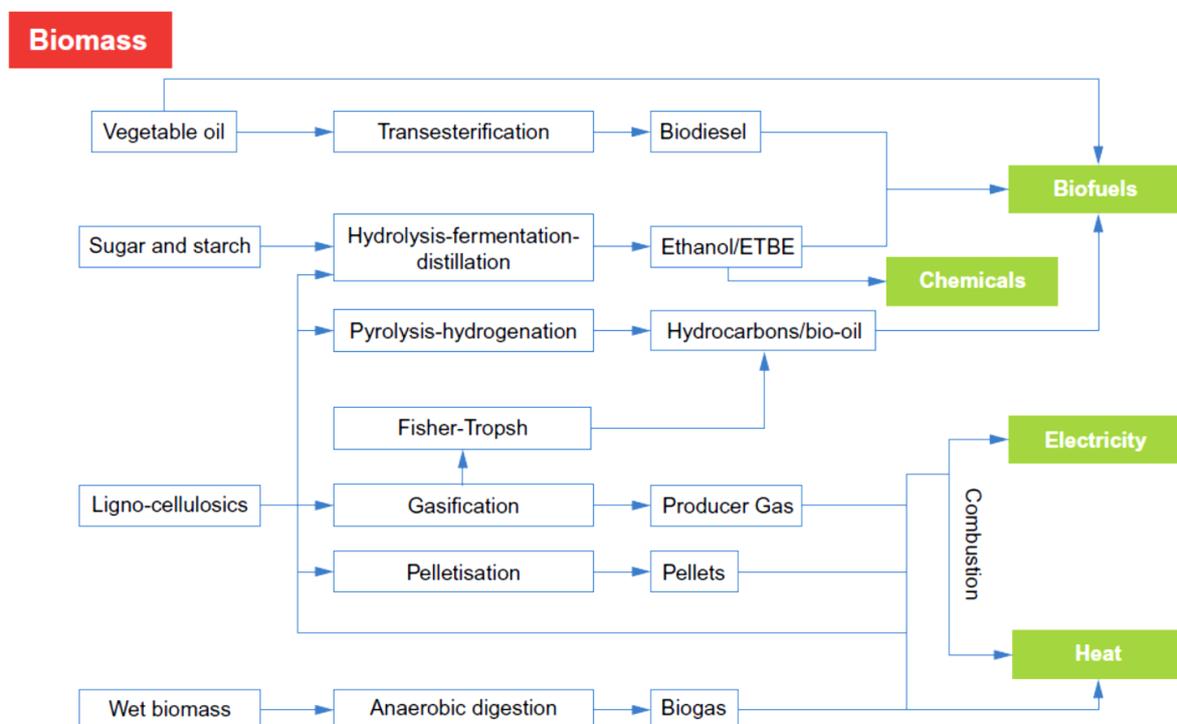


Figura 1.3 – Processi di trasformazione della biomassa <sup>2</sup>

La produzione di *chemical building blocks*, molecole di base ad alto valore aggiunto su cui poggia la gran parte della chimica di sintesi, a partire da biomasse lignocellulosiche, zuccheri e amido comprende due possibili approcci: l'idrolisi chimica e l'idrolisi enzimatica.

Attraverso il processo di idrolisi le catene polimeriche vengono scisse nei loro costituenti, i monomeri, dai quali è possibile produrre *chemicals* attraverso processi chimici o fermentativi. Attualmente i processi industriali tendono a favorire l'idrolisi enzimatica e l'utilizzo di biocatalizzatori, l'unico processo sostenibile.

## **1.2 La cellula vegetale**

La cellula vegetale è un tipo di cellula eucariotica che si differenzia dalle cellule animali, fungine e degli altri regni viventi principalmente per la presenza di una parete cellulare, una struttura costituita da polisaccaridi che ha la funzione di conferire rigidità e mantenere la forma.

Inoltre, si caratterizza per i plastidi, un gruppo di organuli cellulari sede di numerose attività connesse al metabolismo cellulare, come ad esempio i cloroplasti, coinvolti nella fotosintesi cellulare e i vacuoli, delle vescicole delimitate da una membrana fosfolipidica chiamata tonoplasto contenente una soluzione acquosa che, in una cellula matura, occupano il 90% del volume interno della cellula e hanno la funzione principale di mantenere il turgore cellulare.

La parete cellulare è l'involucro esterno della cellula, circonda la membrana cellulare e delimita il protoplasto, ossia l'insieme di membrana plasmatica, citoplasma e nucleo (Figura 1.4).

Svolge numerose funzioni: principalmente funge da barriera fisica e chimica contro gli agenti patogeni e regola le funzioni metaboliche tra le diverse cellule vegetali permettendone il contatto attraverso i plasmodesmi, pori o canali che attraversano la membrana citoplasmatica e permettono il passaggio di macromolecole. Offre, inoltre, protezione dagli stress meccanici donando rigidità e forza alla cellula in modo che possa assumere una forma specifica e mantenerla. Si occupa, infine, di bilanciare la pressione osmotica tra esterno ed interno della cellula al fine di evitare la lisi osmotica e trattenere l'acqua.

Il pH del fluido intracellulare governa il trasporto di molecole attraverso la parete cellulare che risulta essere permeabile a molecole idrosolubili, come gli amminoacidi, ma non a molecole idrofobe, come gli acidi grassi, che necessitano di particolari proteine di legame per spostarsi.

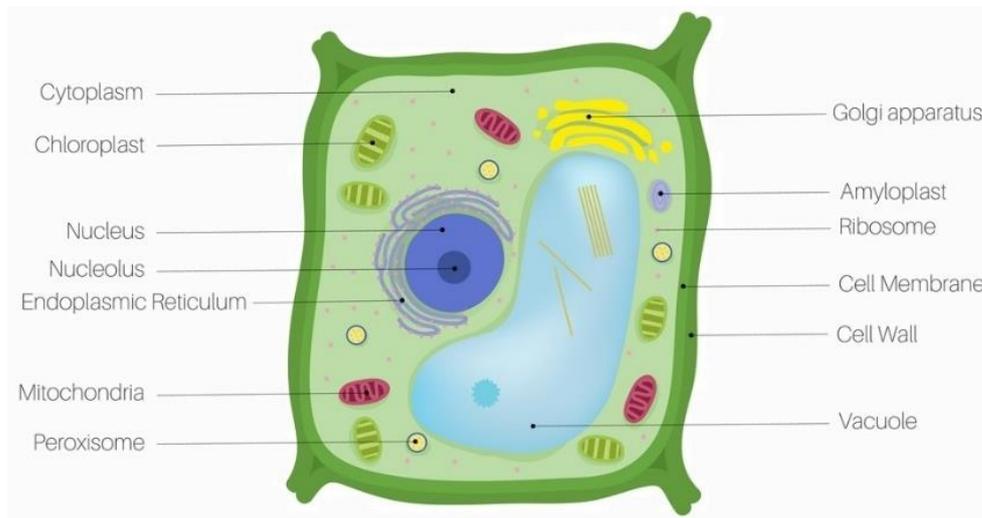


Figura 1.4 – Cellula vegetale

La composizione, le proprietà e la forma cambiano durante il ciclo di vita della cellula e dipendono dal suo grado di crescita. Una cellula giovane si caratterizza per una parete cellulare flessibile e sottile che non permette di mantenere una forma definita ma possiede una considerevole resistenza alla trazione; mentre una cellula adulta presenta una parete cellulare più rigida e robusta.

La rigidità della parete cellulare è, in realtà, soltanto apparente in quanto è data dalla pressione di turgore esercitata dal contenuto di acqua nel vacuolo: lo squilibrio osmotico che si crea tra i liquidi extra e intracellulari provoca un rigonfiamento che preme dall'interno sulla parete stessa.

La parete cellulare è strutturata in tre strati successivi: lamella mediana, parete primaria e parete secondaria (Figura 1.5).

La lamella mediana è la più esterna, contiene i plasmodesmi ed è costituita principalmente da polisaccaridi di tipo pectico che gli donano una consistenza gelatinosa e creano un ambiente ricco di acqua.

La lamella primaria è costituita da una componente fibrillare e una glicoproteica. Le microfibrille di cellulosa sono avvolte da molecole di emicellulosa, la cui composizione varia a seconda della specie vegetale e dello stadio di sviluppo della pianta, e sono

disperse in una matrice gelatinosa a struttura semirigida composta da pectine. Le fibre di cellulosa presentano una struttura molto coesiva che dona la forza e la flessibilità necessarie durante la crescita cellulare.

Esistono due tipi di pareti primarie: di primo tipo presenti in tutte le dicotiledoni e le monocotiledoni non commelinoidi e di secondo tipo presenti nelle monocotiledoni commelinoidi.

La parete secondaria, presente solo in alcuni tipi di piante, costituisce la parte rigida. Oltre a cellulose ed emicellulose può contenere, infatti, lignina, un polimero che cementifica tra loro le fibre, rafforza la parete cellulare e favorisce il passaggio di acqua nelle cellule dei tessuti vascolari.

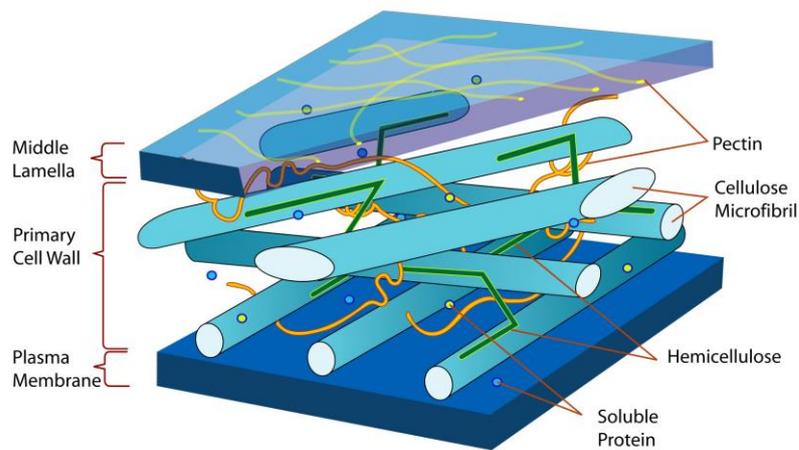


Figura 1.5 – Struttura della parete cellulare vegetale

### 1.2.1 Costituenti polisaccaridici

Le **pectine** sono polimeri naturali ad alto peso molecolare relativo (20000 – 400000), solubili in acqua e di natura acida. Fanno parte della famiglia dei polisaccaridi, polimeri di zuccheri semplici, fondamentali della struttura della parete cellulare.

Sono costituite da catene lineari di acido poli-D-galatturonico unite da legami  $\alpha$  (1-4) (Figura 1.6). I gruppi carbossilici sono esterificati con alcol metilico o con acido acetico. Il rapporto tra la percentuale di gruppi carbossilici totali e di gruppi carbossilici esterificati prende il nome di grado di esterificazione. Lungo la catena a base poligalatturonica sono presenti residui di 1,2-L-ramnosio, in corrispondenza dei quali si innestano catene laterali formate da vari zuccheri quali D-galattosio, L-arabinosio, D-xilosio, L-fucosio.

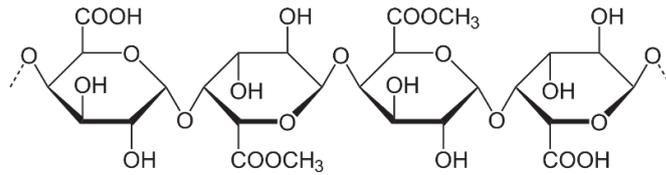


Figura 1.6 – Acido poli-D-galatturonico

Le pectine sono suddivise in:

- omogalatturonani (HG), omopolimeri formati da circa 200 unità di acido galatturonico, che comprendono gli xilogalatturonani, che possiedono residui laterali di xilosio, e i ramnogalatturonani II (RGII), che possiedono una complessa sequenza di eterozuccheri;
- ramnogalatturonani I (RGI), disaccaridi formati da unità di acido D-galatturonico e L-ramnosio con ramificazioni di arabinani e galattani.

Le pectine si estraggono da molti frutti tra cui mele e agrumi, precisamente dalla protopectina in essi contenuta che per idrolisi si scinde in acidi pectici. Vengono utilizzate nella preparazione di prodotti alimentari come gelificante, in cosmetica, in batteriologia per la preparazione di terreni di coltura e in medicina.

Nei vegetali, grazie alla loro capacità di gelificare, hanno la funzione di consentire l'adesione delle cellule alla lamella mediana e limitare la porosità, regolando l'accesso degli enzimi che rompono i legami delle emicellulose unite alle microfibrille di cellulosa.

Precipitano dalle soluzioni acquose per aggiunta di alcol, acetone e cationi polivalenti. Le soluzioni acquose presentano un'elevata viscosità che diminuisce all'abbassarsi del peso molecolare, del grado di esterificazione e della presenza di elettroliti.

La **cellulosa** è un polimero lineare del D-glucosio in cui i monomeri si dispongono in forma piranica e si legano tra loro con legami  $\beta$  (1-4) glicosidici (Figura 1.7). Ha composizione analoga all'amido ma con diversa configurazione del legame glicosidico.

Nei vegetali le catene si dispongono le une vicine alle altre formando zone amorfe e zone cristalline.

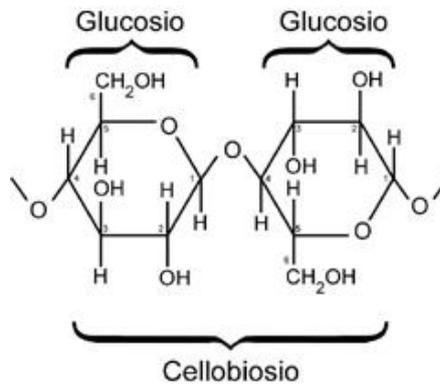


Figura 1.7 – Dimero di D-glucosio (cellobiosio)

Nella cellula vegetale è la sostanza fondamentale della componente fibrillare; grazie alla sua struttura regolare e compatta in microfibrille presenta una straordinaria resistenza alla trazione e agli attacchi enzimatici.

Le **emicellulose** sono un gruppo non omogeneo di polisaccaridi complessi tra cui xilano, galattano, arabano e mannano. Questi monomeri sono condensati in modo analogo al glucosio nella cellulosa.

Le emicellulose si distinguono in due sottogruppi fisiologicamente diversi: il primo è composto principalmente da mannani e galattani che svolgono la funzione di materiali di riserva per la nutrizione delle piante e contribuiscono alla nutrizione dei germogli; l'altro comprende galattani, arabani e xilani che possiedono soprattutto funzioni meccaniche.

### 1.2.2 Costituenti non polisaccaridici

Tra i componenti minoritari delle strutture vegetali ci sono proteine di parete, lignina e sostanze grasse.

Le **proteine di parete** comprendono le proteine strutturali, in generale glicoproteine cioè proteine alla cui catena peptidica è legata una catena oligosaccaridica, che contribuiscono all'assemblaggio e alla crescita della parete cellulare e conferiscono rigidità; le proteine enzimatiche, che fungono da catalizzatori per le reazioni biochimiche, tra cui vi sono pectinasi, cellulasi, ossidoriduttasi, perossidasi.

La **lignina** è un polimero organico di natura fenolica, si trova associata alla cellulosa tramite legami a idrogeno e svolge la funzione di legare tra loro le fibre conferendo compattezza e resistenza alla compressione.

**Cutina** e **suberina** sono sostanze grasse che si trovano nelle pareti delle cellule dei tessuti esterni che proteggono il corpo della pianta; associate alle cere riducono la perdita d'acqua per traspirazione.

### **1.2.3 Monocotiledoni e dicotiledoni**

Le angiosperme, piante che si riproducono grazie ai fiori, si dividono in monocotiledoni (grano, orzo) e dicotiledoni (maggior parte della frutta e verdura) a seconda del numero di cotiledoni, ossia parti del seme che durante lo sviluppo si trasformano in foglie embrionali in cui vengono immagazzinate le sostanze di riserva: uno per i monocotiledoni e due per i dicotiledoni; del tipo di radice, della disposizione dei vasi conduttori nel fusto, delle nervature delle foglie e del numero di petali).

Le pareti cellulari dei monocotiledoni e dicotiledoni si differenziano per composizione e struttura della parete primaria. Generalmente quella dei monocotiledoni è costituita da 25% di cellulosa, 55% di emicellulose (arabani, xilani) e 10% di pectina; mentre quella dei dicotiledoni è composta da 35% di pectina, 30% di cellulosa e 30% di emicellulose (arabani, galattani) <sup>3</sup>.

Questi polisaccaridi hanno una disposizione diversa all'interno della parete cellulare: nei monocotiledoni arabinoxilani e cellulosa formano una fitta rete mentre i dicotiledoni hanno una struttura idratata e molto aperta. Si ritiene che le emicellulose presenti nella parete cellulare dei dicotiledoni siano associate alla frazione di pectina mediante legami covalenti e alle microfibrille di cellulosa mediante legami a idrogeno <sup>4</sup>. In figura 1.8 è rappresentato il modello proposto da Jean-Paul Vincker et al. dove è possibile osservare tali interazioni.

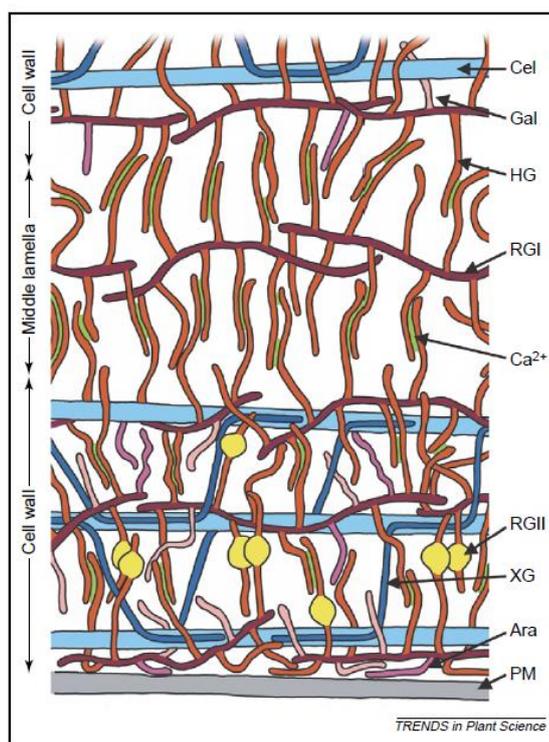


Figura 1.8 – Organizzazione dei polisaccaridi all'interno della parete cellulare di un dicotiledone (Cel = cellulosa, Gal = galattani, HG = omogalatturonano, RGI = ramnogalatturonano I, RGII = ramnogalatturonano II, XG = xiloglucano, Ara = arabinano, PM = plasma) <sup>4</sup>

### 1.3 La biocatalisi e i biocatalizzatori industriali

La biocatalisi si riferisce all'utilizzo degli enzimi fisiologici, coinvolti nel metabolismo di tutte le cellule viventi, come catalizzatori in condizioni artificiali. La sfida della biocatalisi è trasformare questi catalizzatori fisiologici in catalizzatori di processi industriali.

I biocatalizzatori agiscono come un qualsiasi catalizzatore riducendo la barriera energetica di attivazione di una reazione, aumentandone la velocità, senza prendere parte alla reazione stessa ed esserne alterati.

L'attività enzimatica, cioè la capacità di catalizzare una reazione chimica, è strettamente correlata alla struttura molecolare dell'enzima <sup>5</sup>. L'enzima è composto da un sito attivo che interagisce con uno specifico substrato formando dapprima un complesso enzima-substrato e infine un prodotto (Figura 1.9).

L'attività enzimatica è influenzata da pH, temperatura, concentrazione di substrato e presenza di molecole in grado di inibire tale attività.

Gli enzimi commerciali vengono prodotti dalla fermentazione di diversi tipi di microrganismi come funghi, muffe, lieviti e batteri a seconda del tipo di substrato che si vuole scomporre (pectine, cellulosa, emicellulose) e, quindi, del tipo di attività desiderata (pectinasi, cellulasi, xilanasica, amilasi). I microrganismi, infatti, producono enzimi che aggrediscono, in modo altamente specifico, i vari tipi di substrati vegetali e li convertono in nuovi prodotti utili per il nutrimento e la crescita dei microrganismi stessi.

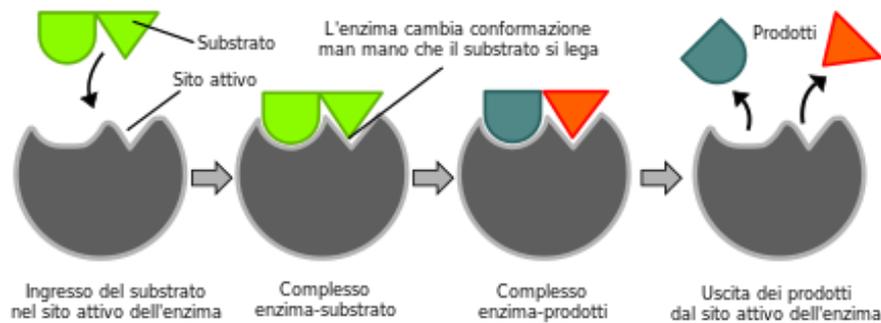


Figura 1.9 – Modello del funzionamento di una reazione enzimatica

Dalla metà degli anni 90 c'è stato un notevole incremento nell'utilizzo dei biocatalizzatori in diversi settori industriali quali alimentare, chimico, farmaceutico, cosmetico, tessile e della carta, grazie ai numerosi vantaggi che offrono: condizioni operative (pH, temperatura, pressione) blande, alta efficienza in ambiente acquoso, elevata regio e stereo – selettività con possibilità di ottenere composti enantiomericamente puri e sostenibilità del processo.

La ricerca e lo sviluppo di nuove tecnologie nel campo dell'ingegneria enzimatica porteranno alla sempre più crescente sostituzione dei processi chimici tradizionali con processi enzimatici <sup>6</sup>.

Attualmente i biocatalizzatori più utilizzati appartengono alla vasta gamma delle idrolasi tra cui carboidrasi (pectinasi, cellulasi, amilasi), emicellulasi e proteasi, impiegate per la produzione di alimenti, mangimi, detergenti, cuoio e tessuti.

Le **pectinasi** sono una famiglia di enzimi in grado di catalizzare l'idrolisi delle strutture poligalatturoniche che compongono la parete cellulare vegetale. Vengono classificate in base al tipo di legame che idrolizzano in:

- polimetilgalatturonasi e poligalatturonasi: idrolizzano i legami  $\alpha$  (1,4) che uniscono le varie unità di acido galatturonico;

- pectinesterasi: idrolizzano i legami esterei del carbossile del galatturone;
- pectiniasi: idrolizzano i legami  $\alpha$  (1,4) tra le unità di acido galatturonico tramite meccanismo di trans eliminazione.

Vengono estratte da alcuni generi di funghi, principalmente dall'*Aspergillus niger*, che producono questo enzima per aggredire i tessuti vegetali e ricavarne sostanze nutritive. Nell'industria alimentare vengono impiegate per l'estrazione e la chiarificazione dei succhi di frutta e per la chiarificazione del vino.

Le **cellulasi** sono una classe di enzimi in grado di idrolizzare il legame  $\beta$  (1,4) glucosidico che unisce le fibre di cellulosa. In base alla posizione di attacco si dividono in:

- endocellulasi: aggrediscono la struttura della cellulosa in posizione centrale;
- esocellulasi: aggrediscono la struttura della cellulosa in posizione terminale liberando sequenzialmente oligomeri di glucosio a basso peso molecolare;
- cellobiasi: disgregano il cellobiosio nei suoi monomeri di glucosio.

Sono ottenute da funghi e muffe appartenenti alle specie *Pleurotus*, *Aspergillus* e *Trichoderma*. Trovano vari impieghi nell'industria alimentare per l'estrazione e la chiarificazione dei succhi di frutta, tessile per lo stonewashing dei tessuti e per la produzione di detergenti.

Le **emicellulasi** sono una categoria di diversi enzimi che idrolizzano i legami glucosidici delle varie strutture polisaccaridiche che compongono le emicelulose.

Sono classificate in base alla tipologia di polisaccaride che vanno ad aggredire in xilanasi, mannasi, arabinasi, lattasi.

Vengono prodotte da funghi, muffe, lieviti e batteri appartenenti ai generi *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Lactobacillus*. Per esempio le xilanasi sono utilizzate industrialmente per lo sbiancamento della carta e nei mangimi per aumentarne la digeribilità e le lattasi per la produzione di latte e suoi derivati senza lattosio <sup>5</sup>.

### 1.3.1 La bioliquefazione molecolare

I principi attivi di origine vegetale (polifenoli, flavonoidi, antociani, vitamine, acidi ferulici) giocano un ruolo primario in molti prodotti cosmetici, nutraceutici e farmacologici. Nonostante ciò l'uso di estratti vegetali ha ancora alcune limitazioni, a causa del metodo

di estrazione utilizzato, in termini di efficacia, impatto ambientale e sicurezza per il consumatore.

I processi tradizionali, tuttora i più diffusi, si basano sull'utilizzo di solventi chimici organici e tecniche di separazione cromatografiche basate sulla diversa affinità delle varie molecole target con la fase mobile selezionata. Tuttavia, nelle piante sono presenti contemporaneamente migliaia di composti chimicamente diversi che rendono la tecnologia tradizionale non ugualmente efficace per tutte le molecole target.

Altre questioni da tenere in considerazione riguardano l'impatto ambientale e i potenziali problemi per la salute del consumatore legati ai solventi utilizzati.

Inoltre, l'estrazione con solvente è efficace solo su molecole fisicamente intrappolate o trattenute con interazioni deboli nella rete polisaccaridica della parete cellulare vegetale. Nei vegetali, però, le migliaia di molecole potenzialmente interessanti sono legate covalentemente alla parte solida della matrice vegetale e non possono essere estratte con le tecnologie tradizionali.

Per questi motivi gli enzimi sono sempre più utilizzati come biocatalizzatori in quanto superano i limiti delle tradizionali tecnologie.

La bioliquificazione molecolare si compone di una combinazione di trattamenti enzimatici ispirati al sistema digestivo umano: le macrostrutture polisaccaridiche e proteiche che compongono la parete cellulare vegetale vengono disgregate, in maniera selettiva, in monomeri e molecole a basso peso molecolare attraverso tagli molecolari mirati.

L'utilizzo di specifici enzimi rende possibile il recupero di fitocomposti e altre sostanze terapeuticamente inattive (pectine, cellulosa, emicellulose). I fitocomposti sono sostanze bioattive non nutritive, risultanti dalla combinazione di più principi attivi, con proprietà terapeutiche che possono influenzare positivamente la salute e contribuire alla prevenzione di malattie. Dopo trattamento enzimatico questi principi attivi risultano altamente biodisponibili ed utilizzabili come ingredienti per l'industria cosmetica, nutraceutica e farmacologica. <sup>7</sup>.

#### **1.4 Il melograno: la pianta e il frutto**

Il melograno (*Punica granatum*, L.) è una pianta appartenente alla famiglia delle *Punicaceae* (o *Lythraceae* secondo la classificazione APG) e al genere *Punica*. È una pianta

angiosperme dicotiledone, piante superiori e più evolute che si riproducono attraverso i fiori.

Si tratta di un piccolo albero che, grazie alla sua capacità di adattarsi a condizioni avverse, è diffuso principalmente in regioni aride e semiaride dell'Iran, dell'Himalaya, del nord dell'India, della Cina, degli Stati Uniti e di tutta la regione mediterranea. In Italia la cultivar più diffusa è la dente di cavallo, la più adatta al clima della zona perché più resistente al freddo.

Il melograno può essere diviso in diversi compartimenti anatomici ognuno dei quali con interessanti attività farmacologiche e nutraceutiche: fiori rossi ed ermafroditi, frutti con buccia dura e coriacea di colore giallo – rossa, foglie opposte e lucide, corteccia e radici.

Nell'ultimo decennio i frutti e i suoi estratti hanno dimostrato di possedere un'azione preventiva e attenuativa contro numerose patologie croniche e malattie genetiche quali cancro, diabete di tipo 2, arteriosclerosi e malattie cardiovascolari.

È interessante notare che le proprietà farmacologiche e nutraceutiche non si limitano solo alla parte edibile della pianta: la frazione non edibile come buccia, semi, fiori, corteccia e foglie, considerati solitamente rifiuti, contengono una quantità maggiore di nutrienti specifici e sostanze biologicamente attive rispetto alla frazione commestibile. I fitocomposti sono contenuti maggiormente nella buccia e nel mesocarpo. Pertanto, l'uso di composti a base di estratti di buccia nell'industria alimentare e nutraceutica è in continuo aumento; essi comprendono integratori alimentari, nutraceutici e alimenti specifici per diete ricche di polifenoli. Oltre alla loro rilevanza nutraceutica, possono fungere anche da ottimi additivi naturali per la conservazione e il miglioramento degli alimenti <sup>8</sup>.

Il **frutto** del melograno, melagrana o granata, è una bacca di forma rotonda con esocarpo (buccia) duro e coriaceo di colore giallo – rosso, mesocarpo (albedo) spugnoso di colore giallo chiaro ed endocarpo sottile e membranoso che protegge i semi circondati dalla sarcotesta (arile), involucro esterno e carnoso del seme di colore rosso rubino (Figura 1.10).

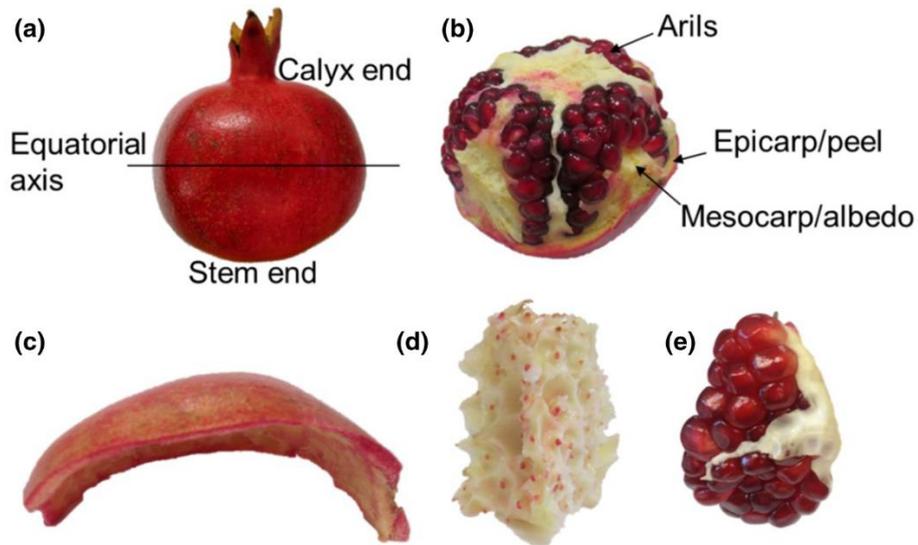


Figura 1.10 – Sezioni del frutto del melograno (a = sezione esterna, b = sezione interna, c = esocarpo o buccia, d = mesocarpo, e = endocarpo, sarcotesta o arile)

La sarcotesta, parte edibile del frutto, rappresenta il 52% in peso dell'intero frutto e include il 78% di succo e il 22% di semi.

Il succo fresco è fonte di polisaccaridi, acidi organici, pectine, polifenoli, vitamine e minerali; mentre i semi sono ricchi di lipidi, proteine e polifenoli.

La buccia e il mesocarpo, frazione non edibile, rappresentano il restante 48% in peso dell'intero frutto e sono la fonte principale di sostanze bioattive come polifenoli, flavonoidi, acidi fenolici e polisaccaridi <sup>9</sup>.

Sono stati identificati circa 48 composti fenolici, con proprietà antiossidanti, antimicrobiche, antibatteriche, antinfiammatorie e antitumorali, che comprendono (Figura 1.11):

- antocianidine (delfinidina, cianidina, pelargonidina), pigmenti idrosolubili e flavonoidi responsabili del colore e del gusto amaro;
- gallotannini (esteri dell'acido gallico) ed ellagitannini (acido ellagico, esteri dell'acido ellagico, punicalagina, pedunculagina), tannini idrolizzabili in zuccheri e acidi fenolici liberi;
- acidi idrossicinnamici (acido cumarico, acido caffeico) e acidi idrossibenzoici (acido gallico): acidi fenolici.

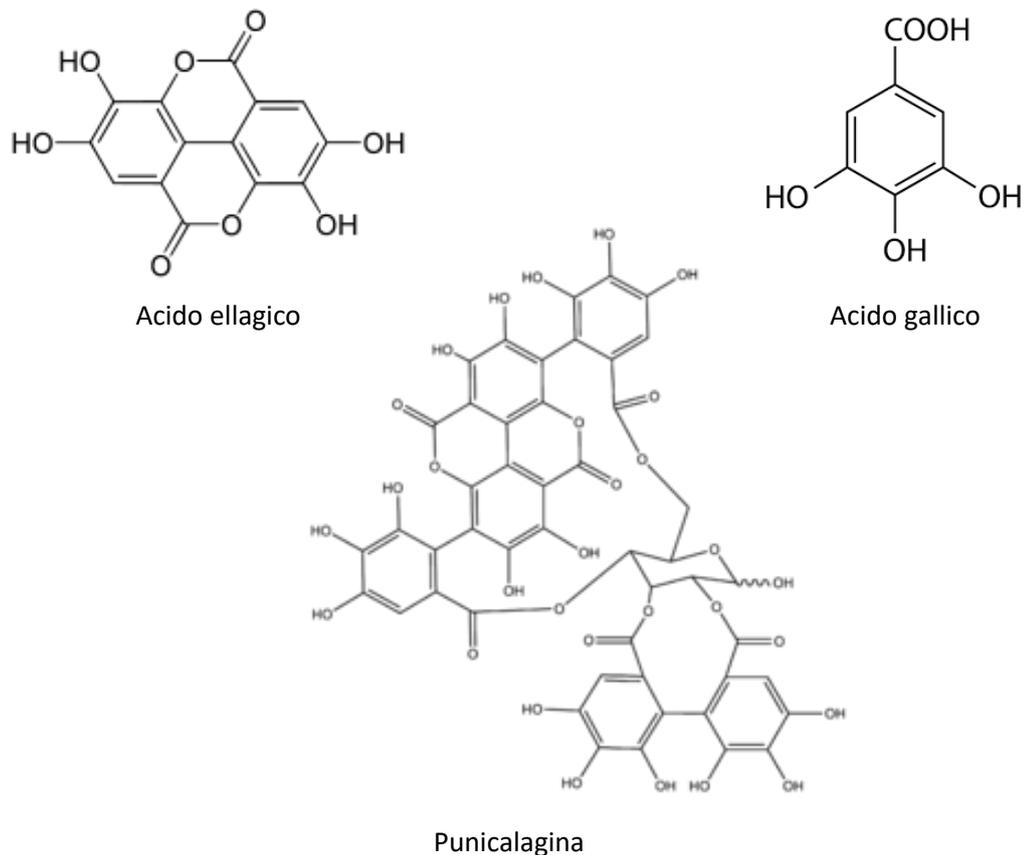


Figura 1.11 – Composti fenolici del melograno

La capacità antiossidante dei tannini idrolizzabili e delle antocianidine è legata alla loro struttura: si tratta di idrossifenoli, polifenoli con gruppi idrossili, in grado di donare atomi di idrogeno ai radicali liberi e inibire la reazione di ossidazione <sup>8</sup>.

Studi in vitro hanno dimostrato che questa attività è legata ai composti formatosi durante il metabolismo: dopo ingestione gli ellagitannini vengono idrolizzati dalla microflora intestinale a molecole più piccole, come acido ellagico e acido gallico, e successivamente in uroliti <sup>10</sup>.

#### 1.4.1 La bioraffineria applicata agli scarti del melograno

Il melograno è considerato un super frutto con numerose proprietà mediche, a causa di ciò negli ultimi anni la domanda globale di prodotti derivanti dalla sua lavorazione è aumentata. Dalla lavorazione di 1 tonnellata di melograno fresco si ottengono circa 550 kg di materiale di scarto, principalmente buccia e mesocarpo. Dato l'elevato contenuto di acqua (75%) e di materia organica (96%) è sconsigliato il suo smaltimento in discarica

in quanto presenta un rischio per la contaminazione dei corsi d'acqua locali e per la produzione incontrollata di gas serra.

La buccia e il mesocarpo sono una ricca fonte di prodotti ad alto valore aggiunto: composti fenolici, composti che esercitano effetti benefici sulla salute umana, pectina, un idrocolloide ampiamente utilizzato nelle industrie alimentari, farmaceutiche e cosmetiche e zuccheri, utilizzati per la produzione di bioetanolo e sostanze biochimiche <sup>11</sup>.

Alcuni esempi di valorizzazione degli scarti della lavorazione del melograno sono riportati in Figura 1.12. Gli scarti del melograno e i suoi estratti possono essere utilizzati:

- direttamente come additivi per mangimi, grazie all'elevata presenza di micronutrienti;
- essiccati e fermentati per produrre enzimi, proteine, biogas e metano;
- addizionati con sali metallici per la sintesi di nanoparticelle <sup>12</sup>.

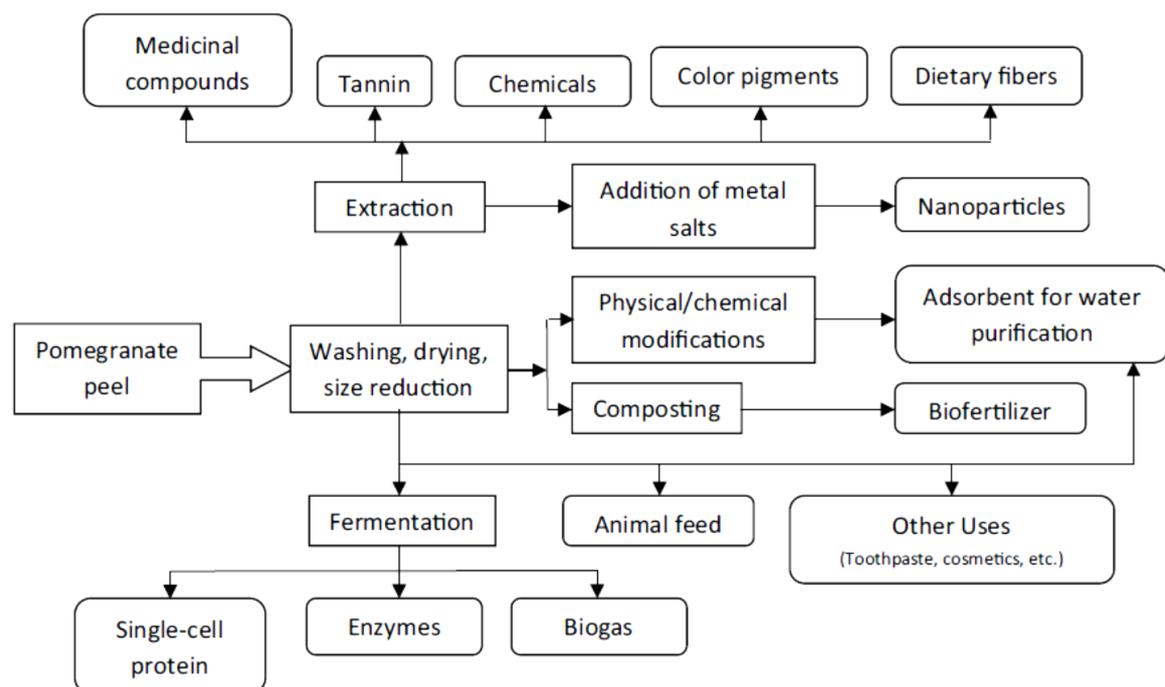


Figura 1.12 – Valorizzazione degli scarti del melograno <sup>12</sup>

La lavorazione diretta degli scarti freschi per produrre contemporaneamente più prodotti, basata quindi su un processo di bioraffineria integrata che impiega una combinazione di diverse tecnologie, potrebbe essere un approccio promettente. A tale

scopo è stato proposto un processo che prevede un trattamento termico, utilizzando acqua come solvente, in cui la biomassa viene sottoposta ad elevate temperature e pressioni, accoppiato ad un'idrolisi enzimatica (Figura 1.13).

La sinergia di questi trattamenti offre numerosi vantaggi tra cui la sostenibilità del processo, la produzione di più prodotti ad alto valore aggiunto e la riduzione dei rifiuti generati aderendo ai principi della *Green Chemistry* <sup>11</sup>.

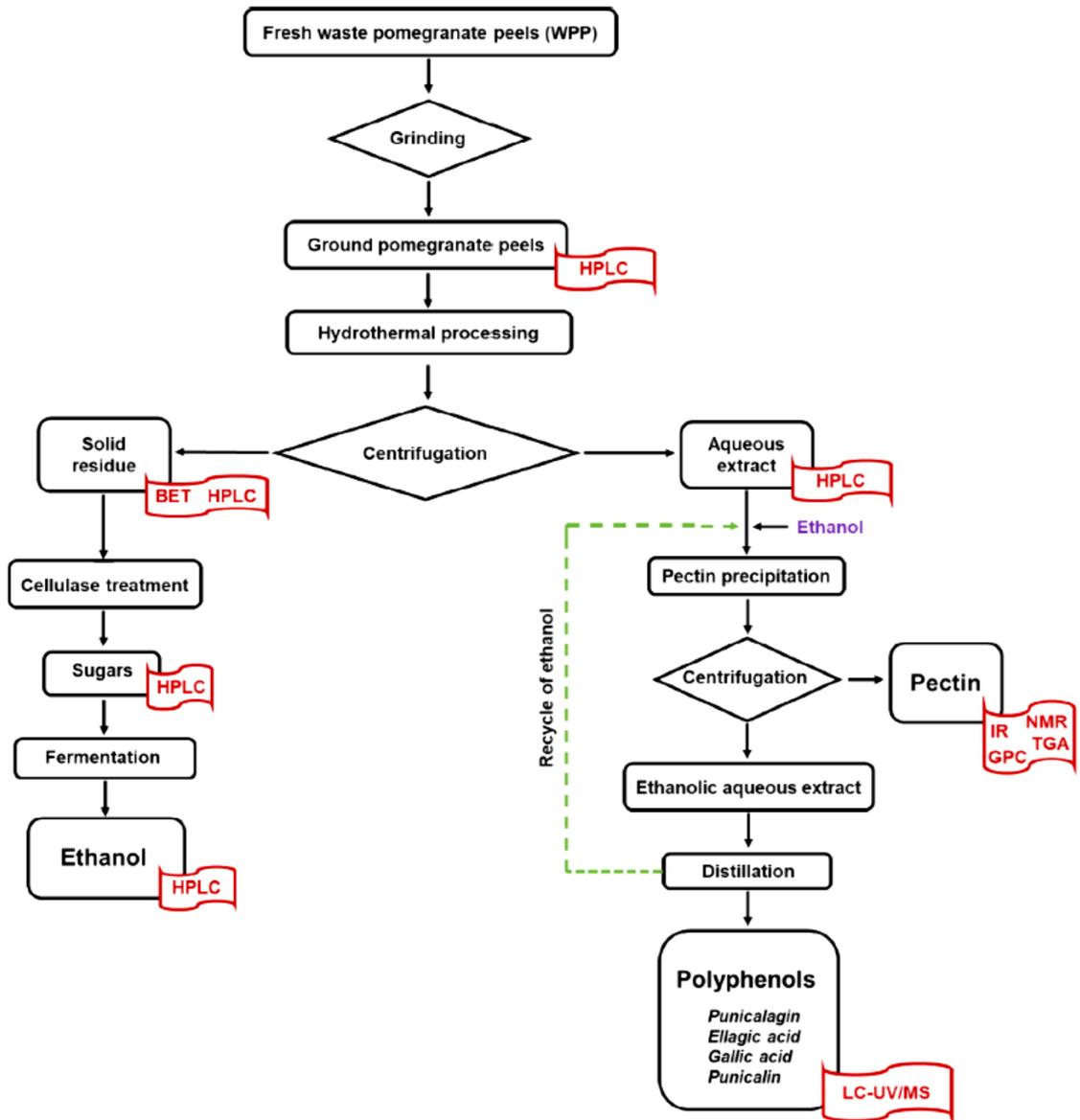


Figura 1.13 – Esempio di processo di bioraffineria integrata applicato agli scarti del melograno <sup>11</sup>

## 1.5 La biocosmesi

Le prime notizie in merito all'uso dei prodotti cosmetici risalgono agli Antichi Egizi intorno al 4000 a.C. Nell'antichità l'uso dei cosmetici era connesso ad aspetti religiosi ed ornamentali; oggi, invece, la cosmesi rappresenta una vera e propria industria regolamentata da norme legislative.

Il Regolamento (CE) n. 1223/2009 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 30 novembre 2009 definisce la cosmesi come l'insieme di attività, tecniche ed arti relative al prodotto cosmetico, cioè qualsiasi sostanza o miscela (creme, lozioni, saponi) applicata sulle superfici esterne del corpo e utilizzata a fini igienici, estetici e compensativi con azione detergente, emolliente, tonificante e coprente.

Fino al XX secolo la ricerca di ingredienti e materie prime per applicazioni cosmetiche si è concentrata solo su ciò che era disponibile in natura; l'avvento della chimica fine ha reso possibile la produzione di molecole sintetiche tra cui acido ialuronico, acido citrico e gomma xantana portando ad un incremento della produzione di prodotti cosmetici e allo sviluppo di nuove tecniche.

Al giorno d'oggi, le preoccupazioni sulla sicurezza delle molecole sintetiche e la ricerca di molecole più economiche, ecosostenibili e biocompatibili hanno spostato l'interesse verso molecole naturali derivanti da fonti vegetali, animali, marine e biotecnologiche.

Il Segen's Medical Dictionary (2012) definisce un biocosmetico come un prodotto cosmetico contenente ingredienti ricavati da processi biotecnologici o basati su meccanismi biologici. All'interno di questa definizione rientrano anche i prodotti che utilizzano, in almeno un passaggio della loro produzione o della produzione di una delle materie prime, residui industriali o rifiuti agroalimentari.

Se impiegati come substrato per preparati cosmetici, i materiali di scarto possono subire vari tipi di lavorazione (chimica, fisiologica, biologica, biotecnologica) al fine di rilasciare le molecole di interesse. Per essere considerati un materiale interessante per la produzione di biocosmetici, i materiali di scarto devono possedere almeno una proprietà desiderata come, ad esempio, un elevato contenuto di polifenoli, un alto potere antiossidante, la capacità di migliorare le proprietà sensoriali e agire sulla levigatezza della pelle.

Infine, come un cosmetico comune, deve soddisfare i requisiti imposti dalla normativa vigente a livello europeo in termini di sicurezza fisica, chimica e microbiologica. <sup>13</sup>.

### **1.5.1 La formulazione cosmetica**

Gli ingredienti che compongono un prodotto cosmetico possono essere classificati in gruppi:

- lipidi o grassi (vasellina, paraffine, oli e burri solidi vegetali, cere vegetali): sostanze organiche idrofobe che fungono da veicoli e solventi per sostanze lipofile e da emollienti;
- tensioattivi (solfati, betaine, molecole vegetali): detergenti ossia sostanze con azione sulla tensione interfacciale;
- emulsionanti (PEG, molecole di origine naturale): sostanze che permettono a due liquidi immiscibili di potersi mescolare in modo stabile;
- solubilizzanti (PEG): sostanze che rendono solubili in sistemi acquosi sostanze liposolubili come profumi, oli essenziali;
- modificatori reologici (gomme, estratti di alghe, polimeri sintetici): sostanze che sono in grado di cambiare la consistenza finale del prodotto, ad esempio viscosizzanti e addensanti;
- conservanti (acidi organici, parabeni, oli essenziali): sostanze che inibiscono o impediscono la crescita dei microrganismi al fine di preservare il prodotto per lunghi periodi;
- antiossidanti (molecole sintetiche, vitamine, oli essenziali): sostanze che impediscono l'ossidazione e l'irrancidimento del prodotto;
- umettanti (glicerina, sorbitolo): sostanze che impediscono l'evaporazione e quindi l'essiccamento della superficie del prodotto;
- coloranti (molecole organiche, pigmenti);
- siliconi (derivati organici del silicio): sostanze in grado di aumentare le performances del prodotto come, ad esempio, rendere la pelle più setosa, facilitare l'assorbimento delle creme.

I prodotti cosmetici vengono classificati in base alla forma cosmetica in cui si presentano cioè alle caratteristiche chimico – fisiche che assume. Le varie forme in cui possono apparire sono:

- soluzioni, miscele omogenee costituite da un componente disperso (soluto) in un mezzo disperdente (solvente) come i tensioliti, gli idroliti e gli alcoliti;
- oleoliti, sistemi monofasici costituiti da miscele di sostanze lipofile come siliconi, oli vegetali e minerali;
- gel idrati ottenuti a partire da una base acquosa gelificata attraverso un agente viscosizzante;
- emulsioni, sistemi bifasici costituiti da una dispersione stabile tra due liquidi immiscibili, di cui uno funge da fase dispersa e l'altro da fase disperdente, ottenuta grazie all'utilizzo di specifici agenti emulsionanti.

La forma cosmetica viene adeguatamente scelta a seconda della funzione del cosmetico e della zona di applicazione (pelle, denti, unghie). Anche il pH del prodotto deve essere adeguato alla zona del corpo a cui il cosmetico è destinato: per esempio il pH della pelle, generalmente acido (4,7 – 5,75), protegge dai microorganismi e dalle infezioni micotico – batteriche, dagli inquinanti, dagli sbalzi termici e dalle sostanze chimiche aggressive per cui deve essere mantenuto tale per non sbilanciare la normale barriera protettiva.

### **1.5.2 Le emulsioni**

Le **emulsioni** sono dispersioni colloidali di piccole goccioline di un liquido, la fase dispersa o discontinua, in un altro liquido non miscibile al primo, la fase disperdente o continua. La stabilità chimico – fisica delle emulsioni, cioè la tendenza dei globuli dispersi a non riunirsi tra loro, dipende principalmente da tre fattori: lo stimolo energetico (temperatura e agitazione), necessario per vincere la tensione interfacciale dei due componenti e formare l'emulsione; la presenza di tensioattivi, emulsionanti cioè sostanze in grado di ridurre la tensione interfacciale tra i due liquidi; la presenza di elettroliti, sostanze che in soluzione subiscono una dissociazione elettrolitica. I principali tipi di emulsioni sono:

- olio in acqua (O/W) in cui l'olio risulta essere disperso nell'acqua, la fase acquosa rappresenta, quindi, la fase più abbondante e l'emulsionante dovrà avere caratteristiche idrofile;

- acqua in olio (W/O) in cui l'acqua risulta essere dispersa nell'olio, la fase oleosa si trova, quindi, in percentuale maggiore e l'emulsionante dovrà avere caratteristiche lipofile;
- emulsioni multiple (W/O/W, O/W/O).

Un problema fondamentale nella preparazione delle emulsioni è prevedere quale tipo si formerà dall'agitazione delle fasi immiscibili. Ciò dipende da alcuni fattori: il volume di fase, ossia il rapporto tra la percentuale delle due fasi; la viscosità, la fase più viscosa tende a formare meno goccioline e si disperde meno facilmente; il tipo di tensioattivo.

Gli **emulsionanti** sono tensioattivi cioè sostanze con la capacità di abbassare la tensione superficiale tra due liquidi immiscibili, ossia la tensione interfacciale che compete alla superficie di separazione, e permettere di legare le goccioline disperse con la fase disperdente. Questo comportamento è spiegabile in relazione alla loro struttura: essi sono molecole anfifiliche ossia costituite da una testa polare, un gruppo idrofilo (esempio un gruppo carbossilico o solfonico) che tende a sciogliersi in acqua e da una coda apolare, un gruppo idrofobo (esempio una catena idrocarburica) che tende a rimanere insolubile. Le molecole, quindi, tendono a disporsi all'interfase liquido – gas e liquido – solido della soluzione orientando la testa verso la fase acquosa e la coda verso la fase oleosa (Figura 1.14).

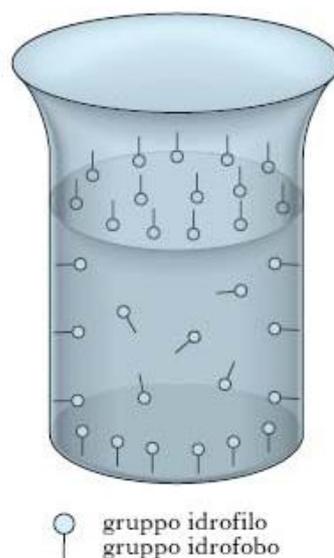


Figura 1.14 – Orientamento gruppi idrofili e gruppi idrofobi di un tensioattivo in solvente acquoso

È possibile stabilire l'azione di un tensioattivo su un'emulsione utilizzando la regola di Bancroft, in base alla quale la fase in cui il tensioattivo è più solubile va a formare la fase esterna dell'emulsione. Tale regola trova il suo fondamento teorico nella constatazione che l'abbassamento della tensione superficiale di un liquido ne favorisce la frammentazione in gocce. Pertanto, se il tensioattivo è più solubile in acqua si ottiene un'emulsione O/W, viceversa se è lipofilo si ottiene un'emulsione W/O.

Se la concentrazione del tensioattivo supera un determinato valore, conosciuto come concentrazione critica micellare, le molecole non si sciolgono più nel solvente ma formano una struttura tridimensionale detta micella colloidale, dotata di carica elettrica superficiale e conformata in modo tale che la parte esterna risulti essere costituita dai gruppi idrofili e la parte interna dai gruppi idrofobici (Figura 1.15).

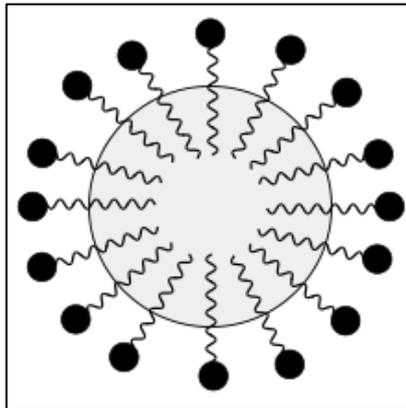


Figura 1.15 – Micella di tensioattivo in solvente acquoso (fase oleosa = cerchio grigio; fase acquosa = parte bianca)

### 1.5.3 Composizione di un'emulsione cosmetica

Un cosmetico è composto principalmente da eccipienti (base cosmetica), sostanze funzionali (principio attivo) e additivi (oli essenziali, profumi, coloranti, conservanti) (Figura 1.20).

La **base cosmetica** ha la funzione di conferire forma e consistenza al prodotto e rappresenta il veicolo tramite il quale il principio attivo entra in contatto con il corpo umano.

I **principi attivi** sono sostanze con una certa attività biologica che partecipano attivamente al miglioramento della superficie biologica su cui vengono applicati.

Vengono indicati come sostanze funzionali perché, aggiunte alla formulazione base, forniscono una precisa funzione al cosmetico come ad esempio idratante, antiossidante, elasticizzante, lenitiva, emolliente.

Gli **oli essenziali** hanno la capacità di agire in modo diretto come principi attivi e allo stesso tempo di profumare i prodotti a cui vengono aggiunti. I profumi e i coloranti servono a rendere l'odore e l'aspetto del prodotto più gradevoli per il consumatore, mentre i conservanti servono a prolungarne la durata.

## 2 SCOPO

Questo lavoro di tesi rappresenta un approccio di bioraffineria che utilizza la tecnica di bioliquefazione molecolare. Lo scopo è la valorizzazione di uno scarto agroalimentare di *Punica granatum* (melograno) di origine italiana, al fine di produrre un prototipo di bioliquefatto utilizzabile come ingrediente ad alto valore aggiunto per funzionalizzare un prodotto biocosmetico.

L'oggetto dello studio è il mesocarpo, la parte non edibile del frutto compresa tra l'esocarpo (buccia) e l'endocarpo (membrana che protegge i semi).

Qui sono contenute numerose sostanze bioattive quali polifenoli, flavonoidi, acidi fenolici e polisaccaridi con proprietà antiossidanti, antimicrobiche, antibatteriche, antinfiammatorie e antitumorali. L'obiettivo è disgregare la struttura polisaccaridica della parete cellulare del mesocarpo e rendere biodisponibili questi composti.

Sono state condotte varie prove di bioliquefazione molecolare con due preparati enzimatici commerciali diversi. Alla fine è stato identificato il metodo di estrazione più adatto per ottenere un bioliquefatto con il maggiore potere antiossidante.

Lo studio si conclude con la caratterizzazione dei bioliquefatti, la formulazione di un'emulsione cosmetica e la sua funzionalizzazione.

Il lavoro di tesi è stato portato avanti in collaborazione con il Centro per le Comunità Solari Locali nell'ambito del progetto "Ribella" che si occupa di biocomesiti naturale e sostenibile. Il concept di "Ribella" è chiudere il ciclo del cibo attraverso la valorizzazione di scarti agroalimentari del territorio con metodi biotecnologici a basso impatto ambientale e in un'ottica di economia circolare. Il progetto si basa sull'idea che l'uomo possa usufruire, come fonte di protezione e nutrimento per la propria pelle, degli stessi principi attivi che le piante che vivono sullo stesso territorio sintetizzano come difesa dalle avversità ambientali.

## 3 MATERIALI E METODI

### 3.1 Materiali

- Mesocarpo di melograno;
- soluzioni tampone citrato 0,05 M pH 3 – 6;
- preparati enzimatici commerciali Rapidase C80 Max, Cellulase da *Aspergillus niger*;
- soluzione di ADNS: acido 3,5 – dinitrosalicilico ( $C_7H_4N_2O_7$ ; 228,12 g/mol)
- reattivo di Folin Ciocalteu;
- soluzione di carbonato di calcio al 10% p/V;
- soluzione di DPPH 100  $\mu$ M: 2,2 – difenil – 1 picrilidrazile ( $C_{18}H_{12}N_5O_6$ ; 394,32 g/mol);
- soluzione di Trolox 192  $\mu$ M: 6 – hydroxy – 2,5,7,8 – tetramethylchroman – 2 - carboxylic acid ( $C_{14}H_{18}O_4$ ; 250,29 g/mol);
- pectina da mela;
- D(+) glucosio monoidrato;
- acido galatturonico.

### 3.2 Strumentazione

- Spettrofotometro UV – Vis Perkin Elmer;
- agitatore – incubatore Termoshake Gerhardt Bonn;
- centrifuga refrigerata Allegra X30;
- viscosimetro Brookfield.

### 3.3 Preparazione soluzioni tampone e reattivi

#### 3.3.1 Soluzioni di tampone citrato 0,05 M

Le soluzioni di tampone citrato allo 0,05 M ai vari pH sono ottenute da diverse combinazioni di acido citrico monoidrato e trisodio citrato diidrato. Per 1 L di soluzione le proporzioni sono riportate in Tabella 3.1.

Tabella 3.1 – Soluzioni di tampone citrato 0,05 M

pH	Acido citrico monoidrato (g)	Trisodio citrato diidrato (g)
3	8,619	2,642
4	6,168	6,073
4,8	4,529	7,769
5	3,716	9,505
6	1,264	12,937

#### 3.3.2 Soluzione di ADNS

Per preparare 250 ml di soluzione si sciolgono 75 g di sodio potassio tartrato in 50 ml di NaOH 2M e si aggiungono 100 ml di acqua distillata. A questa soluzione si aggiungono 0,25 g di ADNS: la dissoluzione è lenta ma non bisogna riscaldare e nemmeno ricorrere al bagno ultrasuoni. Quando l'ADNS è perfettamente sciolto si porta a volume fino a 250 ml con acqua distillata e si conserva a 4°C e al riparo dalla luce.

### 3.4 Due approcci di bioraffineria

Sono state indagate due diverse tecniche di bioraffineria: la prima prevede la separazione del surnatante (fase acquosa) e del solido residuo; la seconda lascia la matrice intatta. Nel primo caso il surnatante, composto principalmente dalla pectina estratta durante il trattamento termico, subisce idrolisi enzimatica della componente pectica con Rapidase C80 Max, mentre il solido residuo, composto maggiormente da cellulosa ed emicellulose, subisce idrolisi enzimatica con Cellulase; nel secondo caso si procede sequenzialmente con i due attacchi su tutto il substrato.

### 3.5 Pretrattamento del campione

Si prende il frutto del melograno già privo della sarcotesta, parte edibile del frutto, e si procede a separazione manuale del mesocarpo dall'esocarpo (buccia), dall'epicarpo e dai residui dei semi. La matrice così ottenuta viene macinata, essiccata in stufa a 45°C fino a peso costante e setacciata a 75 µm per ridurla in polvere.

### 3.6 Trattamento termico

Viene preparata una sospensione con rapporto matrice/acqua al 6% p/V composta da campione e tampone citrato 0,05 M a vari pH (da 3 a 6).

Il campione viene trattato termicamente, in bagno d'acqua sotto reflusso, a diverse temperature (da 30 a 90 °C) e tempi di reazione (da 30 a 80 min). Si sceglie il trattamento termico migliore che permette il maggior rilascio di pectina in soluzione, valutato tramite la determinazione della resa % in pectina.

La resa % in pectina si calcola con metodo di precipitazione in alcol (etanolo assoluto). Il campione pretrattato viene raffreddato, centrifugato a 4400 rpm per 20 minuti per separare il surnatante, contenente la maggior percentuale di pectina disciolta, e il solido residuo. Un volume noto di surnatante viene aggiunto sotto agitazione, goccia a goccia, in una beuta contenente la stessa quantità in volume di etanolo. Dopo una notte in frigo, la soluzione ottenuta viene centrifugata e il solido precipitato viene filtrato, lavato con etanolo ed essiccato in stufa a 45 °C fino a peso costante. La resa % di pectina è calcolata come in Equazione (1).

$$(1) \text{ resa \% pectina} = \frac{g \text{ pectina}}{g \text{ mesocarpo iniziali}} * 100$$

### 3.7 Reazione enzimatica

Le reazioni di idrolisi delle strutture polisaccaridiche sono state condotte mediante l'uso di preparati enzimatici specifici e monitorate in termini di rilascio di zuccheri riducenti, eseguendo dei prelievi da 0,5 ml ogni 20 minuti fino alla prima ora e ogni 30 minuti per le ore successive.

Tutte le reazioni con enzimi ad azione pectinasica sono state condotte:

1. in tampone citrato 0,05 M e pH compreso tra 3 e 5;
2. a diverse concentrazioni di enzima da 0,02 a 0,25 % V/g solido secco;
3. a T = 50°C, 110 rpm, monitorando la reazione per un tempo t= 0-4 h.

### **3.7.1 Primo caso: separazione surnatante e solido residuo**

Dopo trattamento termico la soluzione viene fatta raffreddare e il surnatante e il solido residuo vengono separati per centrifugazione a 4400 rpm per 20 minuti.

Sul surnatante viene condotta l'idrolisi della componente pectica a pH 3,4 e 5 con Rapidase C80 Max 0,25% V/g solido secco per 2,5 ore; sul residuo solido quella della componente cellulosica, a pH 5 con Cellulase da *Aspergillus Niger* 0,1% V/g solido secco per 4 ore.

I bioliquefatti così ottenuti vengono conservati tal quale e anche combinati in rapporto 1:1.

### **3.7.2 Secondo caso: matrice intera**

Per quanto riguarda l'attacco enzimatico sulla matrice intera sono state mantenute le stesse condizioni operative dell'idrolisi sul surnatante e sul solido residuo. Sullo stesso campione è stata eseguita prima l'idrolisi con Rapidase C80 Max e, dopo disattivazione tramite bollitura della soluzione, con Cellulase da *Aspergillus niger*.

### **3.7.3 Caratterizzazione dei bioliquefatti**

I bioliquefatti sono stati caratterizzati in termini di contenuto di:

1. zuccheri riducenti: metodo dell'ADNS;
2. carboidrati totali: metodo fenolo/solforico;
3. polifenoli totali: metodo di Folin – Ciocalteu;
4. potere antiossidante: metodo del DPPH.

Le misure dei carboidrati totali sono state effettuate in doppio. Tutte le restanti in quadruplo. Tutti i risultati sono espressi come deviazione standard rispetto alla media dei valori.

### 3.8 Emulsione cosmetica

È stata preparata un'emulsione cosmetica olio in acqua secondo la ricetta riportata in Tabella 3.2 (base cosmetica) e poi funzionalizzata con i bioliquefatti che hanno mostrato maggiore potere antiossidante.

La fase acquosa e la fase oleosa vengono preparate in due becker diversi.

I componenti della fase acquosa, tranne la gomma xantana, vengono miscelati insieme. Si pone la soluzione sotto agitazione e si aggiunge la gomma xantana a pioggia al centro del vortice. Si continua a miscelare finché non si genera un gel uniforme senza grumi. Il gel viene scaldato fino a 75°C.

I componenti della fase oleosa vengono miscelati tutti insieme, si pone la soluzione sotto agitazione e si attende la completa dissoluzione delle sostanze fino ad ottenere un olio uniforme e limpido. L'olio viene scaldato fino a 70 °C (temperatura di funzionamento dell'emulsionante).

Quando entrambe le soluzioni hanno raggiunto la temperatura voluta, si pone la fase acquosa sotto vigorosa agitazione con un frullatore ad immersione e si aggiunge a filo la fase oleosa. Una volta raggiunta un'emulsione stabile, si continua a mescolare manualmente fino a completo raffreddamento.

Si aggiunge, a questo punto, la profumazione scelta e gli eventuali additivi. La crema è pronta per essere funzionalizzata: si aggiunge il 2% in peso di bioliquefatto. Il pH viene portato a 5,5 con acido citrico 30% p/p.

Tabella 3.2 – Dosi per 100 g di base cosmetica

Fase	Ingredienti (nome commerciale)	g
<b>FASE ACQUOSA</b>		
	Acqua distillata	80
	Sodio benzoato (conservante)	0,45
	Potassio sorbato (conservante)	0,3
	Glicerina (umettante)	3
	Gomma xantana (gelificante e stabilizzante)	0,8
<b>FASE OLEOSA</b>		
	Olio di mandorle dolci	4
	Olio di girasole	3
	Olio di germe di grano	2,5
	Olio di melograno	0,5
	Burro di karité	1,5
	Tegocare PS (emulsionante)	2
	Alcol cetilico (fattore di consistenza)	0,5
<b>ADDITIVI</b>		
	Olio essenziale di mandarino (profumo)	1,45

### 3.8.1 Caratterizzazione delle creme e prove di stabilità

Le emulsioni cosmetiche sono state caratterizzate, al fine di scegliere quella con le proprietà migliori, mediante misura del potere antiossidante e della viscosità.

Per il saggio del potere antiossidante, siccome la crema risulta insolubile in metanolo è stata disciolta in una soluzione composta da  $\frac{3}{4}$  di acqua e  $\frac{1}{4}$  di metanolo.

Per la misura della viscosità è stato utilizzato un viscosimetro Brookfield con girante R5 e 100 rpm.

## 3.9 Saggi colorimetrici

### 3.9.1 Determinazione degli zuccheri riducenti: metodo dell'ADNS

La procedura è basata sul metodo spettrofotometrico di Bailey *et al.* del 1992<sup>14</sup>. La quantità di zuccheri semplici rilasciati dall'idrolisi viene determinata dopo reazione ossidoriduttiva con ADNS. Gli zuccheri reagiscono con l'ADNS liberando un acido carbossilico e la forma ridotta dell'ADNS. In figura 3.1 è rappresentata la reazione del glucosio ad acido gluconico.

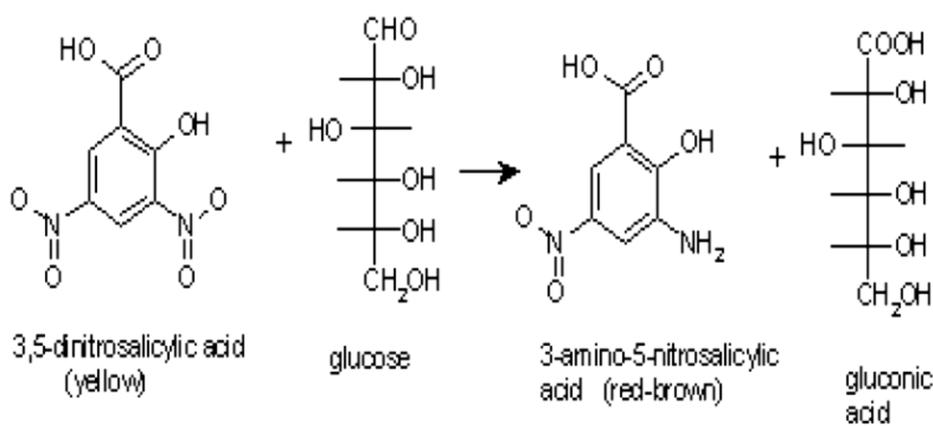


Figura 3.1 – Reazione di ossidoriduzione tra acido 3,5 – dinitrosalicilico e glucosio

A 0,4 ml di campione diluito in acqua distillata vengono aggiunti 0,6 ml di ADNS; il tutto viene fatto bollire per 5 minuti per far sviluppare la reazione e la tipica colorazione arancione. Dopo centrifugazione a 1300 rpm per 5 minuti e raffreddamento in acqua fredda, si esegue la lettura a 550 nm contro un bianco composto da acqua distillata e ADNS. Per ogni concentrazione di enzima si esegue la lettura di un bianco composto da soluzione tampone ed enzima, allo stesso rapporto substrato/enzima presente nel bulk di reazione, e ADNS.

Le soluzioni standard per costruire le rette di taratura sono:

- soluzioni standard di D(+) glucosio monoidrato con concentrazioni da 0,2 a 1 mg/ml (Figura 3.2);
- soluzioni standard di acido galatturonico con concentrazioni da 0,2 a 1 mg/ml (Figura 3.3)

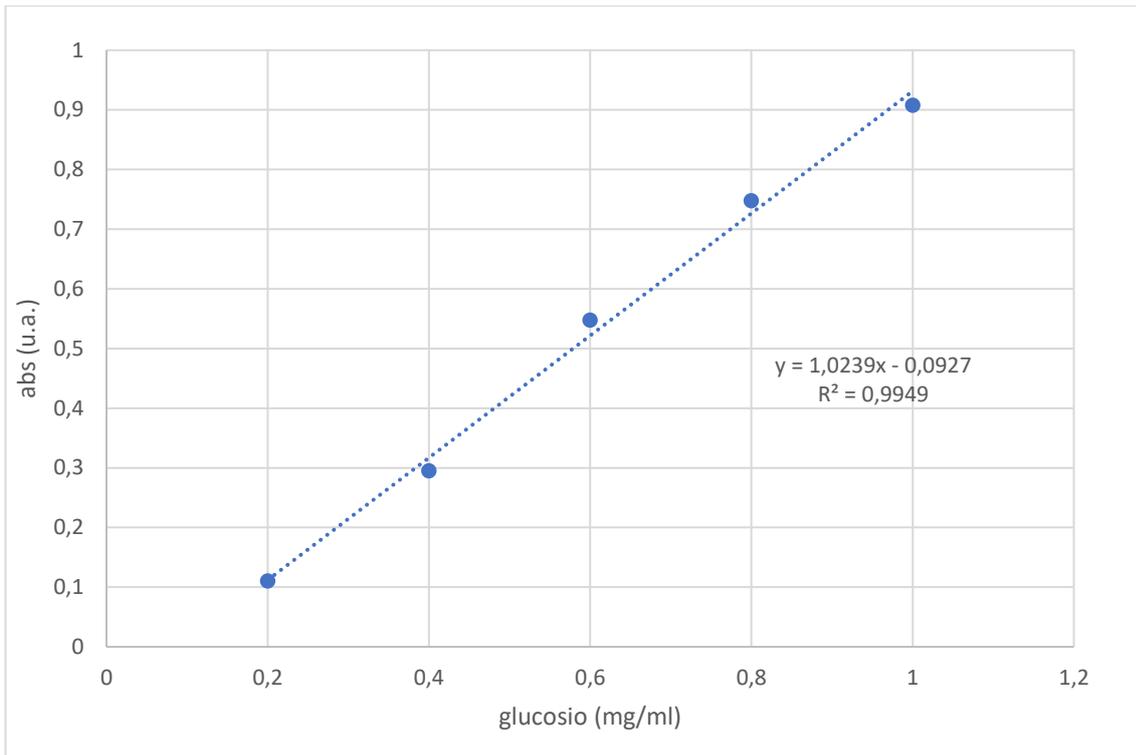


Figura 3.2 – Retta di taratura del glucosio

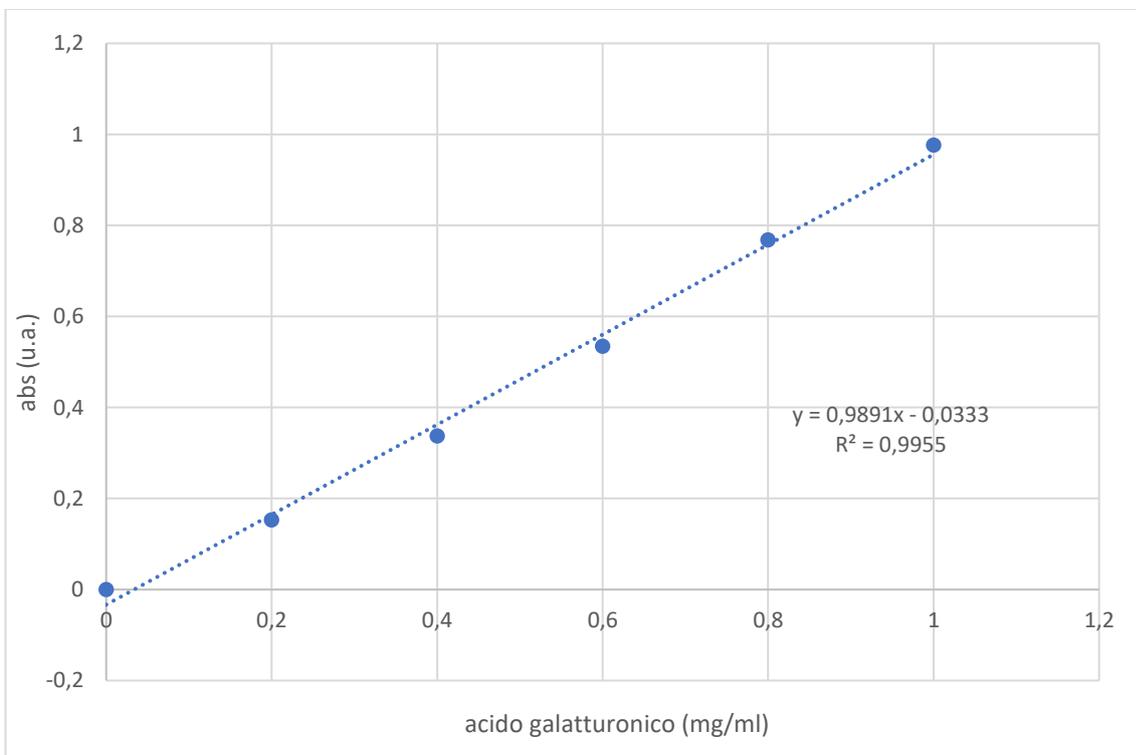


Figura 3.3 – Retta di taratura dell'acido galatturonico

### 3.9.2 Determinazione dei carboidrati totali: metodo fenolo/solforico

La determinazione è basata sul metodo ideato da Chaplin M.F. *et al.* nel 1986 <sup>15</sup>. La quantità di carboidrati totali, che comprende anche gli zuccheri riducenti, viene calcolata mediante reazione con fenolo e acido solforico con un'analisi spettrofotometrica. Si aggiunge prima il fenolo che complessa le molecole di glucosio e in seguito l'acido solforico che rompe i legami appena formati, producendo derivati del furfurale. Il fenolo viene aggiunto in eccesso per assicurare la complessazione.

A 0,2 ml di campione diluito in acqua distillata vengono aggiunti prima 0,2 ml di fenolo 5% p/V e poi 1 ml di acido solforico concentrato. Si agita vigorosamente e si lascia raffreddare fino a 30 °C per far sviluppare la reazione e la colorazione bruna. La lettura viene fatta a 490 nm contro un bianco composto da acqua distillata, fenolo e acido.

Per misurare la concentrazione di carboidrati totali presenti nel campione si utilizza la retta di taratura del glucosio costruita con soluzioni standard con concentrazioni da 0,02 a 0,1 mg/ml (Figura 3.4).

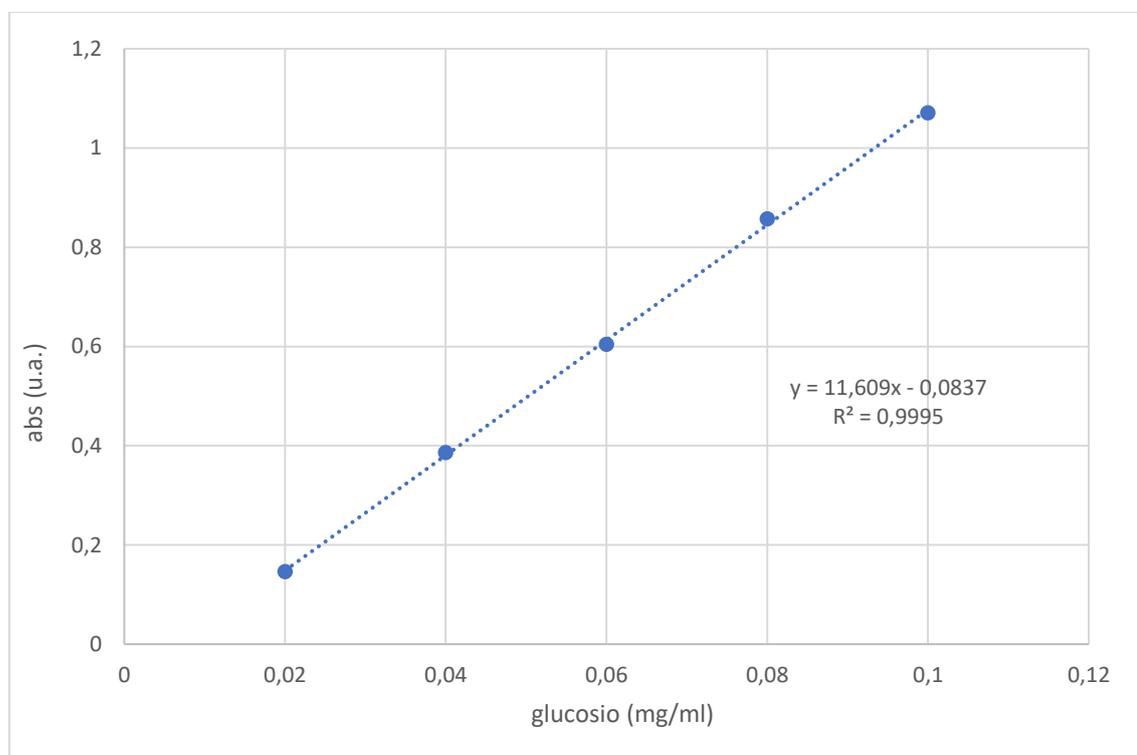


Figura 3.4 – Retta di taratura del glucosio

### 3.9.3 Determinazione dei polifenoli totali: metodo di Folin – Ciocalteu

La tecnica iniziale è stata sviluppata da Folin e Ciocalteu nel 1927 per l'analisi della tirosina<sup>16</sup>. Il metodo spettrofotometrico prevede la reazione redox, in ambiente basico, tra i composti fenolici e il reattivo di Folin – Ciocalteu (miscela di acido fosfotungstico e fosfomolibdico) che porta alla formazione di complessi blu di ossidi di W e Mo.

Il reattivo di Folin – Ciocalteu non è specifico perciò bisogna eliminare gli interferenti (esempio le proteine) e i contaminanti organici con una Cartuccia C18 endcapped.

La procedura da seguire è:

1. lavaggio della cartuccia con 2 ml di metanolo;
2. condizionamento della cartuccia con 5 ml di acido solforico 0,01 N;
3. adsorbimento di 1 ml di campione diluito in acido solforico 0,1 N;
4. eluizione dentro a matraccio da 20 ml con 2 ml di metanolo;
5. eluizione dentro a matraccio con 5 ml di acqua distillata.

Dentro al matraccio:

6. aggiunta di 1 ml di reattivo di Folin – Ciocalteu;
7. dopo 5 minuti, aggiunta di 4 ml di carbonato di calcio al 10% p/V.

Si porta a volume con acqua distillata e si lascia sviluppare la reazione per 90 minuti a temperatura costante. Si centrifuga per sedimentare il precipitato di carbonato e si legge l'assorbanza a 700 nm contro un bianco di solo metanolo.

La concentrazione di composti fenolici presenti nel campione viene determinata utilizzando la retta di taratura della catechina costruita con soluzioni standard con concentrazioni da 20 a 300 mg/l (Figura 3.5).

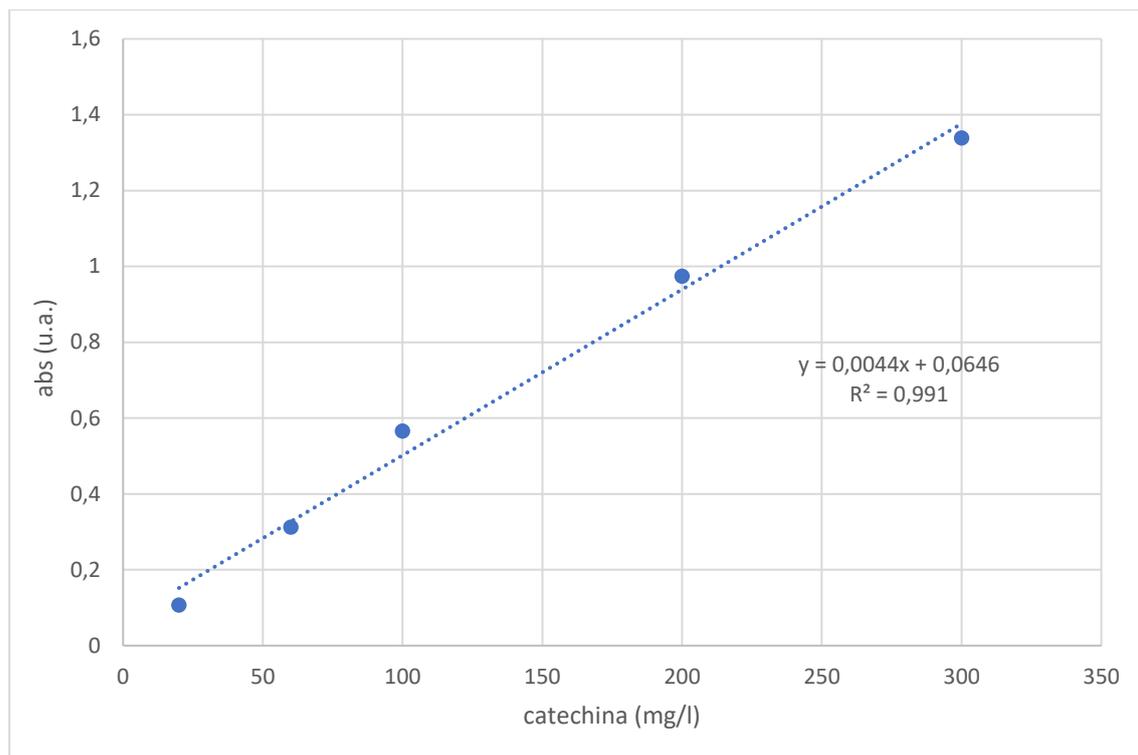
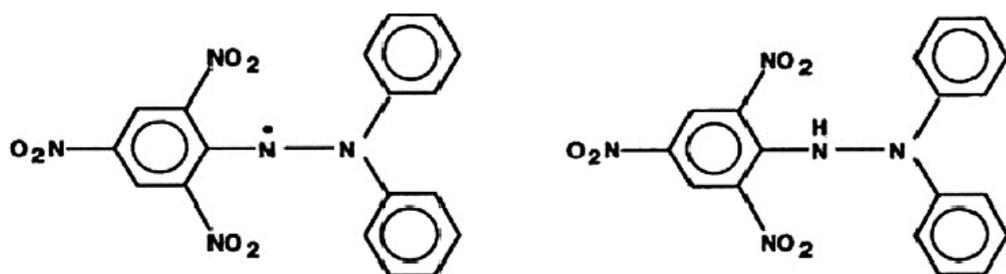


Figura 3.5 – Retta di taratura della catechina

### 3.9.4 Determinazione del potere antiossidante: metodo del DPPH

Il procedimento è basato sul metodo elaborato da Brand – Williams *et al.* nel 1995<sup>17</sup>. Il potere antiossidante si misura determinando la capacità del campione di inibire l'attività ossidante del DPPH radicalico tramite donazione di un protone (Figura 3.6).



1: Diphenylpicrylhydrazyl (free radical)

2: Diphenylpicrylhydrazine (nonradical)

Figura 3.6 – DPPH radicalico (1) e forma stabile (2)

Mediante misura spettrofotometrica si rileva la quantità di DPPH radicalico residuo e da questa si ricava il potere antiossidante espresso in unità ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), corrispondenti a  $\mu$ mol di Trolox equivalenti per litro di campione. Il Trolox è un composto antiossidante utilizzato come standard di riferimento.

A 0,5 ml di campione diluito in metanolo si aggiungono 1,5 ml di DPPH 100  $\mu\text{M}$  in metanolo. La misura dell'assorbanza viene eseguita a 517 nm contro un bianco di solo metanolo. Vengono effettuate due letture a  $t_0$  (soluzione viola) e  $t_{30}$  dopo 30 minuti al buio (soluzione viola chiaro). Si legge anche l'assorbanza di un bianco costituito da 0,5 ml di metanolo e 1,5 ml di DPPH a  $t_0$  e  $t_{30}$ .

Per la determinazione del potere antiossidante si procede nel seguente modo:

1. si convertono le letture di assorbanza ai due tempi in concentrazioni di DPPH utilizzando la retta di taratura del DPPH;
2. si calcola la concentrazione residua di DPPH facendo il rapporto tra le concentrazioni (Equazione (2));

$$(2) \text{ rem} = \frac{\text{concentrazione DPPH } t_{30}}{\text{concentrazione DPPH } t_0}$$

3. si converte il rem in concentrazione di Trolox utilizzando la retta di taratura del Trolox;
4. si calcolano le  $\mu\text{mol}$  equivalenti di Trolox moltiplicando la concentrazione per il volume totale (2 ml);
5. si calcolano le unità ORAC/L con l'Equazione (3).

$$(3) \text{ unità } \frac{\text{ORAC}}{\text{L}} = \frac{\mu\text{mol equivalenti di Trolox}}{\text{ml campione}} * \text{diluizione} * \text{fattore di conversione } \frac{\text{ml}}{\text{l}}$$

Le soluzioni standard per costruire le rette di taratura sono:

- soluzioni standard di DPPH in metanolo con concentrazioni da 20 a 100  $\mu\text{mol/L}$  (Figura 3.7);
- soluzioni standard di Trolox in metanolo con concentrazioni da 6 a 192  $\mu\text{mol/L}$  (Figura 3.8).

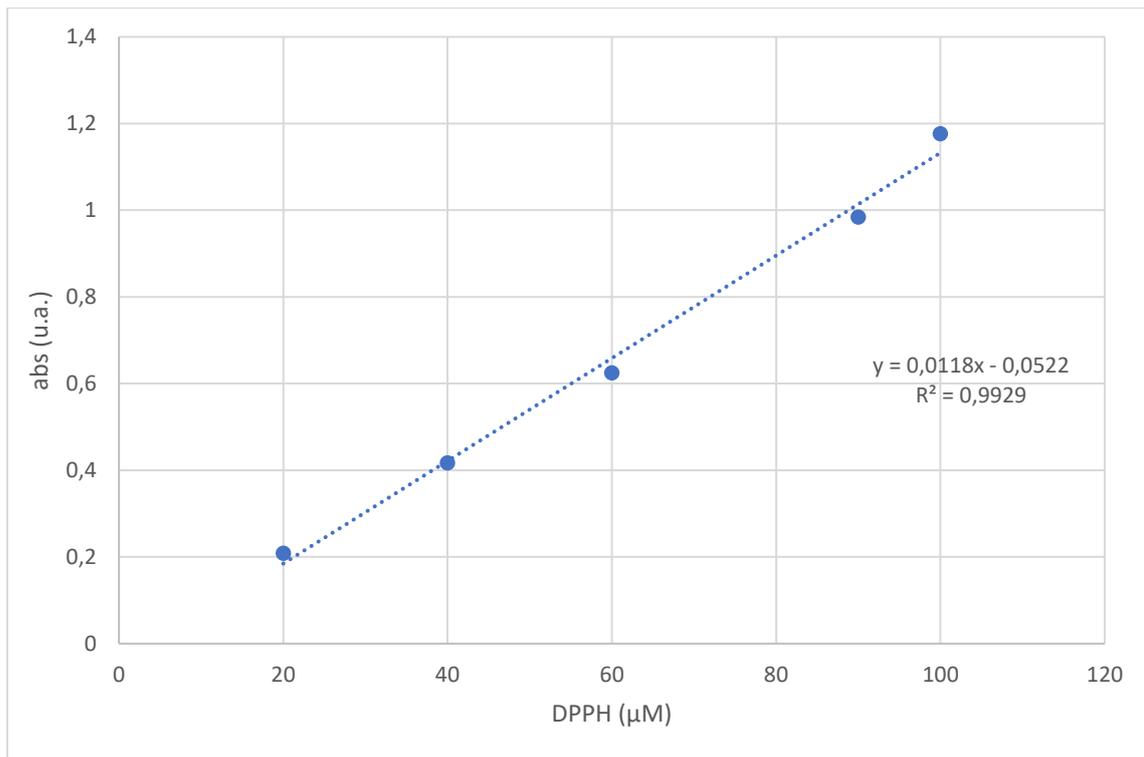


Figura 3.7 – Retta di taratura del DPPH

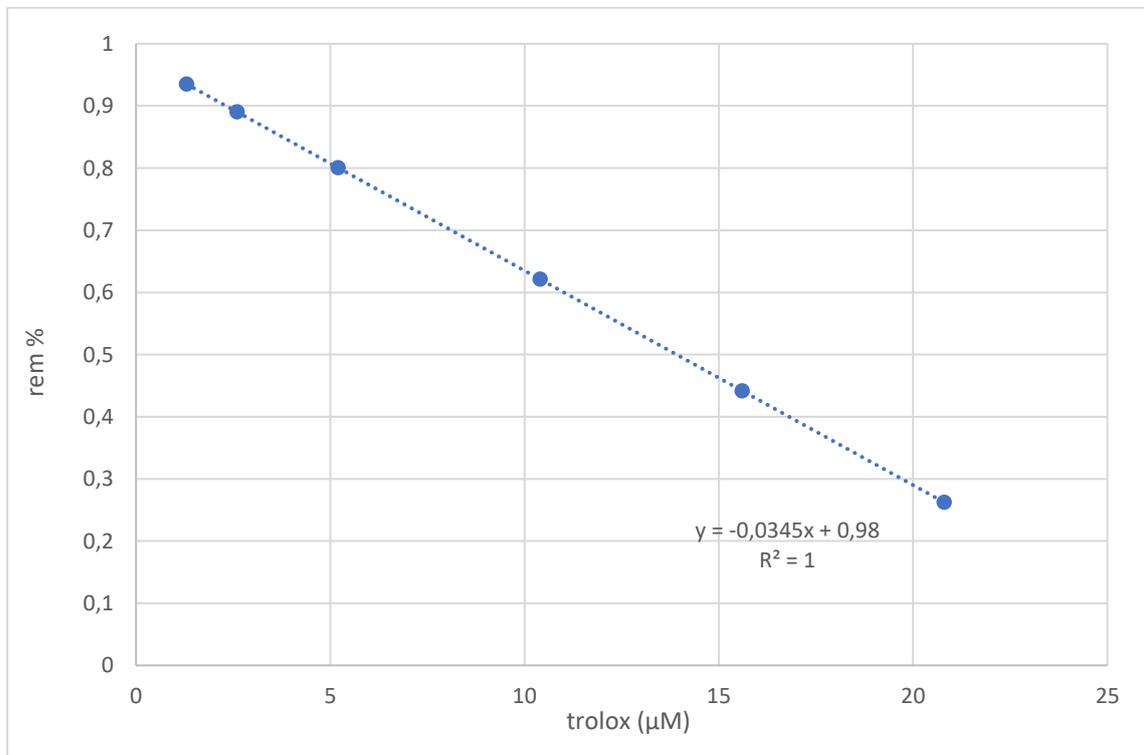


Figura 3.8 – Retta di taratura del Trolox

## 4 RISULTATI E DISCUSSIONE

Per ottenere i bioliquefatti dal mesocarpo di melograno mediante un processo di bioraffineria, sono state valutate due diverse strategie, riportate in Figura 4.1:

- la prima prevede la separazione, dopo il trattamento termico, del surnatante e del solido residuo e successiva idrolisi enzimatica, condotta separatamente sui due substrati;
- la seconda prevede di mantenere la matrice intera, cioè come risulta da trattamento termico, e di condurre due attacchi enzimatici sequenziali sullo stesso substrato.

Il criterio di scelta tra i bioliquefatti ottenuti attraverso le diverse strategie è la massima concentrazione di sostanze bioattive presenti. Infatti lo scopo principale dello studio è ottenere un ingrediente (il bioliquefatto) ad alto valore aggiunto, per funzionalizzare un prodotto biocosmetico, con effetti benefici sulla salute della pelle: la scelta finale tiene conto del bioliquefatto che conferisce determinate caratteristiche al prodotto finito, quali potere antiossidante, viscosità e stabilità dell'emulsione.

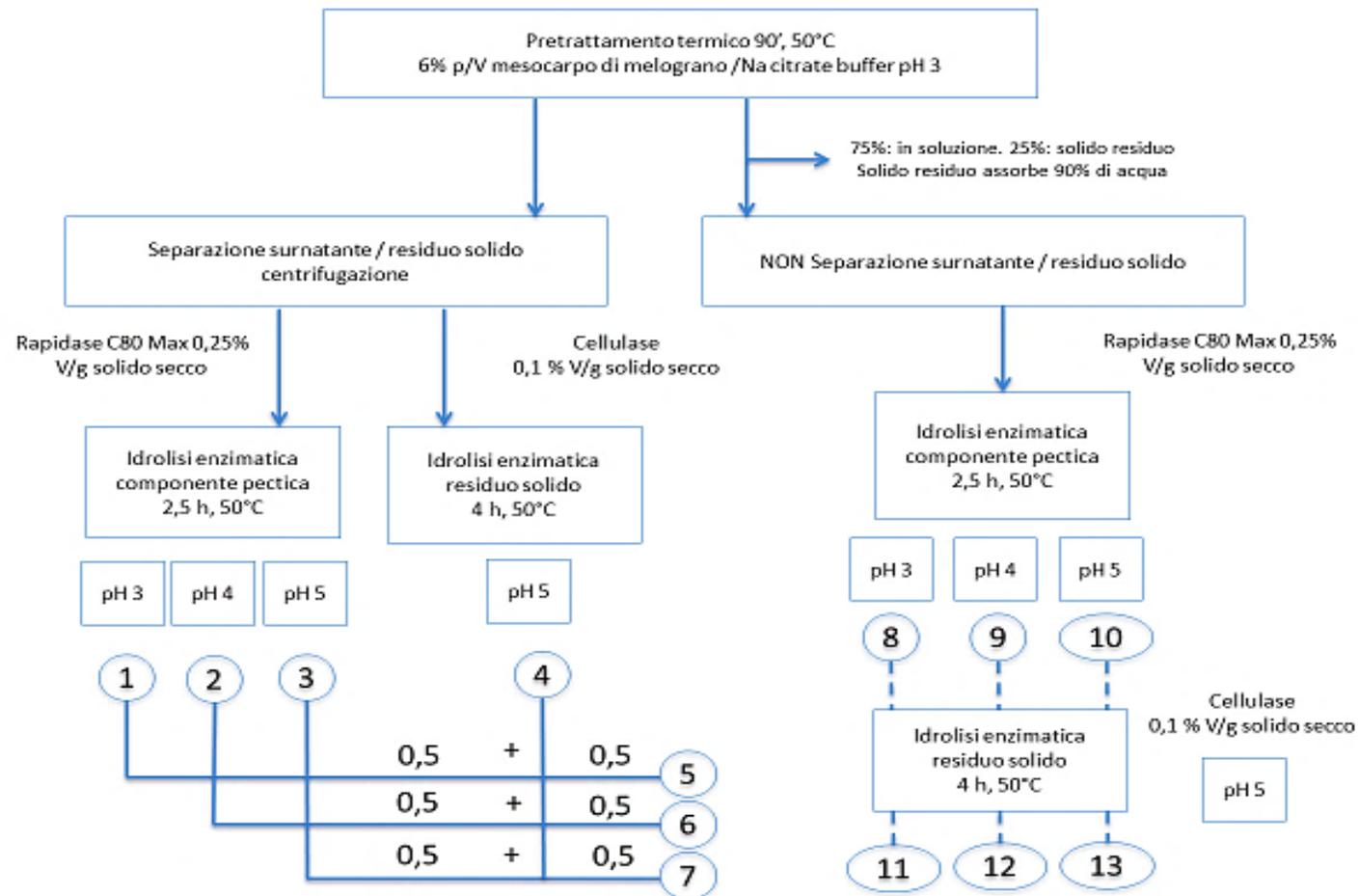


Figura 4.1 – Processi di bioraffineria proposti

## 4.1 Scelta del trattamento termico

Il trattamento termico permette di portare in soluzione la pectina libera, ovvero idrosolubile, che subirà successivamente l'attacco enzimatico con pectinasi.

All'aumentare del tempo e della temperatura si osserva un graduale aumento della viscosità della soluzione, dato da un maggior rilascio di pectina, fino al raggiungimento della temperatura di transizione vetrosa caratteristica del sistema in esame. Le migliori condizioni di estrazione sono risultate essere: T = 90°C, t = 50 minuti. Le estrazioni sono state condotte a diversi pH ed è stata determinata la quantità di pectina estratta espressa in resa %. I risultati sono riportati in Tabella 4.1.

Tabella 4.1 – Resa % pectina a diversi pH

Campione	S/L (%)	pH	T °C	t (min)	Resa (%)
1	6	3	90	50	10
2	6	4	90	50	8
3	6	5	90	50	7
4	6	6	90	50	7

Si osserva una resa % maggiore a pH 3: il risultato può essere attribuito al maggior indebolimento della parete cellulare vegetale e alle minori interazioni tra pectina e cellulosa a pH acidi <sup>18</sup>.

Le condizioni scelte per il trattamento termico sono evidenziate in giallo.

Dopo il trattamento termico il campione si presenta suddiviso in:

- 75% di pectina solubilizzata nel surnatante (fase acquosa),
- 25% di solido residuo insolubile composto da cellulosa ed emicellulose, che trattiene il 90% di acqua.

## 4.2 Reazione enzimatica

Dopo il trattamento termico il campione subisce bioliquefazione molecolare: l'intento è aggredire prima le strutture polisaccaridiche che compongono la parte esterna della parete cellulare vegetale, maggiormente pectine, e poi quelle più interne, formate principalmente da cellulosa ed emicellulose. Tra i prodotti dell'idrolisi vi sono zuccheri riducenti quali acido galatturonico, glucosio, xilosio.

Gli enzimi agiscono in un range di temperatura e pH ottimali ai quali presentano un'attività maggiori. Un altro fattore da prendere in considerazione è la concentrazione del substrato e dell'enzima: se non intercorrono processi inibitori, all'aumentare della concentrazione del substrato o dell'enzima aumenta la velocità di reazione fino al raggiungimento delle condizioni di saturazione del sistema in esame. Infine, gli enzimi spesso possiedono anche attività differenti da quella dichiarata. Queste attività minori possono influenzare positivamente o negativamente (inibizione) l'idrolisi enzimatica <sup>19</sup>. Siccome l'oggetto di studio è una matrice vegetale complessa di cui non si conoscono tutti i componenti, è complicato attribuire i risultati ottenuti alle varie attività possedute dall'enzima ed è indispensabile procedere con degli studi preliminari su substrati commerciali.

A questo scopo è stata indagata l'inibizione competitiva causata dagli stessi prodotti di idrolisi (acido galatturonico e glucosio) su un substrato di pectina commerciale.

Nei grafici in Figura 4.2 – 4.4 sono riportati i risultati ottenuti con Rapidase C80 Max 0,05% su pectina da mela 0,75% p/V a pH 3. Al substrato sono stati aggiunti 20 mg/ml di glucosio e 3 mg/ml di acido galatturonico. L'andamento della reazione è stato osservato in termini di mg/ml di zuccheri riducenti rilasciati.

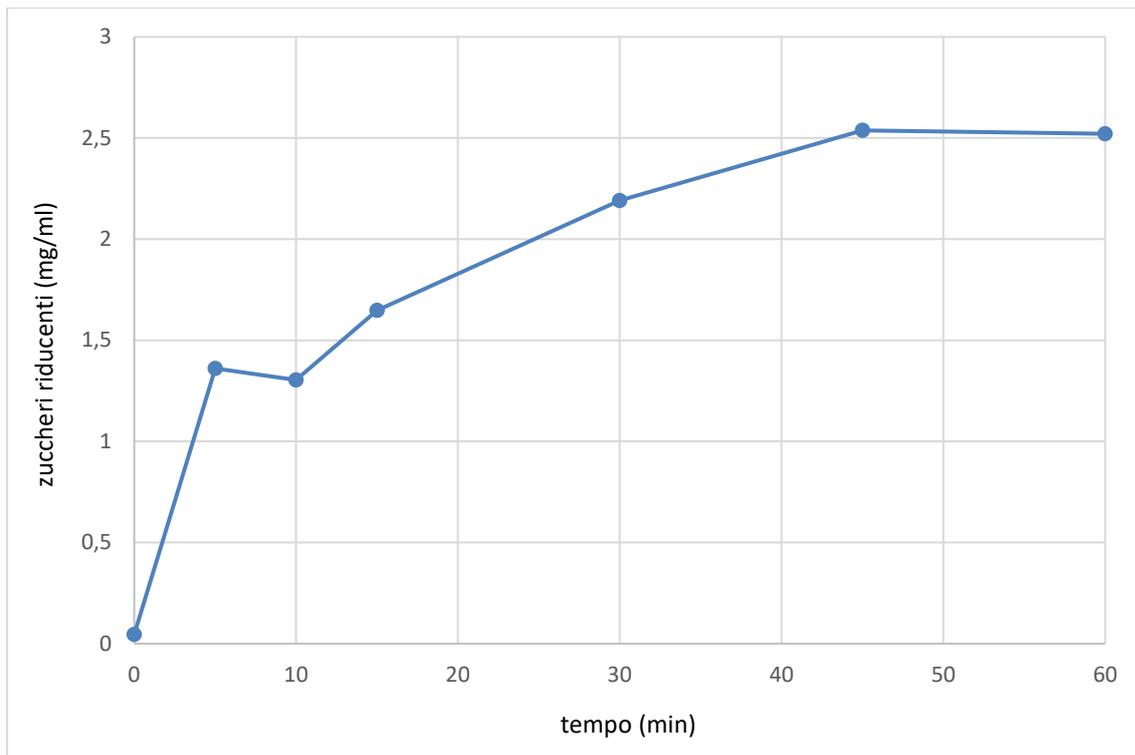


Figura 4.2 – Cinetica di Rapidase C80 Max 0,05% su pectina da mela 0,75% p/V a pH 3

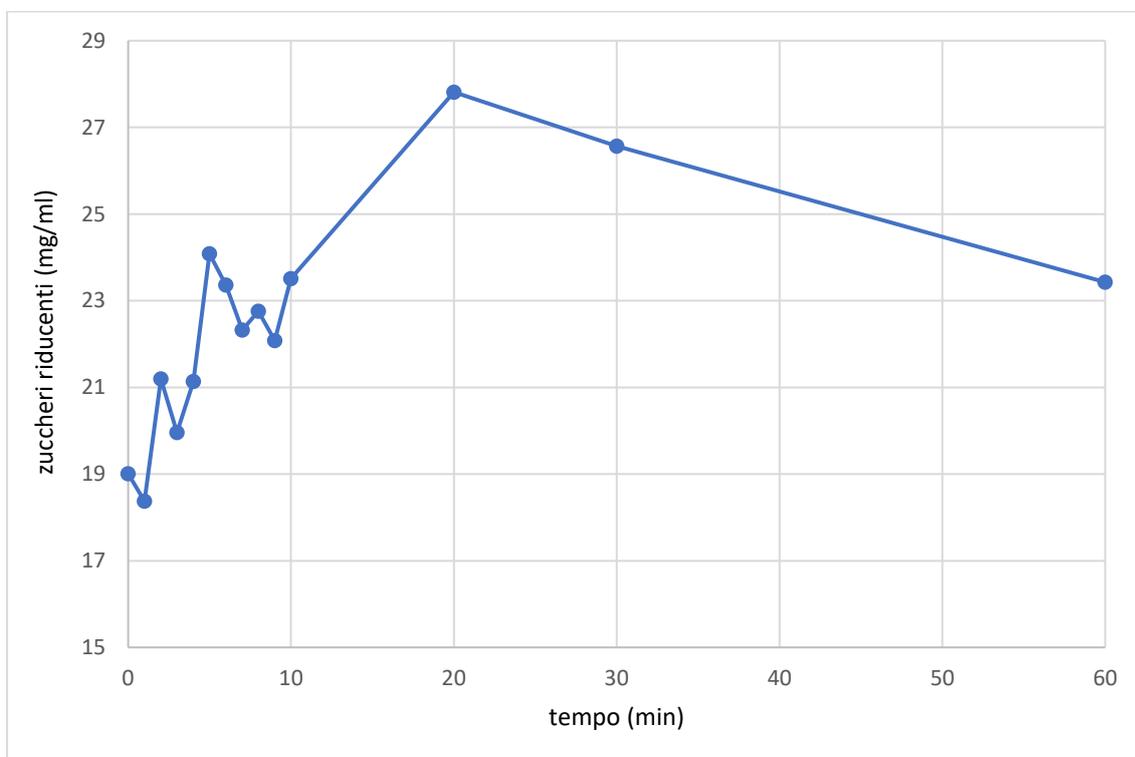


Figura 4.3 – Cinetica di Rapidase C80 Max 0,05% su pectina da mela 0,75% p/V e glucosio 20 mg/ml a pH 3

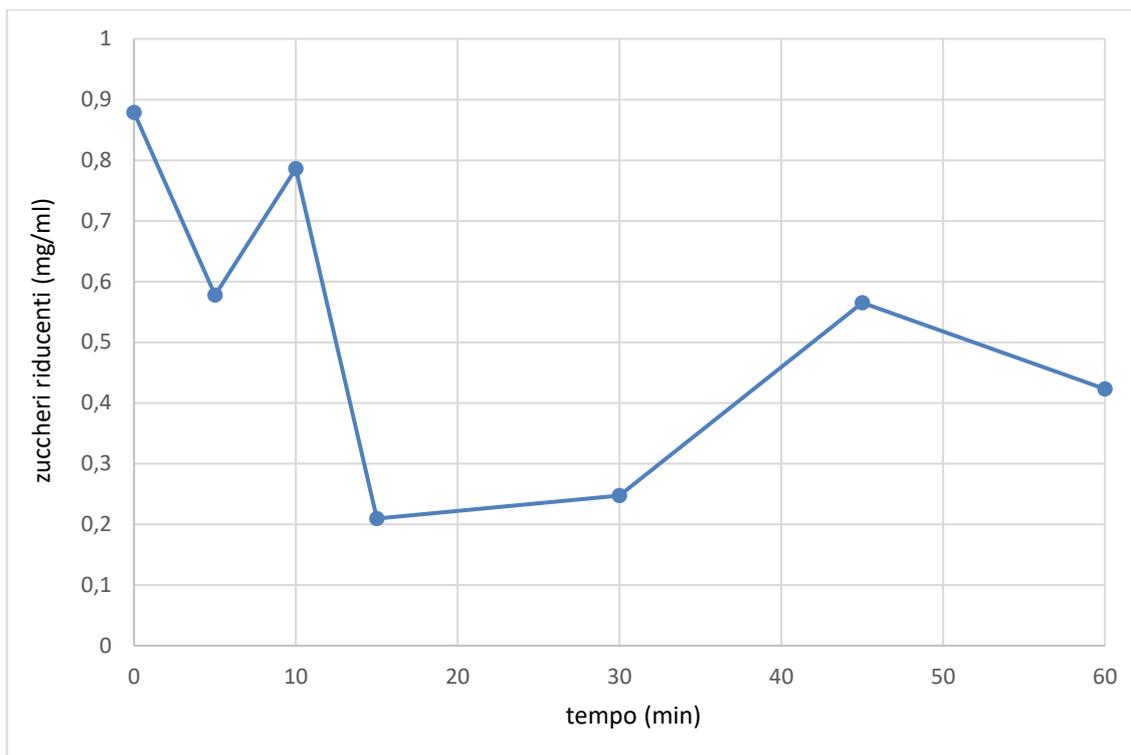


Figura 4.4 – Cinetica di Rapidase C80 Max 0,05% su pectina da mela 0,75% p/V e acido galatturonico 3 mg/ml a pH 3

La curva in Figura 4.1 mostra un andamento lineare e crescente con l'avanzare del tempo di reazione fino al raggiungimento delle condizioni di saturazione del sistema. Dopo un'ora si registra un rilascio di 2,5 mg/ml di acido galatturonico.

La curva in Figura 4.2 mostra già al tempo zero un rilascio di zuccheri riducenti pari a 19 mg/ml, corrispondenti alla quantità di glucosio aggiunta al substrato. La reazione prosegue poi con un andamento crescente fino a 20 minuti, dopodiché l'enzima si disattiva.

La curva in Figura 4.3 mostra un andamento discontinuo e decrescente, indice che l'enzima subisce inibizione competitiva dal prodotto stesso dell'idrolisi. Tuttavia, si ipotizza che questa inibizione non abbia effetti sulla reazione fino al raggiungimento del rilascio di 3 mg/ml di acido galatturonico <sup>20</sup>.

#### 4.2.1 Primo caso: separazione della matrice in surnatante e solido residuo

Le prove di bioliquefazione con Rapidase C80 Max sul surnatante sono state condotte inizialmente a pH 3 e a diverse concentrazioni di enzima: da 0,02 a 0,25% V/g solido secco.

I risultati ottenuti sono riportati in Figura 4.5.

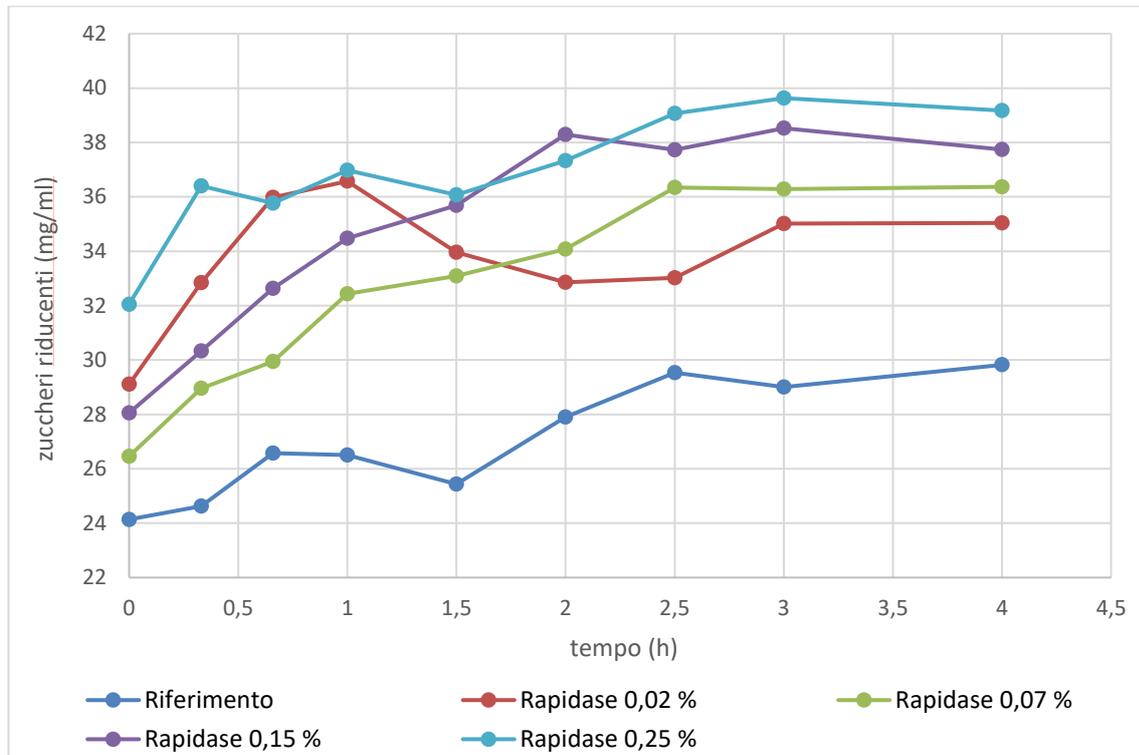


Figura 4.5 – Prove di bioliquefazione sul surnatante con Rapidase C80 Max, pH 3, concentrazione da 0,02 a 0,25% V/g solido secco

La Rapidase C80 Max mostra un andamento, in termini di rilascio di zuccheri riducenti, lineare e crescente in funzione del tempo di reazione. Inoltre, la quantità di zuccheri rilasciati aumenta in modo proporzionale con l'aumentare della concentrazione di enzima.

Dopo 2,5 ore, si arriva a saturazione del substrato: la quantità di zuccheri rilasciati rimane costante. La concentrazione più bassa (linea rossa) arriva a saturazione entro l'ora, indice che l'enzima è troppo poco rispetto al substrato disponibile.

Le concentrazioni più alte (linee viola e azzurre) mostrano un grado di idrolisi migliore e un rilascio di zuccheri superiore.

Il risultato migliore si ha dopo 2,5 ore di attacco enzimatico con Rapidase C80 Max 0,25% V/g solido secco; l'idrolisi rilascia 39 mg/ml di zuccheri riducenti con un aumento del 34% rispetto al riferimento.

L'idrolisi della componente pectica è stata condotta per 2,5 ore con Rapidase C80 Max 0,25% V/g solido secco a diversi pH allo scopo di individuare il pH con la massima attività enzimatica. Il grafico in Figura 4.6 mostra l'andamento delle curve a pH 3,4 e 5.

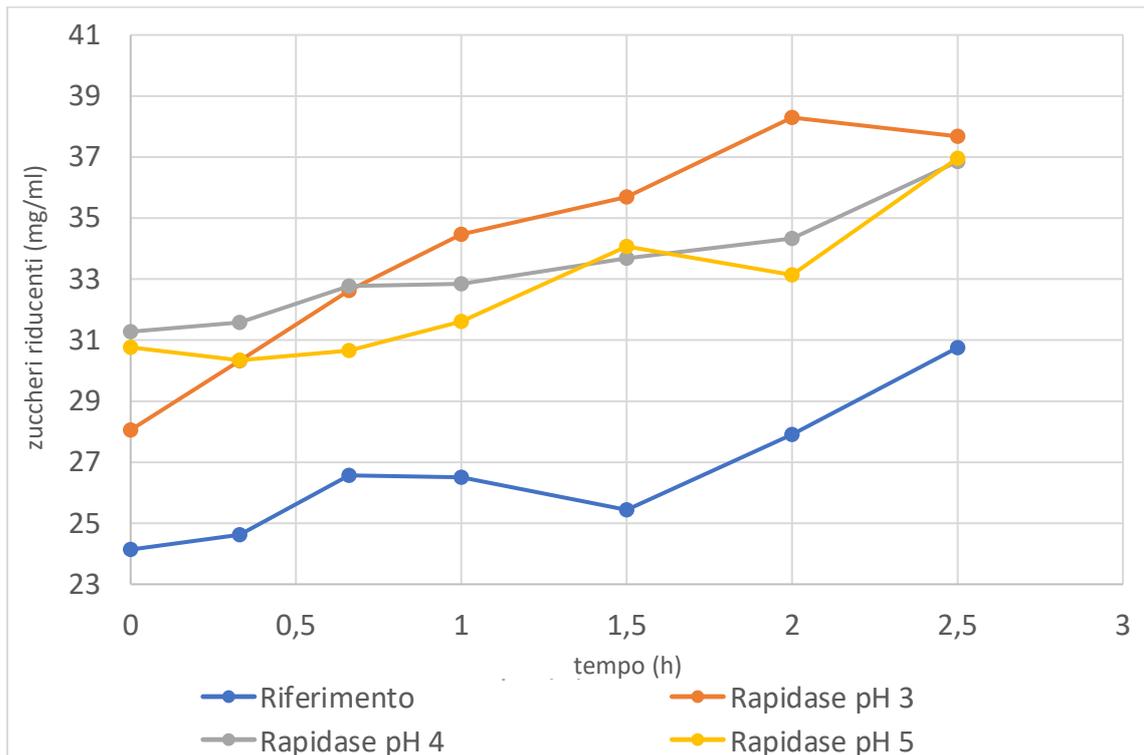


Figura 4.6 – Prove di bioliquefazione sul surnatante con Rapidase C80 Max, 0,25% V/g solido secco, pH da 3 a 5

Il grafico mostra che l'attività enzimatica della Rapidase C80 Max all'avanzare del tempo di reazione, non subisce sostanziali cambiamenti in funzione del pH. Si è scelto, quindi, di caratterizzare tutti e tre i bioliquefatti al fine di individuare quello con le proprietà migliori (soprattutto antiossidanti).

Le prove di bioliquefazione sul solido residuo sono state condotte a pH 5 con Cellulase da *Aspergillus niger* 0,1% V/g solido secco per 4 ore. L'andamento della reazione è visibile in Figura 4.7.

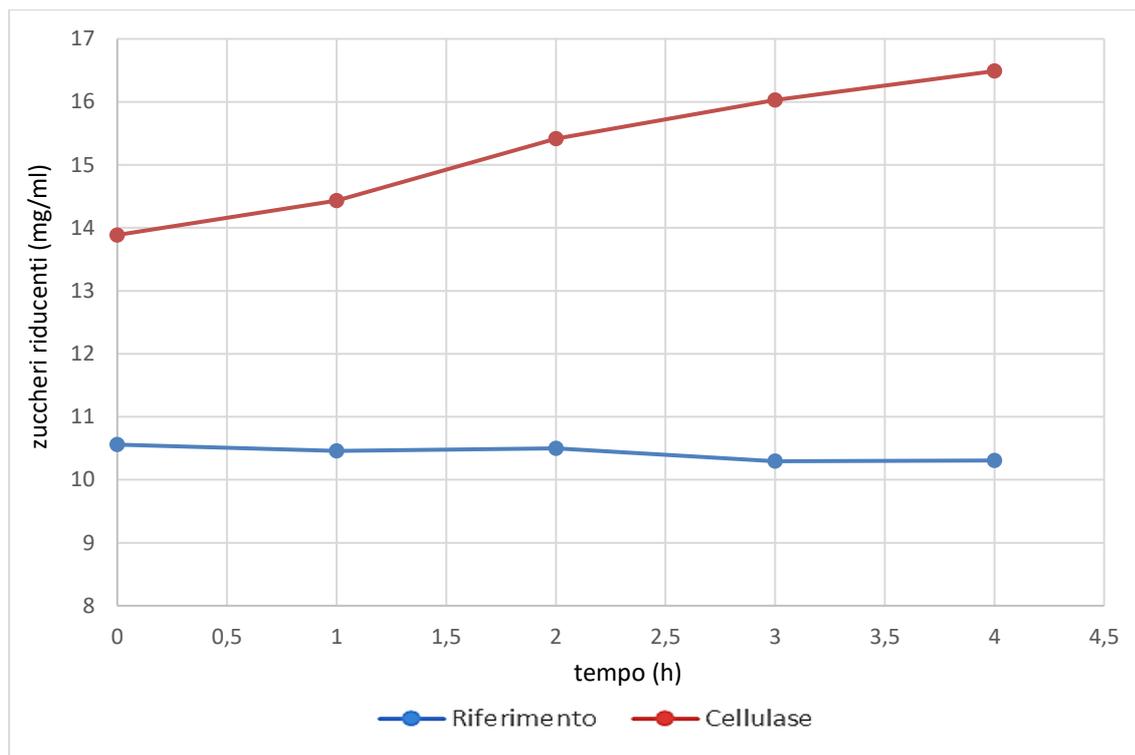


Figura 4.7 – Prove di bioliquefazione sul solido con Cellulase da *Aspergillus niger*, pH 5, 0,1% V/g solido secco

Dal grafico si nota che l'andamento è crescente con l'aumentare del tempo di reazione e per  $t = 4$  ore si registra un rilascio di zuccheri riducenti pari a 16 mg/ml con un aumento del 60% rispetto al riferimento.

#### 4.2.2 Secondo caso: matrice intera

Le prove di bioliquefazione con Rapidase C80 Max sulla matrice intera sono state condotte alle stesse condizioni di reazione del primo caso.

I grafici in Figura 4.8 e 4.9 mostrano le prove di bioliquefazione effettuate prima a diverse concentrazioni di enzima e poi a diversi pH con Rapidase C80 Max.

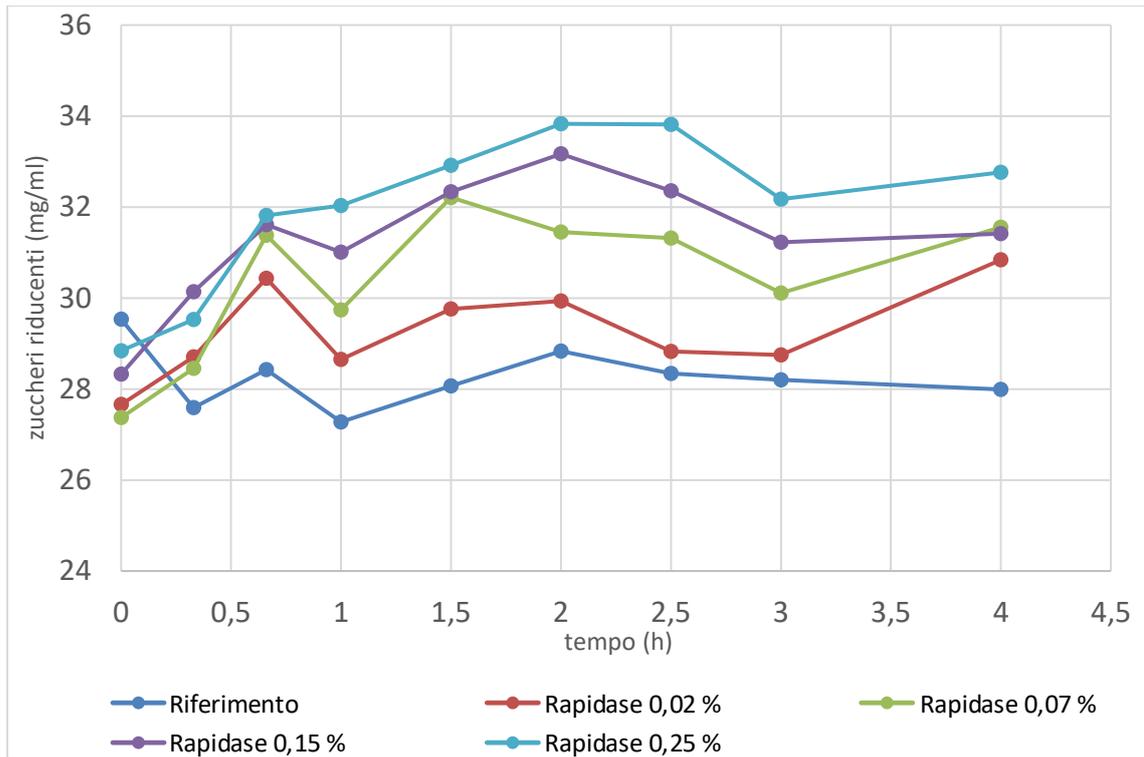


Figura 4.8 – Prove di bioliquefazione sulla matrice intera con Rapidase C80 Max, pH 3, concentrazione da 0,02 a 0,25% V/g solido secco

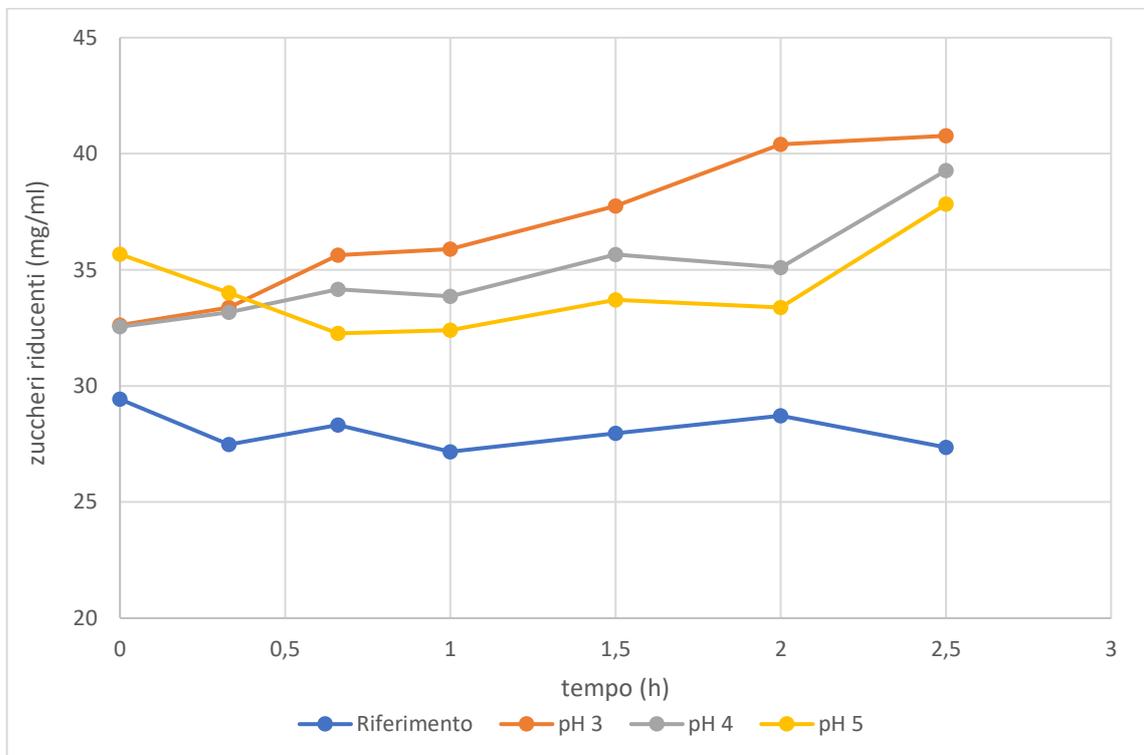


Figura 4.9 – Prove di bioliquefazione sulla matrice intera con Rapidase C80 Max, 0,25% V/g solido secco, pH da 3 a 5

Anche in questo caso l'andamento è crescente in modo proporzionale al tempo di reazione e alla concentrazione di enzima e non si osservano notevoli variazioni in base al pH. Come prima, il sistema arriva a saturazione dopo 2,5 ore e i risultati migliori si ottengono con la massima concentrazione di enzima (0,25% V/g solido secco), sebbene in termini assoluti la quantità di monomeri idrolizzati risulti più bassa rispetto al primo caso: a pH 3 dopo 2,5 ore con Rapidase C80 Max 0,25% V/g solido secco si ha il rilascio di 34 mg/ml di zuccheri riducenti, corrispondente ad un aumento del 21% rispetto al riferimento.

La soluzione viene poi portata a pH 5 per subire l'attacco con Cellulase da *Aspergillus niger* 0,1% V/g solido secco. In Figura 4.10 è riportato l'andamento della reazione condotta per 4 ore sui substrati provenienti dai precedenti attacchi con Rapidase C80 Max ai diversi pH.

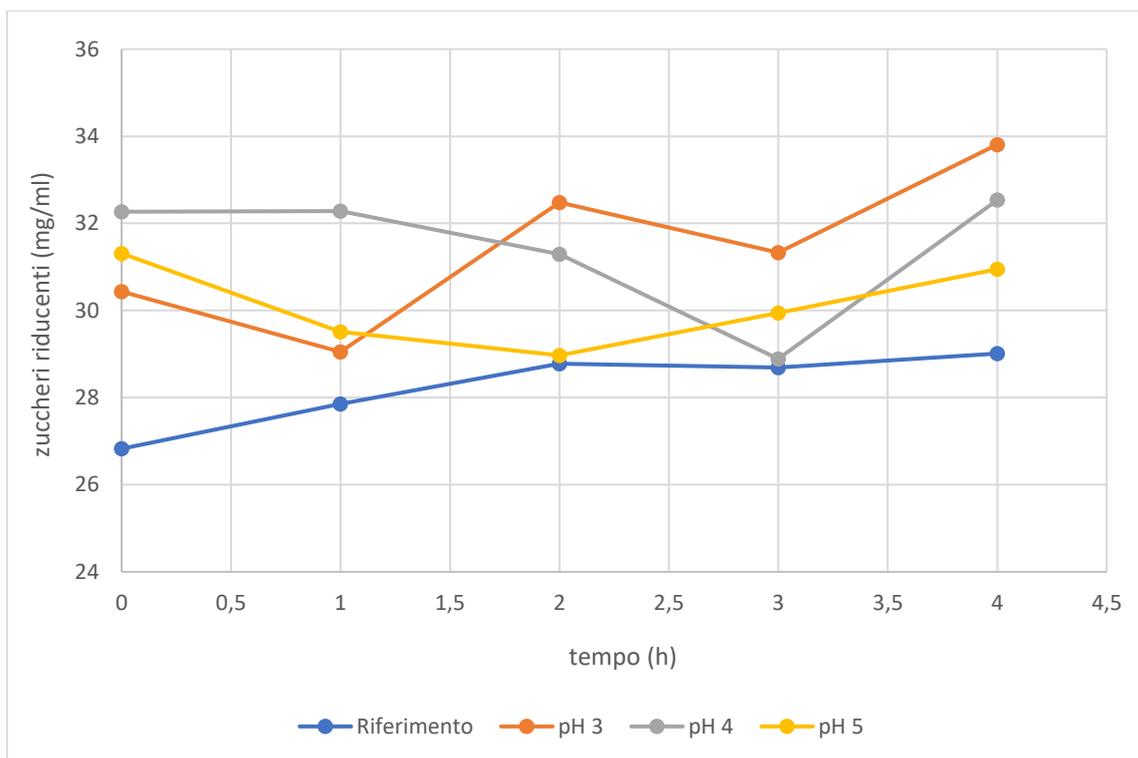


Figura 4.10 – Prove di bioliquefazione sulla matrice intera dopo pectinasi con Cellulase da *Aspergillus niger* 0,1% V/g solido secco

L'attacco con Cellulase da *Aspergillus niger* non porta ad un aumento del rilascio di zuccheri riducenti rispetto alla reazione con Rapidase C80 Max (concentrazione di zuccheri riducenti = 34 mg/mL), indice che la reazione enzimatica non è avvenuta.

Probabilmente l'attività dell'enzima risulta influenzata negativamente dai prodotti di reazione della cinetica precedente. A parità di concentrazione di enzima e di substrato, valutato come residuo solido, infatti la reazione condotta sulla matrice separata (primo caso) mostra un andamento crescente, evidentemente perché nell'ambiente di reazione non ci sono agenti che possano limitare l'attività della Cellulase da *Aspergillus niger*.

### 4.3 Caratterizzazione dei bioliquefatti

In Tabella 4.2 sono descritti i 13 bioliquefatti ottenuti da:

- attacco sul surnatante ai diversi pH;
- attacco sul residuo solido a pH 5;
- attacco sulla matrice non separata con pectinasi ai diversi pH e in seguito con cellulasi a pH 5;
- combinazione dei bioliquefatti ottenuti dall'idrolisi del surnatante e del solido ai diversi pH, in rapporto 1:1.

Tabella 4.2 – Descrizione dei 13 bioliquefatti

<b>Bioliquefatto num.</b>	<b>Matrice</b>	<b>pH</b>
1	Surnatante	3
2	Surnatante	4
3	Surnatante	5
4	Residuo solido	5
5	Combinazione surnatante: solido 1:1	3
6	Combinazione surnatante: solido 1:1	4
7	Combinazione surnatante: solido 1:1	5
8	Intera dopo reazione con Rapidase	3
9	Intera dopo reazione con Rapidase	4
10	Intera dopo reazione con Rapidase	5
11	Num. 8 dopo reazione con Cellulase	5
12	Num. 9 dopo reazione con Cellulase	5
13	Num. 10 dopo reazione con Cellulase	5

Viscosità, limpidezza e colore dei bioliquefatti sono indici del grado di destrutturazione della matrice. Un grado di idrolisi maggiore corrisponde a una viscosità minore: la soluzione risulta più fluida e limpida a causa della rottura delle catene polimeriche e dell'abbassamento del peso molecolare.

In Figura 4.11 è possibile osservare le differenze fisiche dei bioliquefatti ottenuti dall'attacco enzimatico delle varie matrici a pH 3.

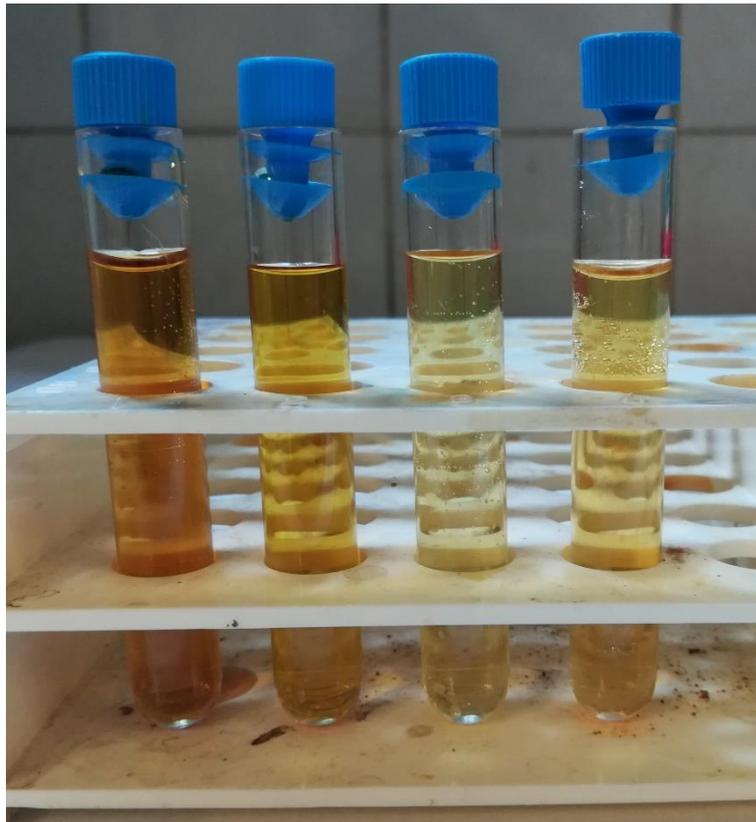


Figura 4.11 – Aspetto fisico dei bioliquefatti a pH 3 (da sinistra: intero, surnatante, solido, combinazione 1:1)

Tutte le soluzioni ottenute si presentano fluide e limpide. Il colore varia in base al pH: pH maggiori presentano un colore più scuro tendente al bruno che potrebbe influire negativamente sul colore della crema finale. Questo probabilmente è dovuto all'NaOH concentrato con cui si basifica la soluzione, che può causare la formazione di addotti molecolari tipo dioli a partire da zuccheri quali glucosio. A seguito della disgregazione della matrice vengono anche rilasciate quelle sostanze che sono legate chimicamente ad essa, in quantità crescenti con il grado di idrolisi. A questo scopo sui bioliquefatti sono stati eseguiti vari saggi colorimetrici per determinarne le proprietà in base al contenuto di:

- zuccheri riducenti;
- carboidrati totali;
- polifenoli totali;
- potere antiossidante.

I risultati ottenuti dall'analisi dei vari bioliquefatti sono riportati in Tabella 4.3 – 4.6 e nei grafici di Figura 4.12 – 4.31.

**Tabella 4.3 – Caratterizzazione bioliquefatti ottenuti dal surnatante**

<b>Concentrazione di sostanze attive</b>	<b>Bioliquefatto num. 1</b>	<b>Bioliquefatto num. 2</b>	<b>Bioliquefatto num. 3</b>
Zuccheri riducenti riferimento (mg glucosio/ml)	29,9 ±1,5	30,6±1,6	30,7 ±2,1
Zuccheri riducenti enzima (mg glucosio/ml)	39,9±2,3	38,6±2,2	38,7 ±3,1
Carboidrati totali riferimento (mg glucosio/ml)	36,29 ±3,86	36,72±4,42	35,34±4,03
Carboidrati totali enzima (mg glucosio/ml)	48,89±4,87	49,71±4,37	48,4±6,01
Polifenoli totali riferimento (mg catechina/L)	5947±444	5207±586	5717 ±443
Polifenoli totali enzima (mg catechina/L)	12432±414	12170±525	12118 ±561
Potere antiossidante riferimento (ORAC/L)	38370±1365	40697±998	22552 ±1502
Potere antiossidante enzima (ORAC/L)	43897±1420	41015±1220	32100 ±1337

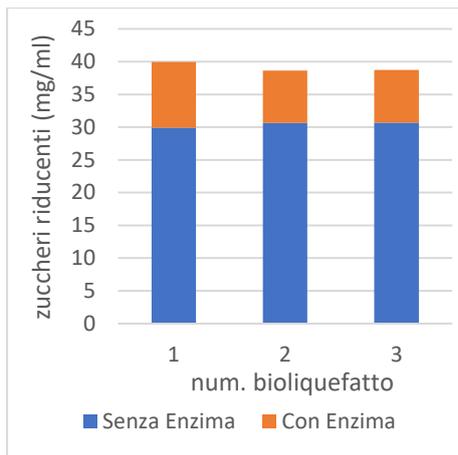


Figura 4.12 – Zuccheri riducenti sul surnatante

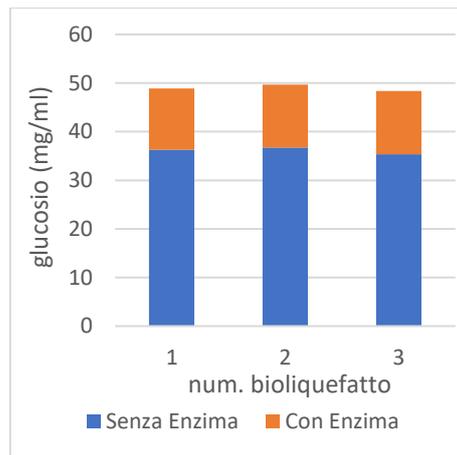


Figura 4.13 – Carboidrati totali sul surnatante

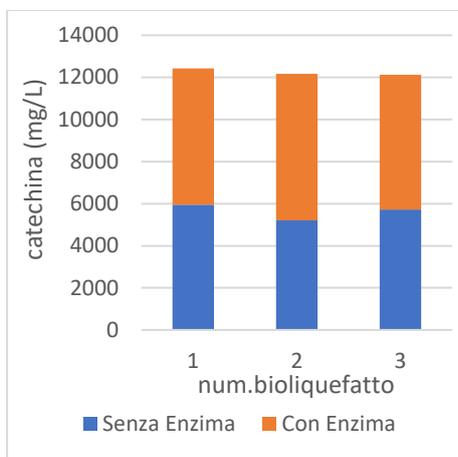


Figura 4.14 – Polifenoli totali sul surnatante

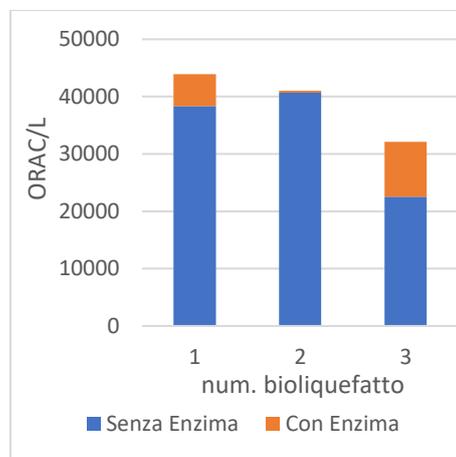


Figura 4.15 – Potere antiossidante sul surnatante

Dai grafici si nota che la reazione enzimatica porta ad un generale aumento del rilascio di sostanze bioattive e del potere antiossidante. L'attacco enzimatico a pH 3 mostra i risultati migliori soprattutto in termini di potere antiossidante.

**Tabella 4.4 – Caratterizzazione bioliquefatti ottenuti dall'idrolisi del residuo solido**

<b>Concentrazioni di sostanze attive</b>	<b>Bioliquefatto num. 4</b>
Zuccheri riducenti riferimento (mg glucosio/ml)	10,12 ±0,30
Zuccheri riducenti enzima (mg glucosio/ml)	16,52±0,58
Carboidrati totali riferimento (mg glucosio/ml)	19,32 ± 4,46
Carboidrati totali enzima (mg glucosio/ml)	23,74± 3,92
Polifenoli totali riferimento (mg catechina/L)	3614 ±105
Polifenoli totali enzima (mg catechina/L)	5805±187
Potere antiossidante riferimento (ORAC/L)	22835 ±849
Potere antiossidante enzima (ORAC/L)	30792±1542

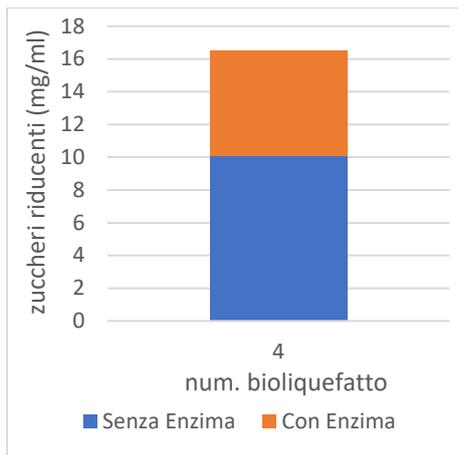


Figura 4.16 – Zuccheri riducenti sul residuo solido

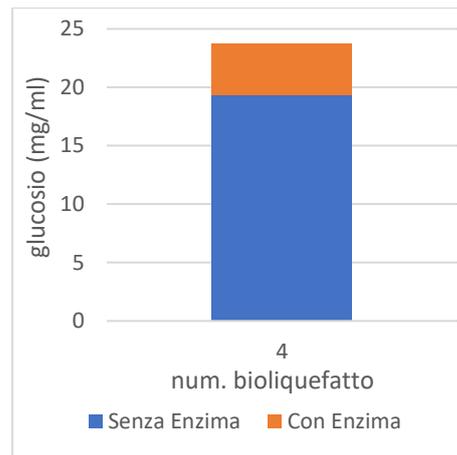


Figura 4.17 – Carboidrati totali sul residuo solido

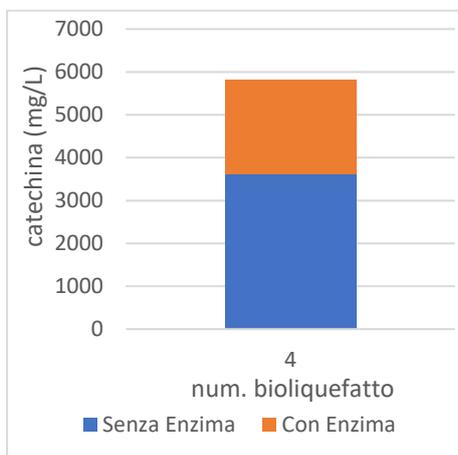


Figura 4.18 – Polifenoli totali sul residuo solido

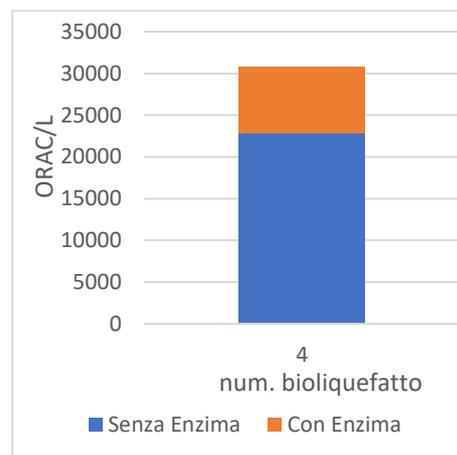


Figura 4.19 – Potere antiossidante sul residuo solido

I grafici mostrano un aumento della quantità di sostanze funzionali rilasciate e del potere antiossidante nel bio-liquefatto dopo la reazione enzimatica.

Tabella 4.5 – Caratterizzazione bioliquefatti ottenuti dalla combinazione surnatante: residuo solido 1:1

Concentrazione di sostanze attive	Bioliquefatto num. 5	Bioliquefatto num. 6	Bioliquefatto num. 7
Zuccheri riducenti enzima (mg glucosio/ml)	22,1	23,13	21,37
Carboidrati totali enzima (mg glucosio/ml)	36,1	38,7	36,8
Polifenoli totali enzima (mg catechina/L)	7740	6689	6743
Potere antiossidante enzima (ORAC/L)	40698	48668	47044

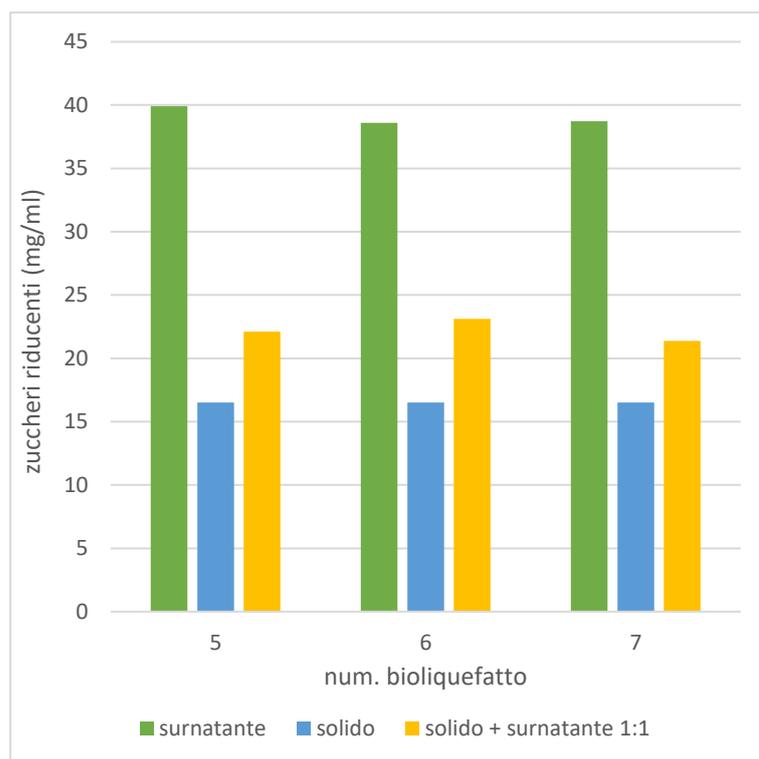


Figura 4.20 – Zuccheri riducenti sulla combinazione surnatante: residuo solido 1:1

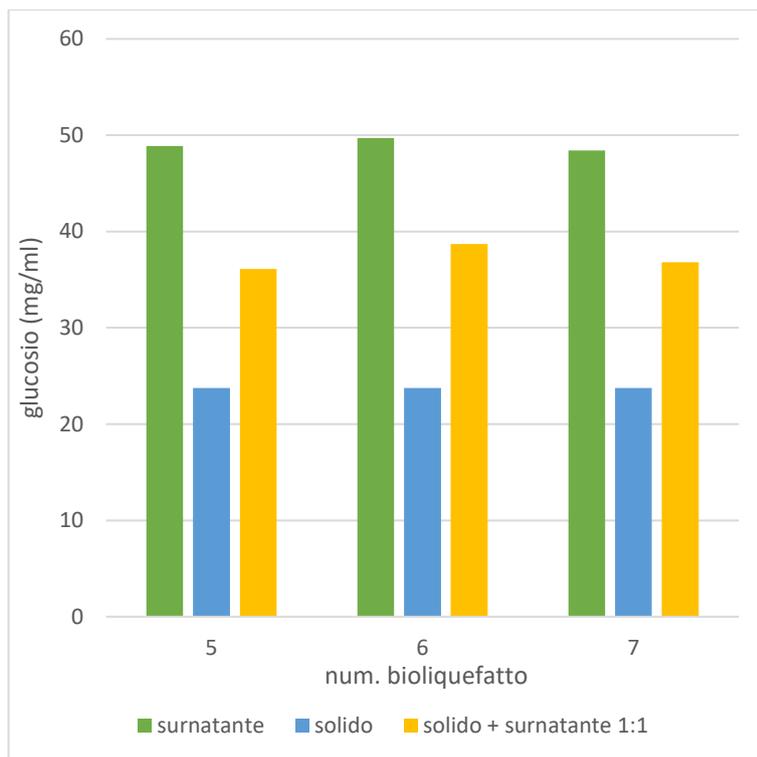


Figura 4.21 – Carboidrati totali sulla combinazione surnatante: residuo solido 1:1

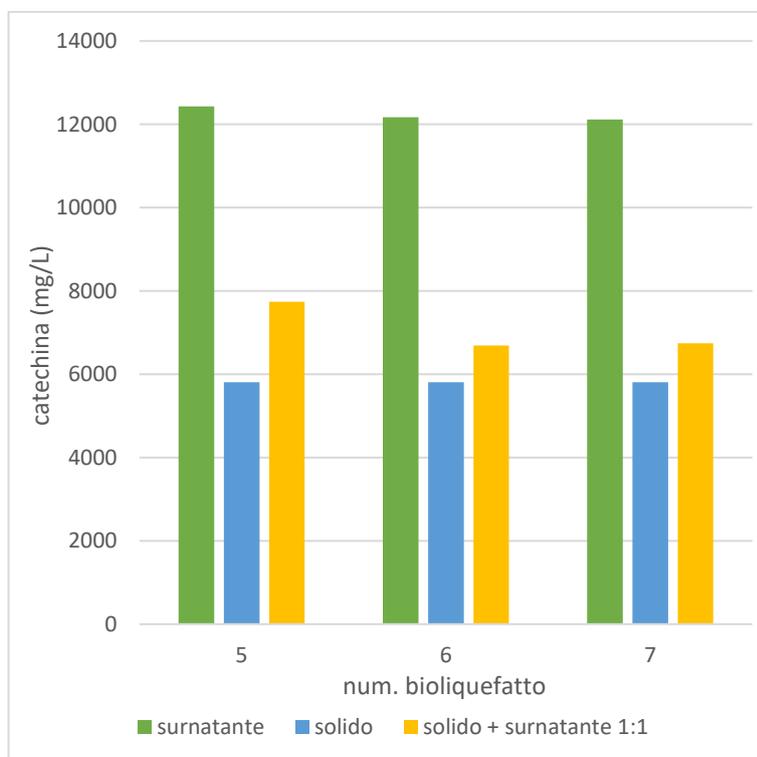


Figura 4.22 – Polifenoli totali sulla combinazione surnatante: residuo solido 1:1

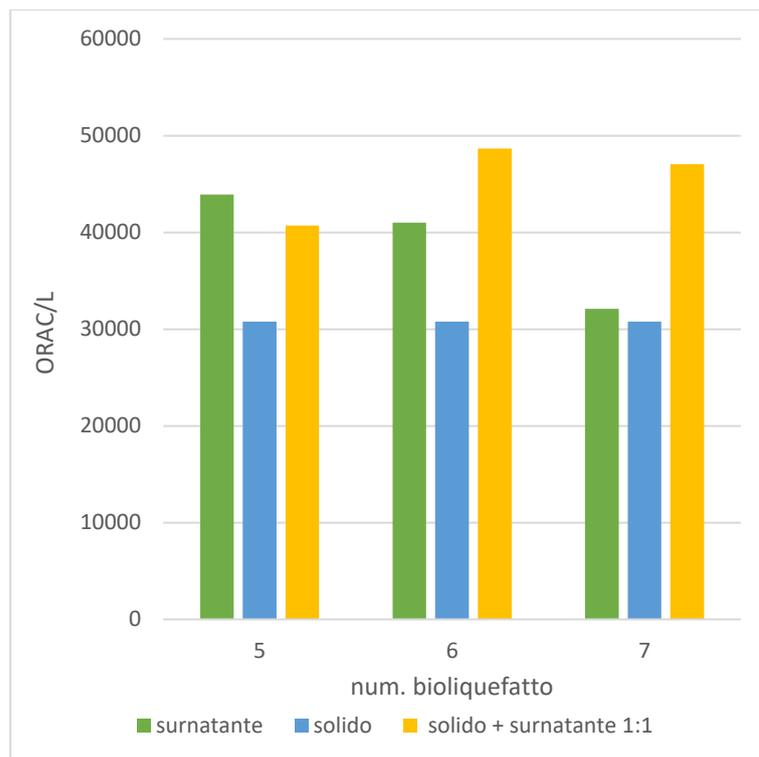


Figura 4.23 – Potere antiossidante sulla combinazione surnatante: residuo solido 1:1

I risultati delle analisi svolte sulla combinazione dei bioliquefatti del surnatante e del residuo solido in rapporto 1:1 sono confrontati con quelli ottenuti dall'analisi dei singoli bioliquefatti che li compongono. Il confronto è utile per capire se l'unione dei due bioliquefatti porta ad un aumento delle proprietà o viceversa.

Per quanto riguarda il rilascio di zuccheri riducenti, carboidrati totali e composti polifenolici, dai grafici si osserva che il bioliquefatto ottenuto dalla combinazione possiede valori intermedi tra quelli dei bioliquefatti singoli. Mentre per quanto riguarda il potere antiossidante si registra un notevole aumento a pH 4 e 5.

**Tabella 4.6 – Caratterizzazione bioliquefatti ottenuti sulla matrice intera**

<b>Concentrazione di sostanze attive</b>	<b>Bioliquefatto num. 8-11</b>	<b>Bioliquefatto num. 9-12</b>	<b>Bioliquefatto num. 10-13</b>
Zuccheri riducenti riferimento (mg glucosio/ml)	28,3 ±0,9	27,8±0,9	26,6 ±1,6
Zuccheri riducenti dopo Rapidase (mg glucosio/ml)	34±0,9	32,8±0,8	31,4 ±1,3
Zuccheri riducenti dopo Cellulase (mg glucosio/ml)	33,8±0,9	32,4±1,6	30,8±1,1
Carboidrati totali riferimento (mg glucosio/ml)	33,7 ±4,6	35,4±4,3	34,8 ±4,1
Carboidrati totali dopo Rapidase (mg glucosio/ml)	39,5±4,4	40,5±4,2	40,3 ±4,3
Carboidrati totali dopo Cellulase (mg glucosio/ml)	41,5±4,2	43,3±4,1	43±4,4
Polifenoli totali riferimento (mg catechina/L)	5808±357	6119±312	5325 ±249
Polifenoli totali dopo Rapidase (mg catechina/L)	10625±647	9526±544	9845 ±488
Polifenoli totali dopo Cellulase (mg catechina/L)	10538±557	9741±377	9909±434
Potere antiossidante riferimento (ORAC/L)	35905±1107	41497±1334	44070 ±984
Potere antiossidante dopo Rapidase (ORAC/L)	40145±1674	44622±1220	47320 ±1482
Potere antiossidante dopo Cellulase (ORAC/L)	50360±1591	46437±1470	48947±1232

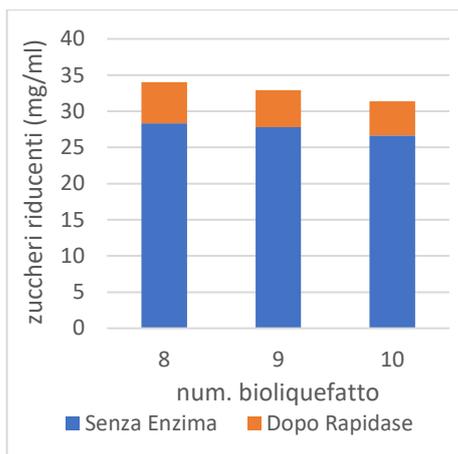


Figura 4.24 – Zuccheri riducenti su matrice intera dopo Rapidase

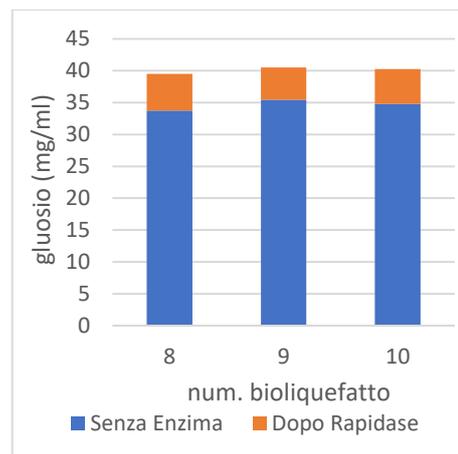


Figura 4.25 – Carboidrati totali su matrice intera dopo Rapidase

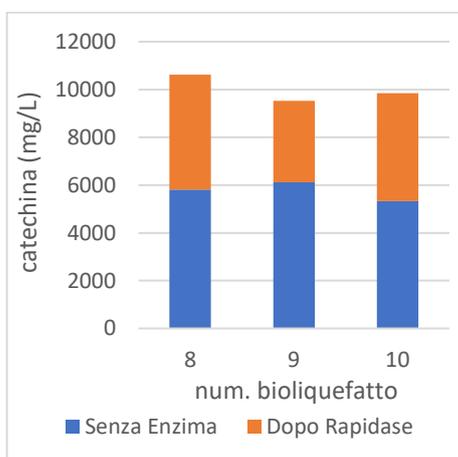


Figura 4.26 – Polifenoli totali su matrice intera dopo Rapidase

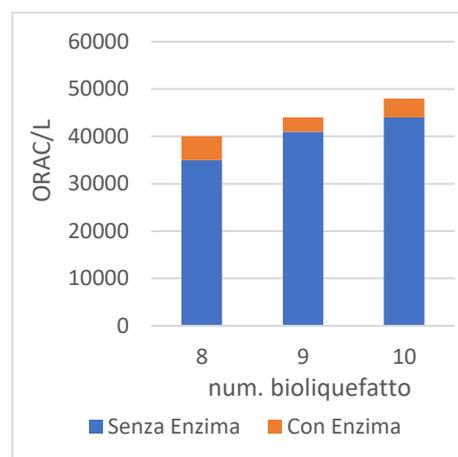


Figura 4.27 – Potere antiossidante su matrice intera dopo Rapidase

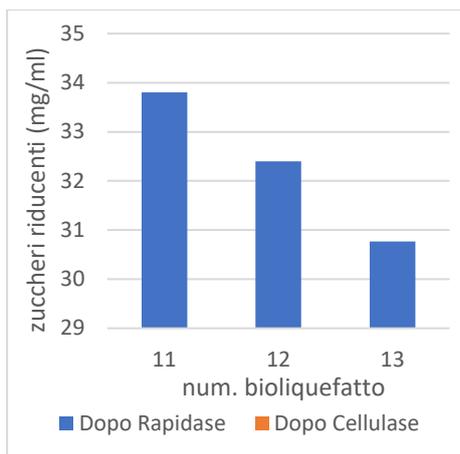


Figura 4.28 – Zuccheri riducenti su matrice intera dopo Cellulase

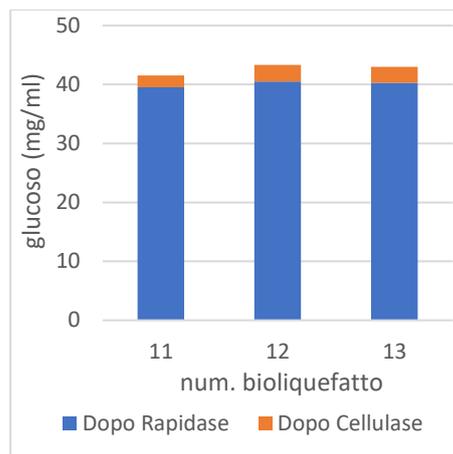


Figura 4.29 – Carboidrati totali su matrice intera dopo Cellulase

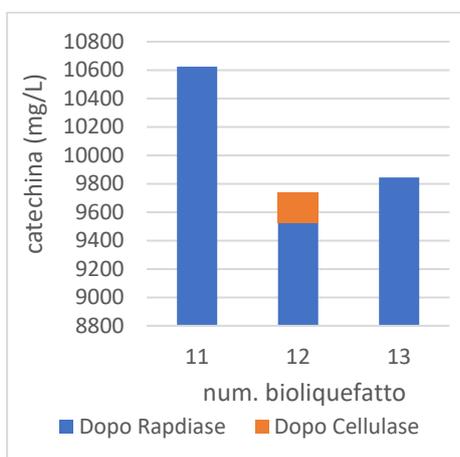


Figura 4.30 – Polifenoli totali su matrice intera dopo Cellulase

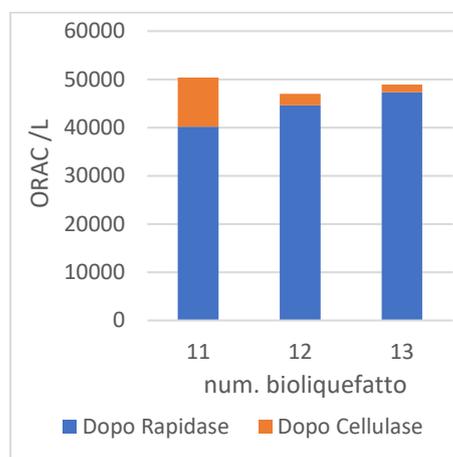


Figura 4.31 – Potere antiossidante su matrice intera dopo Cellulase

Per quanto riguarda l'attacco enzimatico sulla matrice intera, dopo l'idrolisi con Rapidase C80 Max si osserva un aumento di tutte le proprietà. L'attacco con Cellulase da *Aspergillus niger* invece non comporta variazioni significative rispetto ai dati ottenuti dopo l'idrolisi delle catene pectiche, tranne un aumento del potere antiossidante a pH 3.

#### 4.4 Funzionalizzazione dell'emulsione cosmetica

La caratterizzazione ha permesso di selezionare tre bioliquefatti da utilizzare come ingredienti per funzionalizzare tre prototipi di emulsione cosmetica: uno ottenuto dall'idrolisi sulla matrice intera a pH 3, gli altri due ottenuti dalla combinazione dei bioliquefatti del surnatante e del solido in rapporto 1:1 a pH 4 e 5.

Il criterio di scelta dei bioliquefatti è basato soprattutto sul rilascio di sostanze ad azione antiossidante. L'azione antiossidante di alcuni composti, soprattutto i polifenoli, mira a contrastare o inibire la formazione dei radicali liberi, composti reattivi dell'ossigeno, che si generano durante il normale metabolismo cellulare.

Nella formulazione cosmetica, la scelta dei componenti della fase oleosa è stata fatta rispettando il principio della "cascata dei grassi": i componenti lipidici sono stati inseriti in quantità diverse a seconda della densità, in modo che la crema si riesca ad applicare in modo uniforme sulla pelle.

Gli oli inseriti sono ricchi di acidi grassi polinsaturi, vitamine (soprattutto vitamine del gruppo B e E), proteine e sali minerali. Queste caratteristiche li rendono molto idratanti ed emollienti e dotati di un potere antiossidante elevato, proprietà utili per la prevenzione e l'attenuazione degli inestetismi della pelle (rughe, smagliature, cicatrici, macchie solari). L'aggiunta del 2% in peso del bioliquefatto porta ad un aumento di queste proprietà grazie all'elevato contenuto di sostanze bioattive.

L'emulsione cosmetica funzionalizzata è stata caratterizzata in termini di potere antiossidante e viscosità. La viscosità è indice di stabilità della crema: più è alta, più l'emulsione può mantenersi stabile nel tempo e costante nel tempo.

Una prima analisi di stabilità delle emulsioni realizzate è stata fatta sottoponendole a trattamento termico in stufa a 80°C per 48 ore, per accelerare il manifestarsi di possibili fenomeni di instabilità, quali separazioni di fase <sup>21</sup>.

I risultati ottenuti dai tre prototipi sono riportati in Tabella 4.7 e 4.8.

Tabella 4.7 – Potere antiossidante creme

Prototipo crema	Potere antiossidante (ORAC/g crema)
Solo crema	2,96
Crema + bioliquefatto num. 6	6,2
Crema + bioliquefatto num. 7	6,79
Crema + bioliquefatto num. 11	5,61

Tabella 4.8 – Viscosità creme

Prototipo crema	Viscosità (mPas)
Solo crema	1500
Crema + bioliquefatto num. 6	1360
Crema + bioliquefatto num. 7	1420
Crema + bioliquefatto num. 11	1420



Figura 4.32 – Viscosimetro Brookfield

Le due combinazioni a pH 4 e 5 mostrano il maggiore aumento del potere antiossidante e la minor riduzione di viscosità.

In Figura 4.33 si possono osservare i campioni di crema dopo trattamento termico a 80°C per 48 ore.

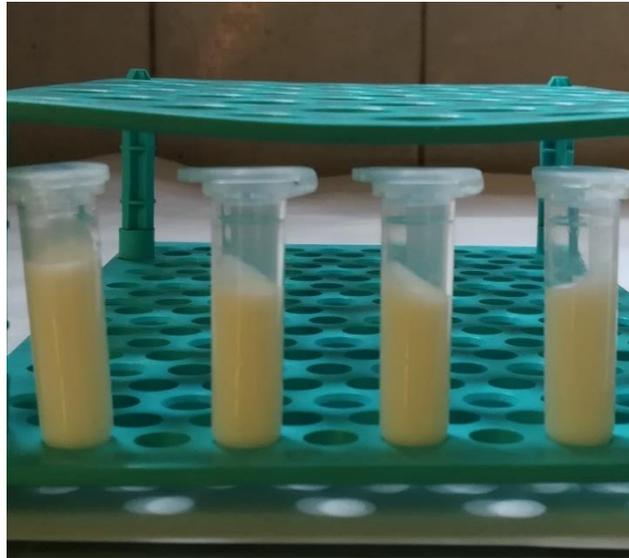


Figura 4.33 – Variazioni di colore dopo trattamento termico delle creme (da sinistra: crema base, crema + bioliquefatto num. 6, crema + bioliquefatto num. 7, crema + bioliquefatto num. 11)

Dopo trattamento termico si nota un leggero ingiallimento del colore delle creme dovuto alla normale degradazione dei componenti vegetali. La crema contenente il bioliquefatto della matrice intera subisce un ingiallimento maggiore. Tuttavia, dopo centrifugazione non si verificano separazioni dei vari componenti per cui le emulsioni si possono considerare stabili.

Il bioliquefatto num. 7, ottenuto dalla combinazione dei bioliquefatti del surnatante e del solido a pH 5, è stato selezionato come il più adatto, perché in grado di conferire all'emulsione un alto potere antiossidante e allo stesso tempo minore diminuzione della viscosità e minore variazione delle caratteristiche fisiche dopo trattamento termico del prodotto finito.

Il processo di bioraffineria più efficiente prevede, quindi, la separazione della matrice in surnatante e residuo solido dopo il trattamento termico. I due attacchi enzimatici vengono condotti separatamente con Rapidase C80 Max 0,25% V/g solido secco sul

surnatante e con Cellulase da *Aspergillus niger* 0,1% V/g solido secco sul solido, entrambi a pH 5. Infine, i bioliquefatti ottenuti vengono ricombinati in rapporto 1:1.

## 5 CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi è stato proposto uno studio su due tecniche di bioraffineria per la valorizzazione di scarti di *Punica granatum* (melograno). In particolare, l'oggetto dello studio è il mesocarpo (parte non edibile del frutto) ricco di sostanze bioattive molto interessanti dal punto di vista delle proprietà benefiche per la salute: principalmente composti polifenolici con elevata azione antiossidante.

La valorizzazione mira a produrre, tramite un processo biotecnologico e a basso impatto ambientale, un ingrediente ad alto valore aggiunto per funzionalizzare un'emulsione cosmetica.

Mediante la tecnica della bioliquefazione molecolare è stato possibile, grazie all'azione di determinati enzimi, disgregare le strutture polisaccaridiche che compongono la parete cellulare vegetale e rendere biodisponibili i fitocomposti.

La parete cellulare del mesocarpo è composta principalmente da pectine, nella parte più esterna, e cellulosa ed emicellulose, nella parte più interna. Sono stati utilizzati due preparati enzimatici: Rapidase C80 Max con azione pectinasi e Cellulase da *Aspergillus niger* con azione cellulasi.

Le due tecniche di valorizzazione si differenziano per un diverso approccio nella reazione enzimatica:

- il primo prevede di separare la matrice in surnatante e solido residuo e di condurre l'idrolisi separatamente sui due substrati: il surnatante, composto da pectine idrosolubili, subisce attacco enzimatico con Rapidase C80 Max mentre il solido, composto principalmente da cellulosa ed emicellulose, subisce attacco enzimatico con Cellulase da *Aspergillus niger*;
- il secondo prevede di mantenere la matrice intatta e di eseguire i due attacchi in modo sequenziale sulla stessa.

La caratterizzazione dei bioliquefatti stessi e in seguito delle creme funzionalizzate ha permesso di individuare il processo di bioraffineria migliore, cioè quello che porta alla formazione di un'emulsione cosmetica ricca in proprietà antiossidanti.

I risultati ottenuti mostrano che la Rapidase C80 Max ha un'elevata attività pectinasi che permette il rilascio di notevoli quantità di zuccheri riducenti, carboidrati totali e polifenoli. L'attività enzimatica aumenta in modo proporzionale all'aumentare della concentrazione di enzima e non subisce notevoli variazioni in base al pH.

A parità di pH, dall'idrolisi del surnatante si ottiene un bioliquefatto con un più alto potere antiossidante rispetto a quello ottenuto dalla matrice intera. Per entrambi gli approcci i risultati migliori sono stati ottenuti eseguendo la reazione enzimatica a pH 3.

L'attacco enzimatico di Cellulase da *Aspergillus niger* sul solido residuo porta a risultati soddisfacenti in termini di rilascio di zuccheri riducenti, carboidrati totali e polifenoli e aumento del potere antiossidante. Per quanto riguarda la reazione condotta dallo stesso enzima sulla stessa matrice intera, invece, non si registra un miglioramento rispetto ai risultati ottenuti dopo l'idrolisi con la Rapidase C80 Max.

I bioliquefatti ottenuti dall'idrolisi del surnatante e del residuo solido sono stati combinati in rapporto 1:1. Il bioliquefatto così composto è stato caratterizzato: il valore di zuccheri riducenti, carboidrati totali e composti polifenolici risultante è intermedio tra quelli dei due bioliquefatti che lo compongono, il potere antiossidante, invece, risulta essere comparabile (a pH 3) o nettamente superiore (a pH 4 e 5).

Alla luce di questi risultati, il bioliquefatto ottenuto dall'attacco enzimatico sulla matrice intera a pH 3 e i bioliquefatti combinati a pH 4 e 5 risultano essere comparabili dal punto di vista delle proprietà antiossidanti. Si è scelto di utilizzare tutti e tre i bioliquefatti per funzionalizzare tre prototipi di crema.

Le creme sono state, a loro volta, caratterizzate in base all'aspetto fisico, alla viscosità e all'azione antiossidante. La crema funzionalizzata con il bioliquefatto combinato a pH 5 è risultata essere la migliore in quanto presenta un'elevata stabilità, determinata dopo stress termico e dalla misura della viscosità, e un alto potere antiossidante.

Si può concludere che il processo di bioraffineria più efficiente prevede la separazione della matrice, la gestione dei due attacchi enzimatici separati a pH 5 e la combinazione dei bioliquefatti ottenuti.

Per completare lo studio si consiglia l'analisi qualitativa e quantitativa, con cromatografia liquida (HPLC), del bioliquefatto scelto per verificare la presenza di composti polifenolici specifici con proprietà antiossidanti, antimicrobiche, antibatteriche e antitumorali quali antocianidine, gallotannini, ellagitannini e acidi fenolici.

I composti polifenolici più interessanti dal punto di vista delle proprietà benefiche sulla salute sono l'acido gallico, l'acido ellagico e la punicalagina. Si tratta di tannini idrolizzabili che contengono gruppi idrossili in grado di donare atomi di idrogeno ai radicali liberi e inibire le reazioni ossidative del metabolismo che portano all'invecchiamento cellulare. Una crema contenente queste molecole possiede elevate proprietà antiossidanti che permettono di proteggere la pelle dall'invecchiamento cutaneo e di prevenire e attenuare la comparsa di inestetismi (rughe, macchie, smagliature).

Infine, sarebbe interessante provare a combinare i bioliquefatti con altri rapporti surnatante/solido (1:2, 1:4, 1:6) per cercare di ottenere un ulteriore incremento del potere antiossidante.

## Bibliografia

1. Cherubini F, Strømman AH. Life cycle assessment of bioenergy systems: State of the art and future challenges. *Bioresour Technol.* 2011;102(2):437-451.  
doi:10.1016/j.biortech.2010.08.010
2. Bonechi C, Consumi M, Donati A, et al. *Biomass: An Overview.* Elsevier Ltd.; 2017.  
doi:10.1016/B978-0-08-101031-0.00001-6
3. Vorwerk S, Somerville S, Somerville C. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci.* 2004;9(4):203-209.  
doi:10.1016/j.tplants.2004.02.005
4. van Laar H, Tamminga S, Williams BA, Verstegen MW. Fermentation of the endosperm cell walls of monocotyledon and dicotyledon plant species by faecal microbes from pigs. *Anim Feed Sci Technol.* 2000;88(1-2):13-30.  
doi:10.1016/S0377-8401(00)00210-8
5. Abedi D, Zhang L, Pyne M, Perry Chou C. *Enzyme Biocatalysis.* Vol 1.; 2011.  
doi:10.1016/B978-0-08-088504-9.00111-2
6. Choi J-M, Han S-S, Kim H-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnol Adv.* 2015;33(7):1443-1454.  
doi:10.1016/j.biotechadv.2015.02.014
7. Zanichelli D, Filippini A. ENZYMES Enzyme biocatalysis to boost bioavailability and efficacy of natural active ingredients. 2018;13(June):2018.
8. Akhtar S, Ismail T, Fraternali D, Sestili P. Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. *Food Chem.* 2015;174:417-425.  
doi:10.1016/j.foodchem.2014.11.035
9. Gumienna M, Szwengiel A, Górna B. Bioactive components of pomegranate fruit and their transformation by fermentation processes. *Eur Food Res Technol.* 2016;242(5):631-640. doi:10.1007/s00217-015-2582-z
10. Johanningsmeier SD, Harris GK. Pomegranate as a Functional Food and

- Nutraceutical Source. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2012;2(1):181-201.  
doi:10.1146/annurev-food-030810-153709
11. Talekar S, Patti AF, Vijayraghavan R, Arora A. An integrated green biorefinery approach towards simultaneous recovery of pectin and polyphenols coupled with bioethanol production from waste pomegranate peels. *Bioresour Technol*. 2018;266(April):322-334. doi:10.1016/j.biortech.2018.06.072
  12. Pathak PD, Mandavgane SA, Kulkarni BD. Valorization of Pomegranate Peels: A Biorefinery Approach. *Waste and Biomass Valorization*. 2017;8(4):1127-1137. doi:10.1007/s12649-016-9668-0
  13. Brar SK, Dhillon GS, Soccol CR. Preface. *Biotransformation Waste Biomass into High Value Biochem*. 2013;9781461480:v-vii. doi:10.1007/978-1-4614-8005-1
  14. Bailey MJ, Biely P, Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J Biotechnol*. 1992;23(3):257-270. doi:10.1016/0168-1656(92)90074-J
  15. Chaplin MF, J.F. K. Colorimetric assay. In: *Carbohydrate Analysis*. ; 1986.
  16. Folin, O. & Ciocalteu V. Tyrosine and Tryptophane in Proteins. *J Biol Chem*. 1927;(73):627–650.
  17. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Respostas Perceptivas E. *LWT - Food Sci Technol*. 1995;28(1):25-30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5
  18. Phyo P, Gu Y, Hong M. Impact of acidic pH on plant cell wall polysaccharide structure and dynamics: insights into the mechanism of acid growth in plants from solid-state NMR. *Cellulose*. 2019;26(1):291-304. doi:10.1007/s10570-018-2094-7
  19. Streyer L. Introduction to enzymes. *Biochem New York WH Free*. 2008.  
<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Introduction+to+Enzymes#4>.
  20. Kiss K, Cserjési P, Nemestóthy N, Gubicza L, Bélafi-Bakó K. Kinetic Study on Hydrolysis of Various Pectins By *Aspergillus Niger* Polygalacturonase. *Hungarian J*

*Ind Chem Veszprém.* 2008;36(12):55-58.

21. André V, Willenbacher N, Debus H. Prediction of emulsion stability: facts and myth. *Cosmet Toilet Manuf Worldw.* 2003:1-7.

<http://www.mvm.kit.edu/download/AME-No-Wi-reviewed-21.pdf>.