
SCUOLA DI SCIENZE

Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Corso di Laurea Magistrale in

Chimica Industriale

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologia della Chimica Industriale

Valorizzazione dell’*A. Nodosum* tramite
tecniche di bioliquefazione: studio e
caratterizzazione

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO

Elena Diolaiti

RELATORE

Dott. Leonardo Setti

CORRELATORE

Dott. Fabio Scardovi

Sessione II

Anno Accademico 2012-2013

Sommario

1	INTRODUZIONE.....	1
1.1	Materie prime derivanti da fonti rinnovabili per l'industria chimica di sintesi .	1
1.1.1	bioraffineria: l'alternativa alla petrolchimica	4
1.1.2	biotecnologia marina: alghe come fonte rinnovabile	5
1.1.3	La bioliquefazione molecolare	9
1.2	la cellula algale	10
1.2.1	costituenti polisaccaridici	12
1.2.2	costituenti non polisaccaridici	15
1.3	Ascophyllum Nodosum	17
1.4	Biocatalizzatori industriali per l'idrolisi di matrici vegetali	20
1.4.1	Pectinasi.....	21
1.4.2	Alginato liasi	22
2	SCOPO.....	24
3	MATERIALI E METODI.....	25
3.1	Determinazione rapporto ottimale matrice vegetale:acqua di reazione	25
3.2	profili di temperatura delle miscele acqua:glicerolo.....	25
3.3	trattamento termico ed enzimatico della matrice vegetale.....	26
3.4	trattamenti termici della matrice vegetale per lo studio del rilascio del colore	26
3.5	Enzimi idrolitici per la disgregazione della matrice vegetale.....	27
3.6	Determinazione degli zuccheri riducenti (Metodo dell'ADNS).....	28
3.7	Determinazione delle proteine totali (Metodo Bradford)	29
3.8	Determinazione dei polifenoli totali (Metodo di Folin-Ciocalteu)	30
3.9	Determinazione del potere antiossidante totale	32
3.10	Determinazione dei carboidrati totali (Metodo fenolo/solforico).....	32
3.11	Determinazione dell'attività alginasica di preparati enzimatici.....	33
3.12	Materiali e strumentazione utilizzati.....	34

4	RISULTATI E DISCUSSIONI.....	35
4.1	Determinazione del rapporto ottimale tra la matrice vegetale e il volume di acqua di reazione	35
4.2	Miscele acqua:glicerolo: effetto della temperatura.....	36
4.3	Miscele acqua:glicerolo: effetto della temperatura in presenza di alga.....	37
4.4	Prove di estrazione e determinazione di alcune componenti chimiche relative al campione di <i>Ascophyllum Nodosum</i> a diversi profili di temperatura	40
4.4.1	determinazione del contenuto di zuccheri riducenti e di carboidrati totali.....	40
4.4.2	determinazione dei Polifenoli totali.....	43
4.4.3	determinazione del Potere AntiOssidante totale.....	45
4.4.4	determinazione delle proteine totali	48
4.5	studio di differenti trattamenti termici: effetto del gradiente di temperatura sul rilascio del colore.....	49
4.5.1	trattamento termico con gradiente di temperatura.....	50
4.5.2	trattamento termico a temperatura costante: cottura dell'alga.....	54
4.6	Studio dell'influenza di differenti trattamenti enzimatici nella determinazione delle componenti chimiche dell' <i>ascophyllum nodosum</i> trattato termicamente	56
4.6.1	determinazione dell'attività alginasica di enzimi commerciali e percolati	56
4.6.2	determinazione del contenuto di zuccheri riducenti	57
4.6.3	determinazione dei carboidrati totali	58
4.6.4	determinazione dei Polifenoli totali.....	59
4.6.5	determinazione del Potere AntiOssidante totale.....	60
4.6.6	determinazione delle proteine totali	61
4.7	studio dell'attività alginasica di diversi enzimi in prospettiva di un futuro sviluppo industriale.....	62
5	BIBLIOGRAFIA.....	65

1 INTRODUZIONE

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

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

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

Le fonti rinnovabili, oltre ad avere un ruolo innovativo per quanto riguarda la produzione di *chemicals*, stanno sempre più acquisendo un ruolo essenziale nel campo dei servizi, in particolare quelli correlati alla produzione di energia.

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

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

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

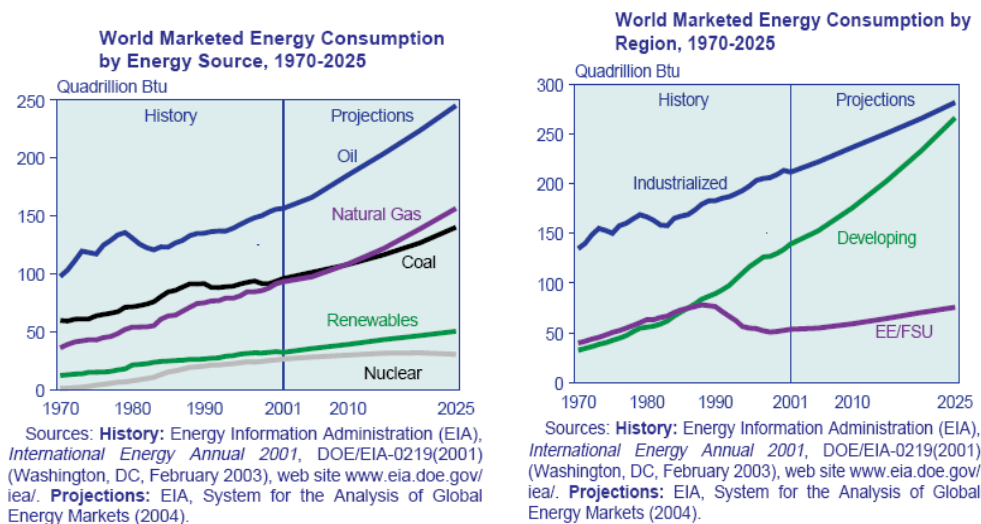


Figura 1-1: consumo energetico mondiale (1970-2025) e consumo energetico per tipo di combustibile

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

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

Oltre al settore energetico anche il settore chimico deve fare i conti con questi problemi dovuti all'esaurimento delle fonti fossili. Il petrolio risulta infatti essere uno dei piedistalli più importanti dell'industria chimica che, tramite la raffinazione del grezzo e la trasformazione dei *chemicals* ricavati è in grado di generare le *specialities* ad alto valore aggiunto che costituiscono la porzione più grande del mercato dei prodotti chimici di largo consumo.

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

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

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

Questo problema ha spinto ed incoraggia continuamente i governi ad investire sempre di più in energie rinnovabili (eolica, solare, geotermica...), in tecnologie alternative, e nelle ricerca di nuovi combustibili. Il binomio ricerca-sviluppo, la forte spinta industriale ed una crescente sensibilità pubblica e politica hanno già consentito di realizzare straordinari progressi.

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

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

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

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

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

Attualmente oltre l'80% delle emissioni provocate dall'uomo sono causate dall'uso di combustibili fossili; l'attività dell'uomo apporta circa 7 miliardi di ton/anno di CO₂ che si stima diventeranno di circa 12 miliardi di ton/anno nel 2021. ^[1]

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

- vettori energetici, come ad esempio i biocombustibili;

- materie prime per la chimica industriale del dopo petrolio.

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

1.1.1 bioraffineria: l'alternativa alla petrolchimica ^[2]

La transizione verso un'Europa rinnovabile deve essere accompagnata da un inevitabile passaggio della chimica industriale dal petrolio, come materia prima, alle biomasse. Attraverso processi di bioraffinazione le biomasse, trattasi di scarti del settore agroalimentare o vegetali naturalmente presenti sul pianeta, vengono trasformate in combustibili, energia e prodotti chimici.

Nell'ambito della transizione energetica in corso l'economia futura dovrà essere basata sull'utilizzo di fonti rinnovabili quindi sul modello di "bioraffineria": con questo termine s'intende una piattaforma scientifica e tecnica grazie alla quale le materie prime rinnovabili (le cosiddette biomasse) vengono trasformate in combustibili, energia e prodotti chimici, attraverso tecnologie che producono minimi scarti e hanno limitate ricadute sull'ambiente.

Le biomasse così come il petrolio hanno una composizione chimica complessa, che richiede un'ideale separazione in più gruppi di sostanze. La petrolchimica si basa sul principio di generare prodotti chimici semplici da maneggiare e ben definiti permettendo così la successiva costruzione di famiglie di prodotti e di linee efficienti di produzione volte all'ottenimento di prodotti di base, di intermedi o di derivati a sempre più elevato grado di complessità.

La ricerca nel campo delle biomasse sta puntando l'attenzione su metodi di sfruttamento che permettano l'uso di fonti rinnovabili - come amidi, materiale ligno-cellulosico, lipidi e proteine - al posto di materie prime derivanti dalla petrolchimica. Gli amidi per esempio sono prodotti principalmente da mais, grano, patate, tapioca e riso. Se ne producono 48,5 milioni di tonnellate/anno, di cui 8,5 in Europa. Il loro utilizzo per rifornire una bioraffineria si scontra tuttavia con il loro impiego primario nel settore alimentare.

Lo sfruttamento di biomasse in bioraffinerie su scala industriale è sempre stato ostacolato da una serie di fattori logistici e tecnologici: la sostenibilità economica dei

processo di recupero delle derivati chimici citati, la stagionalità delle produzioni agroalimentari, che rende difficile integrare i suoi sottoprodotti in un processo di bioraffinazione, e il fatto che i rifiuti agroalimentari hanno spesso una rilevante componente liquida.

Al fine di massimizzare il processo di valorizzazione di queste biomasse, ottenendo da un lato un corretto trattamento che abbatta il loro impatto ambientale, dall'altro un ritorno economico che renda sostenibili se non appetibili tali trattamenti, è necessario un approccio razionale, basato su trattamenti sequenziali che consentano la valorizzazione delle diverse componenti della matrice vegetale.

1.1.2 biotecnologia marina: alghe come fonte rinnovabile ^[3]

Sebbene la tendenza sia quella di rifornire i sistemi di bioraffinazione con colture dedicate (*whole crop biorefinery*), il ricorso a tali colture è stato messo in stretta correlazione con la perdita di biodiversità e l'utilizzo a fini energetici di colture alimentari (biocombustibili di prima generazione) è stato bollato come "crimine contro l'umanità" da parte della Nazioni Unite durante la sessione speciale dedicata al diritto all'alimentazione.

In questo contesto s'inserisce la matrice algale che costituisce una grande risorsa per la sua eterogenea composizione e ricchezza di principi attivi: per essa inoltre non è necessario istituire delle colture dedicate con le conseguenze sopra citate, ma queste piante crescono spontaneamente nei fondali marini, per cui la loro coltura non occupa terreni che altrimenti sarebbero potuti essere destinati a scopi alimentari.

Le alghe usano l'energia della luce e il diossido di carbonio con un'efficienza fotosintetica molto più alta delle piante per la produzione di biomassa e petrolio. Infatti, la produzione di petrolio da alghe può essere 10-100 volte più alta di quella da piante terrestri. Per questo sono state suggerite come sorgente di produzione di biocombustibile col vantaggio del non essere in competizione con la produzione di cibo.

Le fonti marine hanno inoltre un enorme potenziale che può essere utilizzato come approvvigionamento sostenibile di cibo, composti energetici per l'industria alimentare e farmaceutica con importanti benefici per la salute umana. La figura 1-2 offre una visione sulle differenti possibilità che sono state identificate al fine di incrementare la

produzione di preziose componenti algali: la biotecnologia marina passa anche attraverso l'ingegneria genetica, con un'ottimizzazione tale da suscitare sempre nuovo interesse.

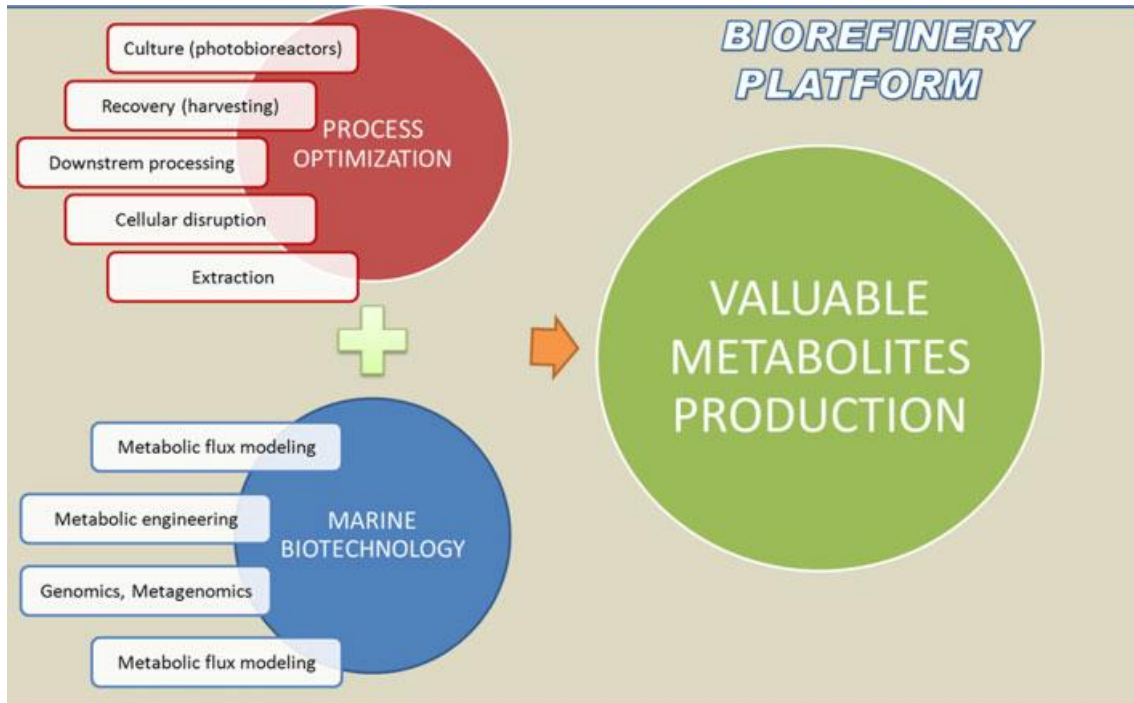


Figura 1-2: possibilità di incrementare la produzione di metaboliti dalle alghe

L'integrazione di un processo di produzione di metaboliti secondari dentro la piattaforma della bioraffineria rimane una via sostenibile di produzione di energia, alimenti e possibili *chemicals*.

Le statistiche mostrano che, mentre attualmente il mercato globale dei prodotti marini e biotecnologici in Europa è di circa 2,8 miliardi di euro (2010), si prevede un tasso di crescita annuale del 4-12% (a seconda delle stime) che mostra il potenziale sviluppo su scala mondiale.

La capacità di adattamento a condizioni ambientali estreme (in termini di salinità, radiazioni, luce, nutrienti, ecc..) fa degli organismi marini un'importante e quasi illimitata materia di ricerca, e consente la produzione di una grande varietà di metaboliti secondari biologicamente attivi, che non possono essere trovati in altri in altri organismi. La tabella 1.1 presenta alcuni esempi degli ingredienti funzionali trovati in macroalghe e microalghe, assieme ai loro possibili effetti terapeutici.

Macro- o micro- alga	Composti funzionali	effetto terapeutico
<i>Ascophyllum nodosum</i>	Acido alginico, xilofucani	Attività antivirale
	florotannini	Attività antiossidante
<i>Himanthalia elongate</i>	Steroli	Riduce l'effetto immunosoppressante del colesterolo LDL
	Fibre solubili	Riduce il colesterolo
	Polisaccaridi solfati	Attività antivirale
	fucoxantina	Effetto preventivo nei disagi cerebrovascolari
<i>Muriellopsis spp</i>	carotenoidi	Antiossidanti, anti-cancro
<i>Arthrospira platensis</i> (<i>spirulina</i>)	ficobiliproteine	Attività immunomodulante, anticancro ed epatoprotettiva, proprietà antiinfiammatorie e antiossidanti
	Acidi fenolici	Attività antiossidante

Tabella 1-1: ingredienti potenzialmente funzionali trovati nelle alghe e i loro potenziali effetti sulla salute umana

Le alghe marine, come altre piante fotosintetiche, sono esposte ad una combinazione tale di luce e ossigeno che porta alla formazione di radicali liberi ed altri agenti fortemente ossidanti. Tuttavia l'assenza di danneggiamento ossidativo nei componenti strutturali delle alghe (acidi grassi poliinsaturi) e la loro stabilità all'ossidazione durante lo stoccaggio suggerisce che le loro cellule abbiano sistemi di difesa e protezione antiossidanti ^[4]

Infatti le alghe possiedono enzimi protettivi (superossido dismutasi, perossidasi, glutazione reductasi, catalasi) e molecole antiossidanti (florotannini, acido ascorbico, tocoferolo, carotenoidi, fosfolipidi, bromofenoli, catechine, ecc..) che sono simili a quelli delle piante terrestri ^[5]

Un esempio sono i florotannini, polifenoli tipici delle alghe brune, che consistono in oligomeri e polimeri del floroglucinolo :

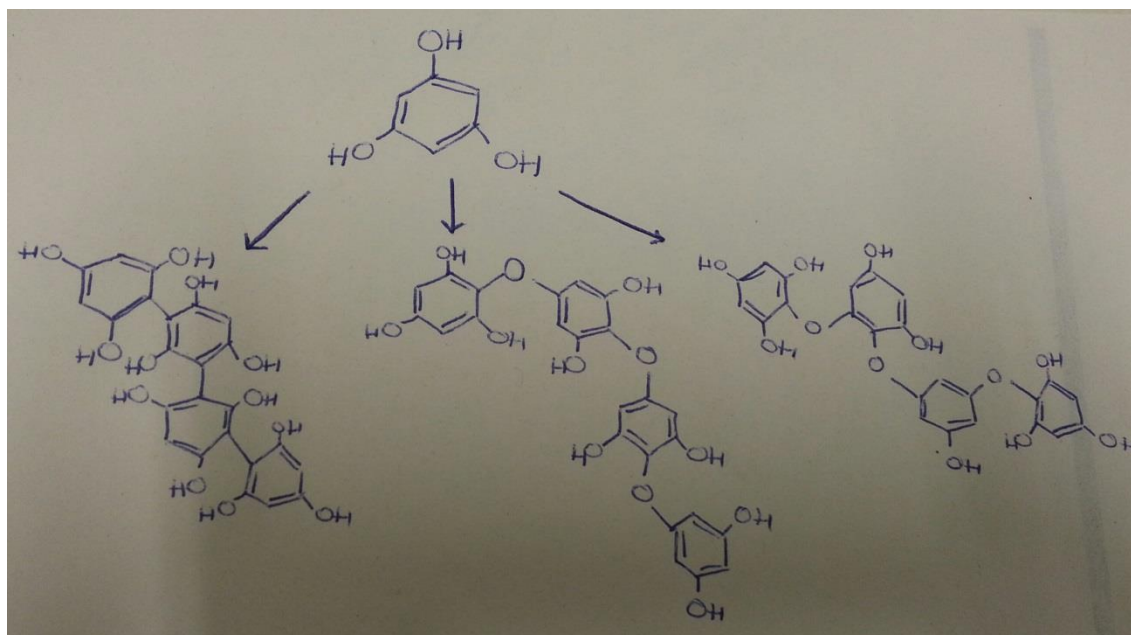


Figura 1-3: strutture del floroglucinolo i cui derivati sono, da sinistra a destra, tetrafucolo, tetrafloretolo e fucodifloretolo

Quando 2 anelli aromatici sono puramente connessi con legami aril-aril, si è formato un gruppo fucolo, mentre i floretoli sono formati invece da legami arileteri. L'utilizzo dei florotannini come principio attivo di farmaci è auspicabile in un futuro al posto degli antiossidanti sintetici quali butilidrossichinone, idrossitoluene butilato, tert butilidrossichinone e propil gallato, poichè questi ultimi possono loro stessi costituire dei pericoli, inclusi effetti cancerogeni.

Queste molecole hanno un alto potenziale per l'utilizzo in farmaci, cosmetici, come integratori alimentari e ingredienti funzionali nei cibi. Nonostante sia vero che dalle risorse marine sono stati isolati dei composti ad azione anti-cancro e anti-tumorale (a differenti stage di sviluppo clinico), è stato stimato che il numero di sostanze isolate dalle risorse marine tra il 1965 e il 2006 è solo il 3% dei composti marini esistenti. Pertanto, la ricerca di nuovi composti biologicamente attivi rimane un filone quasi illimitato di ricerca.

1.1.3 La bioliquefazione molecolare ^[6]

Per recuperare i singoli composti attivi dai diversi tessuti vegetali è necessario disgregare le matrici solide al fine di rendere le molecole d'interesse disponibili per le fasi di recupero. Le tecniche di disgregazione dei tessuti vegetali prevedono attualmente l'utilizzo di trattamenti chimici (acidi, basi, solfito), e quelle di estrazione sono essenzialmente basate su estrazioni con solventi organici come metanolo, etanolo, acetone oppure su tecniche costose che utilizzano i fluidi supercritici e sono dunque difficilmente industrializzabili in impianti di facile gestione. In seguito al processo di estrazione, inoltre, gli scarti devono essere trattati come rifiuti speciali, con conseguente elevato costo di smaltimento per l'estrattore, nonché elevate problematiche ambientali. L'utilizzo di biocatalizzatori enzimatici per ottenere l'idrolisi delle matrici vegetali per il recupero delle frazioni chimiche può costituire un'interessante alternativa ai processi chimici sia dal punto di vista economico che ambientale. Gli enzimi idrolitici si trovano ormai in numerosi prodotti commerciali utilizzati ad esempio nell'industria della panificazione, della produzione di succhi e conserve, in enologia e nella produzione di birra. Questi sono ottenuti per via fermentativa da diverse specie di funghi, tra i quali i più diffusi appartengono ai generi *Aspergillus* e *Trichoderma*. Prodotti con elevate attività xilanasiche, amilasiche e cellulasiche possono consentire di disgregare le strutture polisaccaridiche delle matrici vegetali rilasciando le componenti chimiche in soluzione.

Le tecnologie di bioliquefazione molecolare dei vegetali in ambiente completamente acquoso, sviluppate sono improntate all'efficacia e all'abbattimento degli impatti ambientali:

- massimizzazione della resa di ottenimento di molecole attive;
- conseguimento di prodotti non contenenti sostanze pericolose, dunque sicuri;
- nessuna generazione di rifiuti speciali come vegetali impregnati di solventi organici (*solvent free processes* a basso impatto ambientale);
- nessun utilizzo di trattamenti chimici "tradizionali", come idrolisi acide o basiche, solfitazioni, estrazioni con solventi, ecc.;
- sicurezza di processo per gli operatori agli impianti e quindi assenza di liquidi o gas infiammabili di alte pressioni o depressioni e di solventi tossici;
- riduzione del volume di sottoprodotti ossia il vegetale deve trasformarsi nella maggior percentuale possibile di nuova materia prima

Le matrici vegetali intrappolano fisicamente e spesso chimicamente, tramite legami covalenti, le diverse molecole, che sono dunque solo parzialmente biodisponibili e spesso scarsamente estraibili con solventi. Infatti i principi attivi all'interno delle matrici vegetali possono essere racchiusi in diversi modi:

1. come parte integrante delle catene polisaccaridiche vegetali;
2. intrappolati fisicamente;
3. legati tramite legami chimici alle strutture polisaccaridiche.

Nel primo e nel terzo caso i principi attivi non risultano estraibili con i metodi classici, nel secondo risultano parzialmente estraibili. La bioliquefazione molecolare delle matrici vegetali si basa sull'utilizzo di una serie di processi biotecnologici enzimatici sequenziali, che consentono di disgregare a livello molecolare e in maniera specifica le macrostrutture polisaccaridiche e proteiche tramite tagli molecolari mirati. Specifici trattamenti biocatalitici preliminari permettono di idrolizzare le molecole strutturali che costituiscono i tessuti vegetali delle piante marine e di recuperare i principi attivi che sono parte integrante di tali strutture polisaccaridiche come ad esempio i fucoidani delle alghe brune. Tali trattamenti destrutturativi creano inoltre punti d'accesso ai successivi biocatalizzatori che permettono in *multistep* la completa bioliquefazione, rendendo solubili e biodisponibili in ambiente acquoso tutte le altre molecole funzionali. Grazie alle tecnologie di bioliquefazione molecolare è possibile formulare dei cosmetici estremamente sicuri ed efficaci che contengono il mix completo delle molecole bioattive presenti nei tessuti vegetali, rispettando i raffinati equilibri naturali di composizioni e concentrazioni reciproche.

1.2 la cellula algale

Le alghe appartengono al regno dei vegetali, si differenziano dalle piante superiori perché strutturalmente sono molto semplici. Fino ad oggi sono state classificate circa 30.000 specie di alghe⁷ Il loro habitat è costituito dalle acque di mari, fiumi e laghi, a condizione che siano sufficientemente esposte alla luce solare: nelle cellule delle alghe avviene la fotosintesi che, utilizzando la clorofilla, permette la produzione di molecole organiche a partire dall'anidride carbonica (CO₂) con liberazione di ossigeno.⁸ Le alghe possono esistere in varie forme, dagli organismi microscopici unicellulari (microalghe) a organismi multicellulari di grandi dimensioni (macroalghe) e vengono

definite tallofite perché il loro corpo vegetale è un tallo, ovvero una struttura priva di tessuti specializzati. Come con altri organismi marini, le alghe possono adattarsi alle mutevoli condizioni dell'ambiente con la produzione di una grande varietà di metaboliti secondari biologicamente attivi, che non può essere trovata in altri organismi.

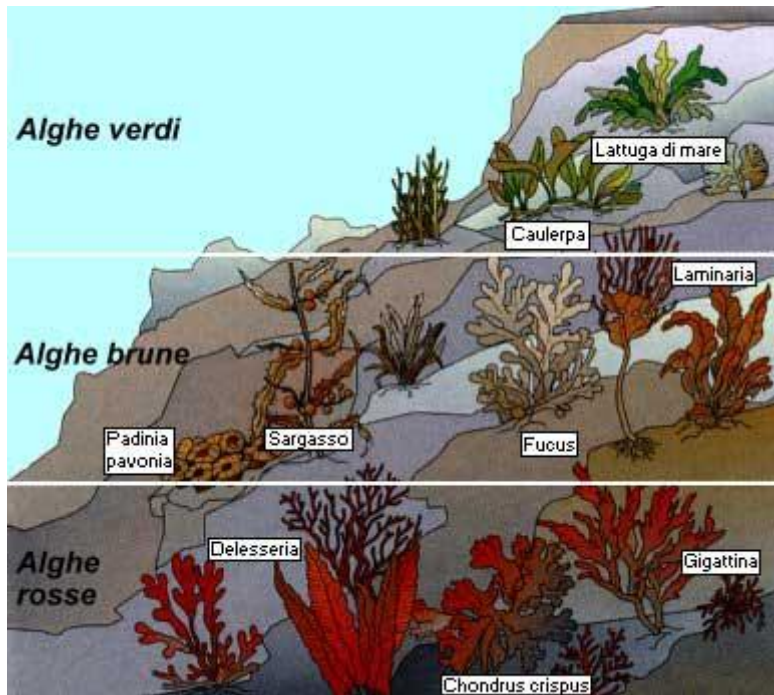


Figura 1-4: habitat marino delle alghe

Secondo la prevalenza di alcuni pigmenti le alghe sono classificate in 4 grandi classi:

- Azzurre (cianofite): a metà strada tra alghe e batteri. La clorofilla viene mascherata da pigmenti di colore azzurro come la ficocianina.
- Verdi (clorofite): sono le più ricche di clorofilla, gran parte di esse vive in acque dolci e con poca umidità. Alghe verdi contengono polisaccaridi acido solforico, galattani e xilani solfati,
- Rosse (rodofite): sono principalmente marine, definite calcaree per la loro predisposizione a depositare il carbonato di calcio, il loro colore deriva dalla ficoeritrina.
- Brune (feofite): vivono in mare, sono definite alghe superiori e possono arrivare anche a diversi metri di lunghezza. Il colore bruno è dovuto dalla presenza di fucoxantina, ma sono presenti anche alginico acido, fucoidano (fucosio solforato), laminarina (β -1, 3 glucano) ⁹

Contrariamente alle piante terrestri, alcune alghe mancano di una componente scheletrica della parete cellulare, che è costituita principalmente da polimeri neutri, i polisaccaridi algali, e in minor quantità da glicoproteine¹⁰.

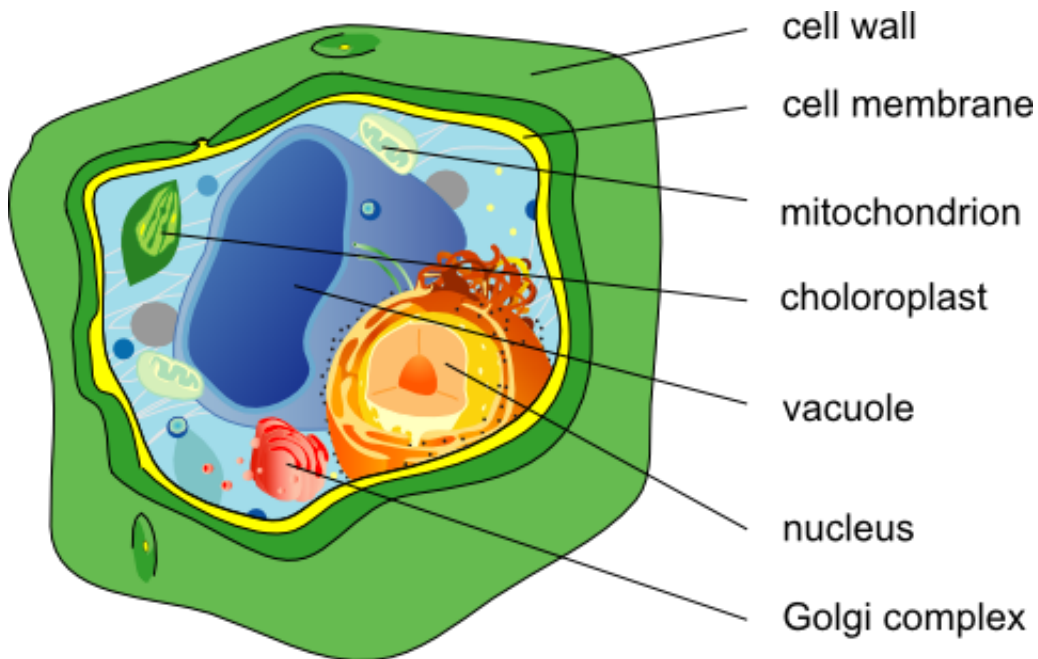


Figura 1-5: struttura di una cellula algale vista in sezione

Nelle alghe i cloroplasti sono circondati da 2 involucri esterni che in alcuni casi continuano la membrana perinucleare. Il pirenoide, quando presente, sporge dal cloroplasto. L'apparato di Golgi è strettamente legato all'involucro nucleare, ma nelle Fucacee, alghe brune, questa associazione può estendersi a porzioni del reticolo endoplasmatico.

1.2.1 costituenti polisaccaridici

I principali polisaccaridi che costituiscono la parete cellulare sono cellulosa, emicellulose e pectine, ma seconda della tipologia di alga, vi sono differenti polisaccaridi, la cui funzione è quella di sostenere fisicamente il tallo in acqua, quali carragenina, acido alginico, fucoidano e laminarina.

La carragenina, tipica componente delle alghe rosse, è un polisaccaride solfato costituito da due frazioni: κ -carragenano e λ -carragenano. κ - e λ -carragenano rappresentano

rispettivamente, circa il 40 e 60% di estratto non frazionato. Il κ -carragenano è composto da residui di D-galattosio solfato e 3,6-anidro-D-galattosio in quantità approssimativamente equimolari e possiede una struttura ramificata, mentre il λ -carragenano è composto quasi interamente da D-galattosio solfato (figura 1-6)

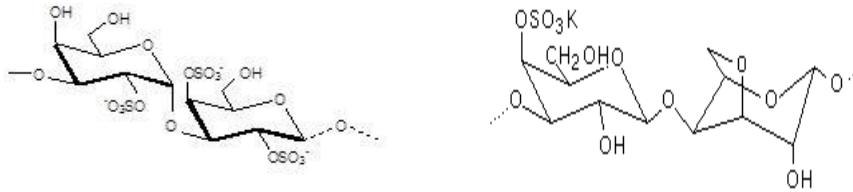


Figura 1-6: da sinistra struttura del λ -carragenano e del κ -carragenano

L'Agar agar è una miscela di polisaccaridi, che può essere composto di agarosio e agropectina, le cui strutture e proprietà funzionali sono simili quelle delle sopracitate carragenine (figura 1-7)

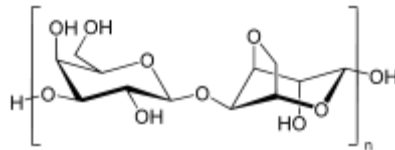


Figura 1-7: struttura chimica dell'agarosio

Si tratta di una sostanza particolarmente gelificante, in quanto è in grado di gelificare anche ad una concentrazione più bassa di 0.05%. Forma gel resistenti al calore e svolge anche attività emulsionante e stabilizzante. E 'stato riportato che l'agar-agar porta alla diminuzione della concentrazione di glucosio nel sangue.

Gli alginati sono polisaccaridi estratti da alghe brune (Phaeophyceae), sono polimeri lineari formati da acido β -D mannuronico (M) e acido α -L guluronico (G). Nello spazio la molecola si presenta come una spirale in senso antiorario, più stretta nella zona in cui prevale l'acido guluronico e più larga nelle aree in cui vi è acido mannuronico. Le zone in cui si alternano sono definite "fragili". La forma acida è un acido poliuronico lineare e viene indicato come acido alginico, mentre la forma di sale è un importante componente della parete cellulare in tutte le alghe brune, che costituiscono fino al 40-47% del peso secco della biomassa algale¹¹ (figura 1-8).

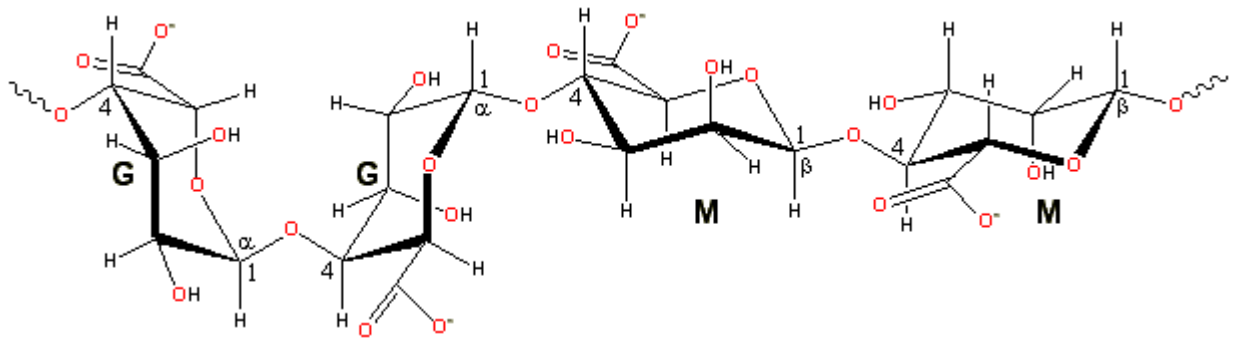


Figura 1-8: struttura dell'alginato

Il rapporto M/G e la sequenza dei residui presenti nella catena dipende dalla fonte delle alghe, le condizioni di crescita, l'età e la posizione all'interno della pianta. Con l'aggiunta di ioni calcio gli alginati rendono la soluzione più viscosa, e possono gelificare ad una concentrazione $\text{Ca}^{2+} > 400$ ppm. Le strutture dei gel formati dagli alginati assumono una conformazione detta a "scatola d'uovo"¹². Alcuni studi dimostrano come la struttura di alginato si modifica a seconda dell'età dei tessuti, quelli più giovani risultano ricchi in blocchi di acido mannuronico.

Il Fucoidano è un complesso polisaccaridi composto soprattutto di fucopiranoside e solfato naturale presente nelle alghe brune ma non in altre alghe o piante superiori¹³. Le molecole di Fucoidano anche dimostrano d'avere una tendenza ad aderirsi a gruppi di solfati dei polisaccaridi e la loro attività biologica antiossidante e anticoagulante è legata non solo al peso molecolare e il contenuto di estere solfato, ma anche alla posizione dei gruppi solfato nei residui zuccherini¹⁴ (figura 1-9).

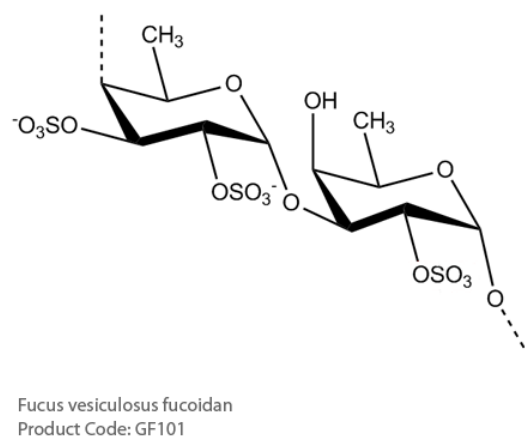


Figura 1-9: struttura molecolare del fucoidano

Ricerche indicano infatti, che quanto più elevato è il numero di solfati dei polisaccaridi in una pianta, tanto più elevato sarà il suo potenziale terapeutico. Il fucosio è uno degli 8 zuccheri essenziali biologici recentemente riconosciuto come indispensabile per la comunicazione da cellula a cellula attraverso le glicoproteine e i glicolipidi. L'alga accumula il fucoidano durante l'estate e l'autunno; è nel momento in cui ne è più ricca che viene raccolta.

La laminarina si trova nelle fronde di *Laminaria* / *Saccharina* e, in misura minore, in *Ascophyllum*, *Fucus* e *Undaria*. Il contenuto varia stagionalmente e con l'ambiente e può raggiungere fino al 32% del peso secco. La Laminarina fornisce protezione contro l'infezione da batteri patogeni e rinforza il sistema immunitario.

Ultima ma non meno importante in quanto costituisce una parte consistente della struttura algale è la cellulosa. La cellulosa è un polimero lineare costituito da unità di D-glucosio legate tra loro tramite legami β -1,4 glicosidici; è la sostanza fondamentale della componente fibrillare delle pareti, è organizzata in micro fibrille di circa 5-10 nm di diametro formate da 36 catene di cellulosa sfalsate tra loro ed orientate nella stessa direzione; questo polisaccaride ha principalmente il ruolo di materiale strutturale che conferisce forza e rigidità alle piante ¹⁵.

1.2.2 costituenti non polisaccaridici

I metaboliti secondari fenolici sono un vasto gruppo di composti chimici che esistono sia nelle piante terrestri che in quelle marine. Fra di essi troviamo i tanni, un'ampia famiglia di metaboliti che sono comunemente divisi in tre categorie in base alla differente struttura chimica:

- tannini idrolizzabili: sono caratterizzati da una parte centrale polioidrossilica esterificata con acido gallico¹⁶ e sono presenti nell'angiosperma delle alghe verdi
- tannini condensati con flavonoidi: presenti nel vino rosso e nel succo del cocco
- florotannini: consistono in polimero di unità di floroglucino, presenti solo nelle alghe brune, in cui svolgono il ruolo di osmoregolatori e componenti della parete cellulare¹⁷, localizzati in fisodi legati alla membrana citoplasmatica delle cellule.

Il livello di polifenoli varia molto a seconda dei fattori ambientali quali la salinità, la disponibilità della luce solare e della radiazione ultravioletta¹⁸.

Per quanto riguarda il contenuto proteico delle alghe, esso varia a seconda della specie investigata. Generalmente la frazione proteica delle alghe brune è minore di quella delle alghe verdi e rosse, come è riportato in tabella 1-2.

	<i>Ulva lactuca</i> (verde)	<i>Porphyra palmata</i> (rossa)	<i>Ascophyllum nodosum</i> (bruna)
% proteica su massa secca	10-21	33-47	3-15

Tabella 1-2: contenuto proteico di tre differenti specie di alghe

Il livello di proteine nelle alghe dipende anche dalle variazioni stagionali: alti livelli sono stati riscontrati nei primi mesi dell'anno mentre a fine estate le concentrazioni erano notevolmente minori.

Importanti sono anche i pigmenti:

- clorofille: pigmenti verdi liposolubili, la cui concentrazione è stato dimostrato essere 3 volte superiore in alghe cresciute nei quartieri portuali rispetto ad alghe in una località in mare aperto¹⁹.
- carotenoidi: sono polieni lineari, specie di alghe verdi contengono il β -carotene, violaxantina, neoxantina, mentre le alghe rosse principalmente α - e β -carotene, luteina e zeaxantina., le alghe brune invece violaxantina e fucoxantina²⁰.

1.3 *Ascophyllum Nodosum*

L'*Ascophyllum nodosum* è un'alga bruna della famiglia delle Fucacee, che è presente soprattutto sulle coste dell'oceano atlantico, dell'Europa nord-occidentale e sulle coste orientali del Nord America. Le Fucacee sono caratterizzate dal fatto di crescere da un gruppo di cellule apicali il che significa che l'attività di moltiplicazione cellulare è limitata a una sola cellula posta nella porzione terminale del tallo.

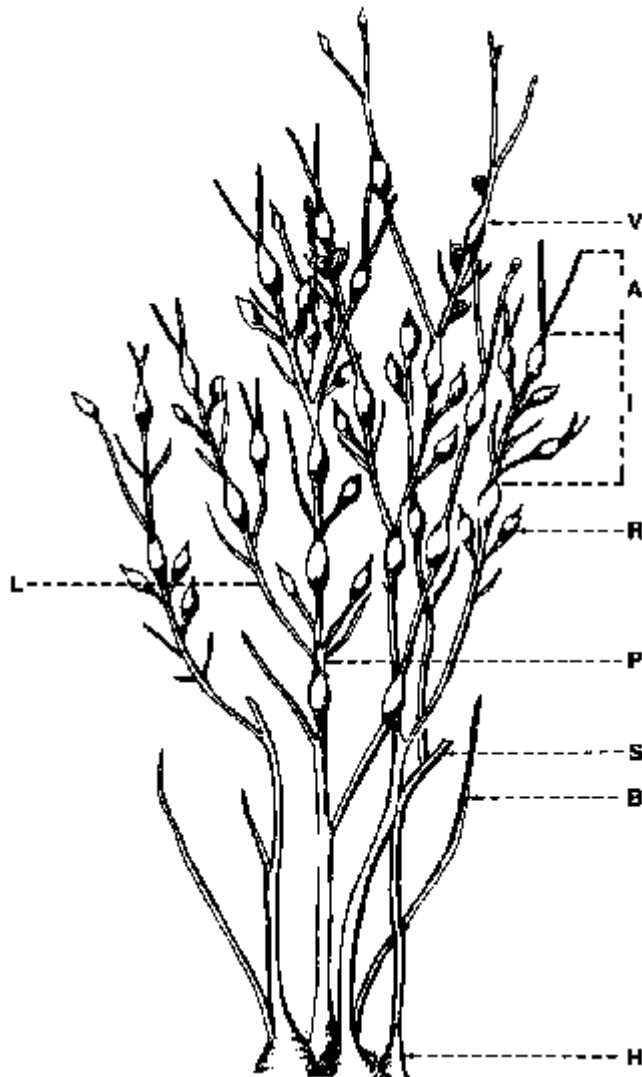


Figura 1-10: Struttura dell'*A. Nodosum*: H: Holdfast (base) – basamento della pianta S: Stump (ceppo) – un getto privo di meristema apicale. P: Primary shoot (getto primario) – che si origina direttamente dalla base (include basal shoot B). L: Lateral shoot – parte da una estremità laterale in un di un altro getto I: Internode (internodo)- la porzione di getto fra due vescicole adiacenti A: Apical tip (estremità apicale) – la porzione del getto distante dall'ultima vescicola. V: Vesicles (vescicole) – dilatazione del gettoprodotta ad intervalli regolari connessi al tasso di allungamento annuale R: Receptacles (recipienti) – getti laterali fecondi che compaiono fra aprile e giugno e maturano in un anno.

La cellula apicale in questi organismi si divide solo secondo un piano basale, trasversale rispetto al filamento da cui è portata. Si formano così una nuova cellula apicale e una cellula basale che successivamente si può poi dividere anche longitudinalmente. Nel caso delle Fucaceae non vi è un'unica cellula apicale ma un gruppo. Gli sporangi sono posti in maniera superficiale sulla pianta e rilasciano i gameti che si combinano all'esterno della pianta. La famiglia delle Fucaceae ha rami dicotomici o pinnati e in alcuni casi con numerose fessure. Il genere *Ascophyllum* si distingue da *Fucus* per i suoi rami indifferenziati in una nervatura centrale ed un corpo. *Ascophyllum* ha un tallo cartilagineo con rami primari dicotomici e rami secondari laterali pinnati. Vescicole singole si espandono dal tallo a vari intervalli ed i recipienti sono ovali e gialli a maturazione. Le sue vescicole, contenitori di aria, supportano il tallo permettendo una crescita apicale tale da esporre al massimo l'alga alla luce solare.

L.A. Nodosum è un'alga bruna avente una composizione chimica molto interessante in quanto è ricca di carboidrati, proteine, vitamine e sali minerali.

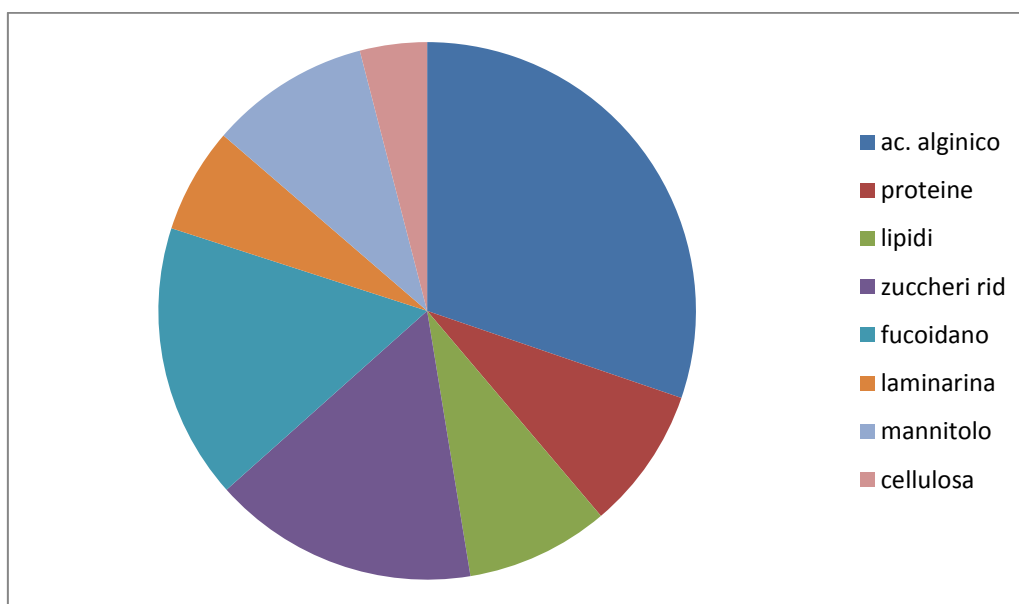


Figura 1-11: composizione chimica dell'*A. Nodosum*

Le pareti cellulari sono composte principalmente di alginati e fucani solforati, la cui percentuale varia a seconda dell'ambiente. Si deduce che l'acido alginico è una parte della parete fibrillare, mentre una parte significativa dei fucani appartiene alla matrice intercellulare. L'*Ascophyllum* è poi rispetto ad altre alghe brune molto ricca in fucani e povera in alginati.²¹ Tra le alghe brune più ricche in carboidrati che sono in percentuale

fra il 50 e 60 % e in particolare trattasi di acido alginico (21%) e di fucoidano (11,5%) solubile con più facilità ad alte temperature e pH acidi.

La presenza di vitamine e di attività antimicrobica è dipendente dal momento dell'anno in cui le alghe vengono analizzate. Il tocoferolo (vitamina E) risulta massimo a settembre e febbraio, la colina (gruppo della vitamina B) ha il suo picco in inverno e primavera mentre ha un calo in estate, i composti antimicrobici al contrario sono presenti in estate ma praticamente assenti in primavera e inverno.

Il contenuto di florotannini, particolari polifenoli presenti solo nelle alghe brune, in *Ascophyllum* è abbastanza elevato (~ 4-5% del peso secco) durante il periodo primaverile (maggio) e raggiunge un massimo (~ 7-8%) durante la stagione invernale. Essi giocano un ruolo importante sia nella formazione della parete cellulare sia nella protezione di quest'ultima dalle radiazioni ultraviolette²².

Ugualmente importanti e tipici delle alghe brune sono i pigmenti vegetali che ne generano il particolare colore bruno, quali fucoxantina, violaxantina e beta-carotene (figura 1-12).

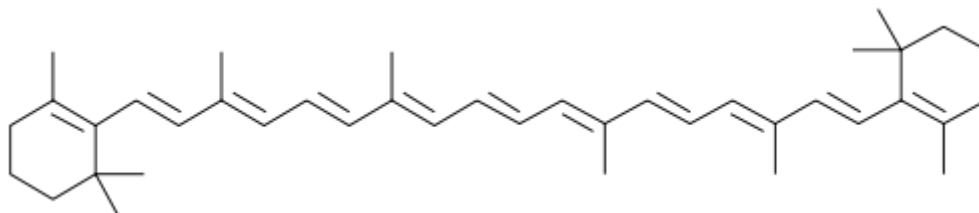


Figura 1-12: struttura molecolare del beta-carotene

I carotenoidi sono pigmenti presenti in tutte le alghe e assorbono nelle lunghezze d'onda del giallo -arancione-rosso. Si dividono in caroteni e xantofille: i primi sono degli idrocarburi, mentre le seconde possono contenere uno o più atomi di Ossigeno nella molecola.

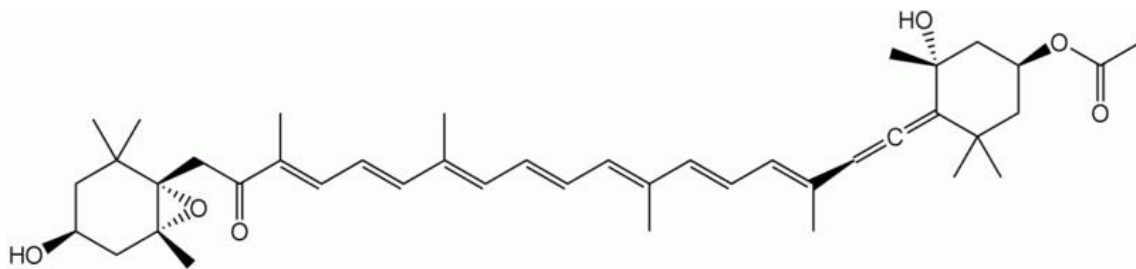


Figura 1-13: struttura molecolare della fucoxantina

La fucoxantina è un carotenoide che conferisce alle alghe brune la tonalità scura, sovrapponendosi alla clorofilla. Assorbe la luce principalmente nel blu-verde, con un picco ai 510-525nm assorbendo in maniera significativa nel range 450-540nm.

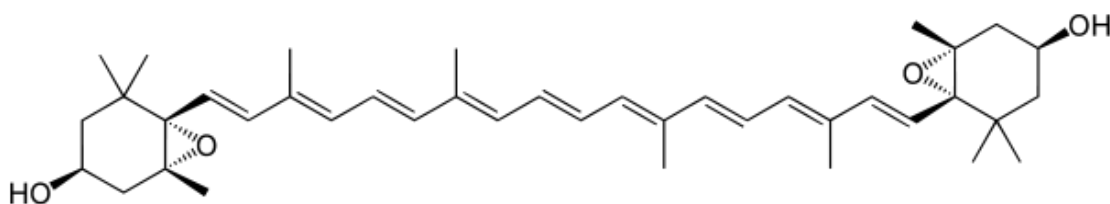


Figura 1-14: struttura molecolare della violaxantina

La violaxantina è un carotenoide della famiglia delle xantofille, e assorbe la luce nelle lunghezze d'onda del violetto.

L'*Ascophyllum Nodosum* è raccolto per l'uso negli alginati, nei fertilizzanti, per la produzione di farine per l'alimentazione animale nonché per la produzione di particolari ingredienti per il consumo umano. I fucoidi mostrano eccellenti capacità di legare metalli (in particolare il piombo). Il fucosterolo (che comprende più del 95% degli steroli delle alghe) ha un'attività anti-ipercolesterolemica. L'alginato in forma di sale è spesso utilizzato anche come agente gelificante e viene anche usato industrialmente negli adesivi, esplosivi, come emulsionante e nella ceramica.

1.4 Biocatalizzatori industriali per l'idrolisi di matrici vegetali

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

acquoso e in condizioni operative (pH, temperatura, pressione etc.) generalmente blande.

Il settore delle trasformazioni alimentari fa largo uso di preparati enzimatici come additivi tecnologici. Le lipasi, libere o immobilizzate, vengono impiegate nelle trasformazioni di acidi grassi²³, le proteasi per la trasformazione delle carni²⁴ e la vastissima classe delle carboidrasi viene sfruttata in moltissimi settori ad esempio per la produzione di succhi e puree e prodotti da forno.

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

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

1.4.1 Pectinasi²⁵

Le pectinasi sono una vasta famiglia di enzimi in grado di aggredire le diverse e complicatissime strutture poligalatturoniche dei vegetali. Questi biocatalizzatori sono tra i più diffusi per applicazioni industriali soprattutto nei settori di produzione di succhi e alimenti in generale. Si stima che questi preparati costituiscano il 25% del mercato globale degli enzimi e la più comune fonte dal quale vengono estratti è *Aspergillus niger*²⁶.

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

- le polimetilgalatturonasi e le poligalatturonasi (EC 3.2.1.15) idrolizzano i legami α -1,4 tra le unità di acido galatturonico più o meno mutilato;

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

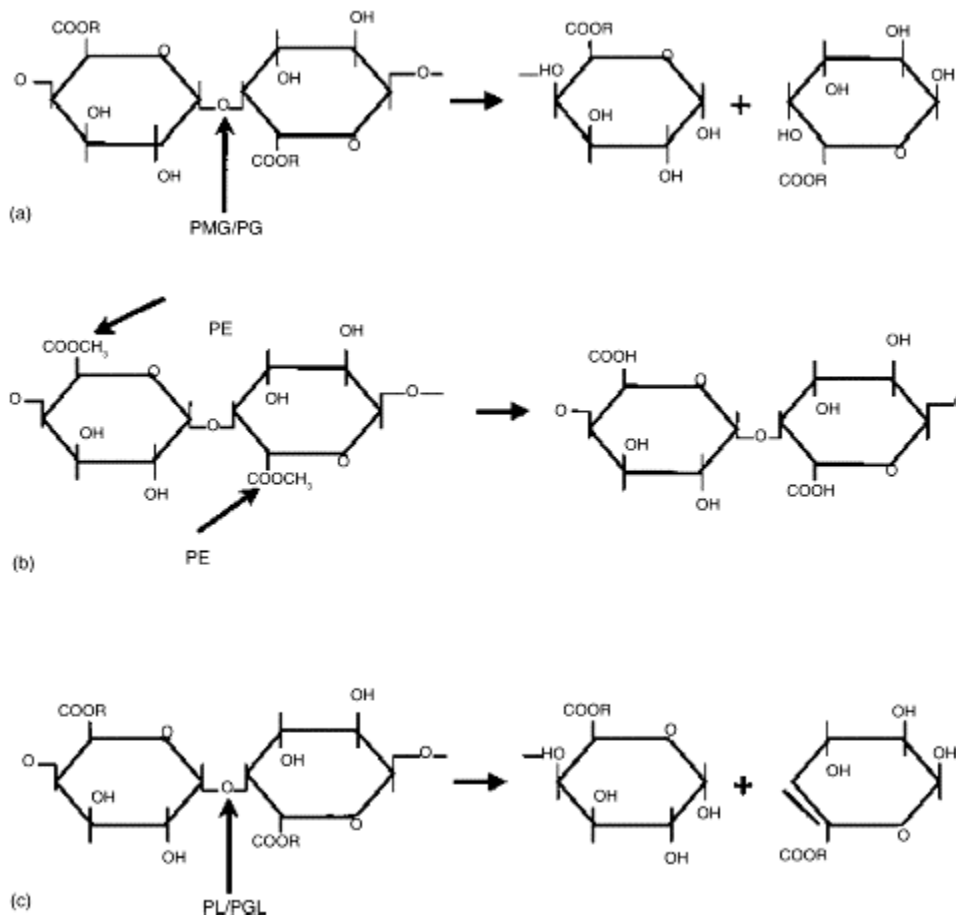


Figura 1-15: modo d'azione delle pectinasi: (a) R = H per PG e CH₃ per PMG; (b) PE; e (c) R=H per PGL e CH₃ per PL. La freccia indica il legame idrolizzato dalla pectinasi. PMG, polimetilgalatturonasi; PG, poligalatturonasi (EC 3.2.1.15); PE, pectinesterasi (EC 3.1.1.11); PL, pectin liasi (EC-4.2.2.10) (Da Jayani *et al.* 2005).

1.4.2 Alginato liasi²⁸

Le alginato liasi, enzimi caratterizzati sia come mannuronato o guluronato liasi, catalizzano la degradazione di alginato, un complesso copolimero di alfa-L-guluronato e la sua C5 epimero beta-D-mannuronato. Queste liasi sono stati isolati da una vasta gamma di organismi, compresi alghe, invertebrati marini, e microrganismi marini e terrestri.

Alginate Lyase Specificity

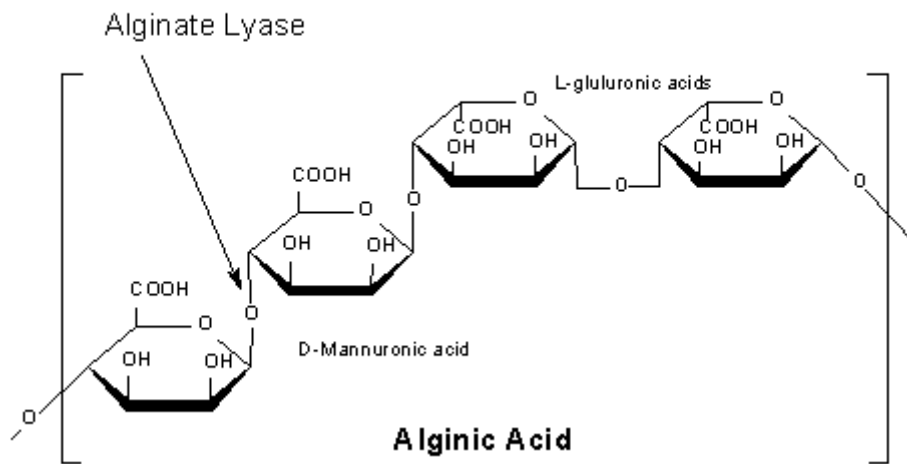


Figura 1-16: attività enzimatica dell'alginate liasi

2 SCOPO

Lo scopo del presente lavoro di ricerca è lo studio di un trattamento di valorizzazione dell'alga bruna *Ascophyllum Nodosum* per recuperare l'eventuale contenuto di componenti fitochimiche ad alto valore aggiunto.

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

La tipologia di enzimi utilizzati sono preparati industriali aventi attività alginasiche e pectinasiche, poiché la parete cellulare algale consiste principalmente in alginati e pectine.

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

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

3 MATERIALI E METODI

3.1 Determinazione rapporto ottimale matrice vegetale:acqua di reazione

Per poter effettuare analisi sulle matrici vegetali oggetto dello studio, è indispensabile determinare il rapporto matrice vegetale : acqua ottimale da utilizzare. A tale scopo, sono stati preparati diversi campioni contenenti la matrice vegetale (alga bruna) sospesa in diverse quantità di acqua. Sono state eseguite delle prove utilizzando rapporti matrice vegetale:acqua pari a 1:5 (20 g di matrice e 100ml di acqua), 1:10 (10 g di matrice e 100ml di acqua), 1:20 (5 g di matrice e 100ml di acqua), 1:50 (2g di matrice e 100ml di acqua) e 1:100 (1g di matrice e 100ml di acqua). E' importante sottolineare che un minore utilizzo d'acqua è auspicabile anche nella prospettiva di una industrializzazione dello studio.

3.2 profili di temperatura delle miscele acqua:glicerolo

Per il rapporto alga:solvente 1:20 sono state studiate miscele solventi a diversi rapporti acqua: glicerolo quali 100:0 (95gr di acqua), 80:20 (76g di acqua e 19g di glicerolo), 50:50 (47,5g di acqua e 47,5g di glicerolo), 20:80 (19g di acqua e 76g di glicerolo) e 0:100 (95g di glicerolo).

Ognuna di esse è stata sottoposta a trattamento termico per 30 minuti, durante i quali sono state effettuate delle misure di temperatura ogni 5 minuti. La procedura è stata ripetuta per ogni miscela in assenza di alga (95 g totali) e in presenza di alga (5g di alga e 95g di solvente).

3.3 trattamento termico ed enzimatico della matrice vegetale

L'alga bruna investigata è già stata precedentemente spezzettata ed essiccata, quindi la procedura d'analisi utilizzata prevede che i campioni, una volta pesati, vengano addizionati dell'opportuna miscela solvente.

Per ognuna delle miscele solventi descritte nel paragrafo 3.2 con rapporto alga:solvente 1:20, si è aspettato un tempo di 30 minuti, effettuando poi una filtrazione su tela e sulla fase acquosa sono stati condotti alcuni test per poterla caratterizzare.

La procedura è stata ripetuta per tutti i rapporti acqua:glicerolo, con la differenza che durante i 30 minuti il sistema è stato riscaldato per 30 minuti e successivamente raffreddato, avendo cura di ripristinare l'eventuale acqua persa per evaporazione.

Quanto al trattamento enzimatico, sono state effettuate diverse prove dove alle sospensioni ottenute, viene aggiunto successivamente l'enzima idrolitico Pectinasi, con una percentuale pari al 0,05%, 0,1% e 0,5% p/p di matrice vegetale; l'aggiunta di tale preparato deve essere effettuata solo una volta che il sistema si è raffreddato per evitarne la denaturazione.

L'azione enzimatica è stata protratta per un tempo pari a 4 ore effettuando poi una filtrazione su tela; sulla fase acquosa sono stati condotti alcuni test per poterla caratterizzare.

3.4 trattamenti termici della matrice vegetale per lo studio del rilascio del colore

Sui sistemi costituiti da alga e solvente in rapporto 1:20 e per tutte le miscele solventi sopra citate sono stati sottoposti a due tipi di trattamenti termici:

- Con gradiente di temperatura: il sistema è stato gradualmente riscaldato per 30 minuti e ogni 5 minuti si è prelevata un'aliquota, che è stata poi centrifugata; sulla fase aquosa si è poi eseguita una scansione allo spettrofotometro nel range di lunghezze d'onda 350-650nm.
- A temperatura costante: il sistema è stato portato a temperatura e solo poi sono stati introdotti i 5g di alga; dopo 30 minuti si è prelevata un'aliquota, che è stata poi centrifugata; sulla fase acquosa si è poi eseguita una scansione allo spettrofotometro nel range di lunghezze d'onda 350-650nm. La procedura è stata ripetuta per le temperature di 50°C e 100°C.

3.5 Enzimi idrolitici per la disgregazione della matrice vegetale

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

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

Allo scopo di idrolizzare la matrice vegetale in esame, sono stati utilizzati dei preparati commerciali enzimatici ed amilasi da laboratorio, precedentemente caratterizzati, in termini di diverse attività enzimatiche, durante un lavoro di ricerca svolto presso il gruppo di Biochimica Industriale del Dipartimento di Chimica Industriale e dei Materiali ²⁸:

- Fungamyl Super AX estratto da *Aspergillus Oryzae* e *Humicola Insolens* (Novozymes): preparato enzimatico granulare di colore marrone chiaro, proposto come α -amilasi, mostra buone attività feruloil e caffeil esterasiche, quindi si propone come potenziale biocatalizzatore per il recupero di fenoli; presenta inoltre buona attività pectinasica;
- Alginato-lyase: preparato enzimatico
- Percolato derivato dal fungo *Pleurotus Ostreatus*: enzimi prodotti in laboratorio da un mix di scarti alimentari quali crusca di grano, paglia di grano, graspi d'uva e vinaccioli, sottoponendoli ad un processo di Fermentazione in stato solido(SSF) in presenza del fungo; presenta attività cellulastica, xilanasica, laccasica, pectinasica, arilesterasica e alginasica.
- Pectinasi estratto da *Aspergillus Aculeatus*: preparato enzimatico di colore marrone chiaro con buona attività pectinasica e alginasica

3.6 Determinazione degli zuccheri riducenti (Metodo dell'ADNS)

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

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

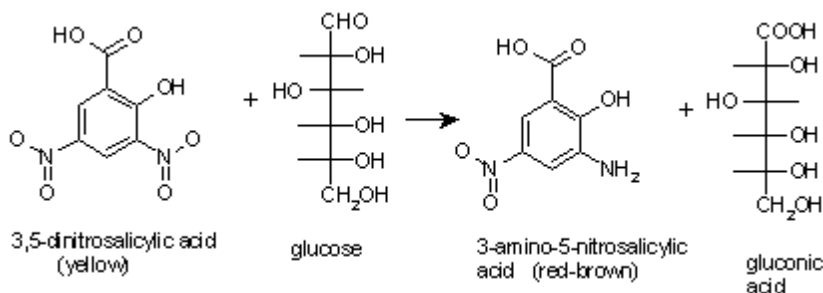


Figura 3-1: reazione ossidoriduttiva fra glucosio e acido 3,5-dinitrosalicilico (giallo) con formazione di acido gluconico e acido 3-ammino-5-nitrosalicilico (rosso).

Per determinare la concentrazione degli zuccheri riducenti di interesse presenti nei campioni si costruiscono le rette di taratura preparando soluzioni standard di D(+)-glucosio (M.W. C₆H₁₂O₆ 180,16 g/mol) (Sigma) a concentrazioni da 0,2 a 0,8 mg/ml in H e acido galatturonico (M.W. 212.2 g/mol) (Sigma) a concentrazioni da 0 a 1 mg/l in tampone di Mc Ilvine a pH 4.8. A 400 µl di tali soluzioni si aggiungono 600 µl di ADNS.

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

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

La concentrazioni di acido galatturonico liberato si ottiene usando la seguente retta di taratura (Figura 3-2):

$$\text{Acido Galatturonico rilasciato [mg/ml]} = (\text{Abs } 550 \text{ nm} + 0,044) / 1.112$$

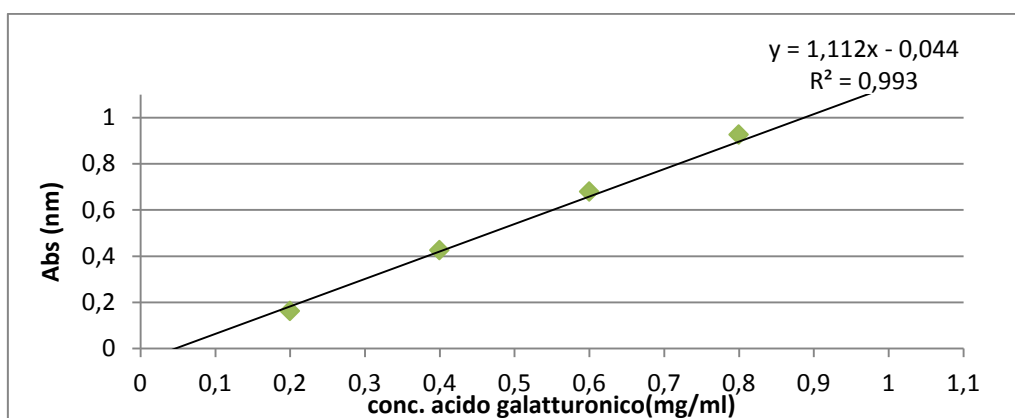


Figura 3-2: retta di taratura per la determinazione dell'attività pectinasica

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

3.7 Determinazione delle proteine totali (Metodo Bradford)

Per la determinazione delle proteine totali viene utilizzato un semplice saggio colorimetrico che utilizza il reattivo di Bradford. La retta di taratura (Figura 3-4) è costruita con soluzioni standard di BSA (albumina di siero bovino) alle concentrazioni di 0,25, 0,5, 1, 1,4 mg/ml. In una provetta si introducono 1,5 ml di reattivo di Bradford e successivamente 50 μ l di campione standard di BSA. Si lascia sviluppare il colore per un tempo di circa 5 min e successivamente si effettuano le letture di assorbanza alla lunghezza d'onda di 595 nm contro un bianco costituito da acqua distillata e 1,5 ml di reattivo³⁰.

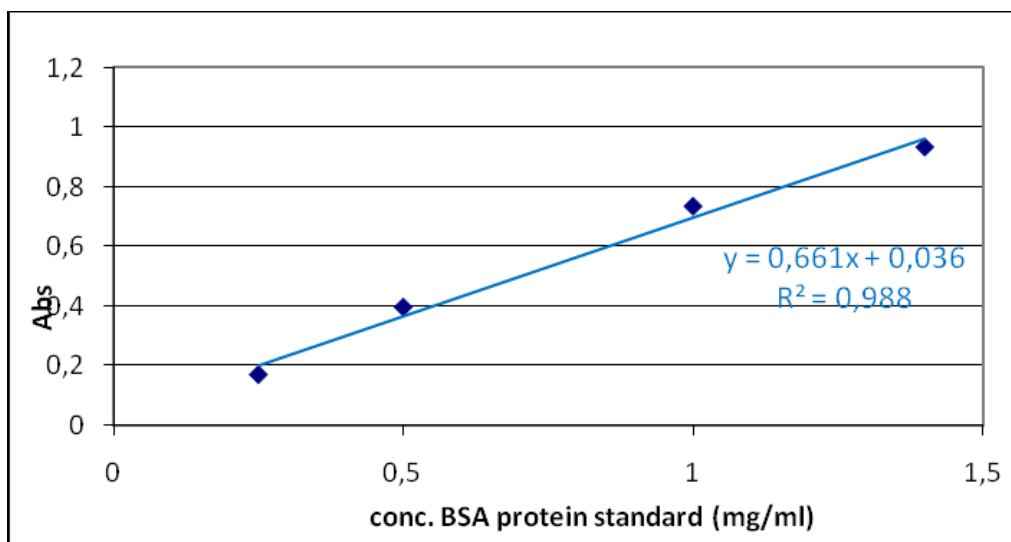


Figura 3-3: Retta di taratura per la determinazione delle proteine totali con il metodo di Bradford

3.8 Determinazione dei polifenoli totali (Metodo di Folin-Ciocalteu)³¹

Questo metodo sfrutta la reazione redox in ambiente basico tra composti fenolici e il reattivo di Folin-Ciocalteu, che è una miscela di acido fosfotungstico e fosfomolibdico. Da tale reazione si formano complessi blu di ossidi di W_8O_{23} e Mo_8O_{23} che presentano un massimo di assorbimento nel visibile a 700 nm.

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

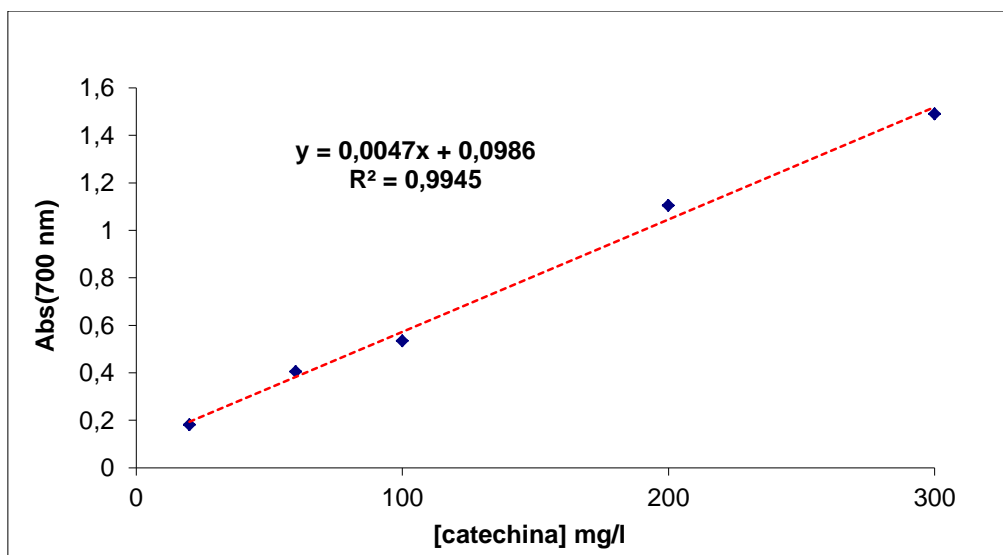


Figura 3-4: Retta di taratura per la determinazione dei polifenoli totali a 30 °C.

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

$$[\text{Polifenoli}] \text{ (mg/l)} = \text{Abs } 700 \text{ nm} * 212.8 * 1 \text{ (cammino ottico)}$$

Per la determinazione dei polifenoli totali presenti nei campioni, al fine di eliminare sostanze organiche che possono interferire nella lettura, si effettua un passaggio in cartuccia C-18 end-capped, Phenomenex-Strata, 1.0g/ 6ml, secondo il metodo descritto di seguito: si lava la cartuccia con 2 ml di metanolo e si condiziona con 5 ml d'acido solforico 0.01 N. Si adsorbe 1 ml di campione, opportunamente diluito in acido solforico 0.1 N per ottenere un'assorbanza compresa nel range della retta di taratura, e si aggiungono 2 ml d'acido solforico 0.01 N. Si collega la cartuccia ad un matraccio da 20 ml e si eluisce con 2 ml di metanolo e 5 ml d'acqua distillata. Al contenuto del matraccio si aggiunge 1 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu e, dopo 5 minuti, 4 ml di carbonato di sodio 10 % w/v portando poi a volume con acqua. Dopo 90 minuti si legge l'assorbanza a 700 nm, avendo cura di centrifugare il campione per sedimentare il precipitato di carbonato che si forma, contro un bianco preparato in un matraccio da 20 ml contenente tutti i reagenti e 2 ml di metanolo non contenente fenoli.

3.9 Determinazione del potere antiossidante totale³²

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

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

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

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

3.10 Determinazione dei carboidrati totali (Metodo fenolo/solforico)

La procedura si basa sul metodo fenolo/solforico che è stata ricavata da una metodica di analisi dei carboidrati totali attraverso analisi spettrofotometrica³³.

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

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

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

Dai valori di concentrazione degli standard e di assorbanza a 490 nm si costruisce la retta di taratura (Figura 3-5).

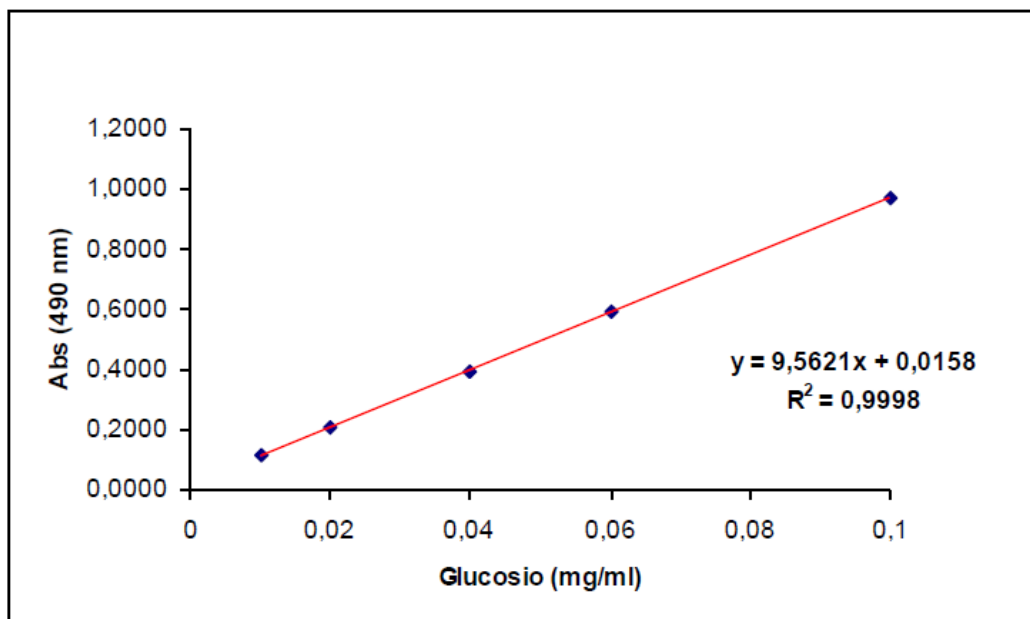


Figura 3-5: Retta di taratura per la determinazione dei carboidrati totali con il metodo fenolo/solforico non operando il raffreddamento dei tubi dopo aggiunta di acido solforico conc.

La retta di taratura di Figura 3-5 verrà utilizzata per le determinazioni sui campioni reali. Un'aliquota di estratto viene centrifugato e il surnatante, opportunamente diluito per ottenere concentrazioni pari a quelle della retta di taratura, viene sottoposto al saggio nelle quantità di 200 μ l. Attraverso il saggio si hanno valori relativi alla quantità di carboidrati totali espressi come concentrazione di glucosio proveniente dall'idrolisi delle catene polisaccaridiche.

3.11 Determinazione dell'attività alginasica di preparati enzimatici

Si è preparata una soluzione di acido alginico allo 0,3% (p/v) in tampone Mc Ilvine (0,15g in 40ml di tampone) a pH 5, facendo solubilizzare il polimero lasciando la soluzione ad ebollizione per 3 minuti sotto agitazione magnetica. Si è scelta questa concentrazione di substrato perché permette di ottenere valori di assorbanza apprezzabili e allo stesso tempo riduce i problemi operativi dovuti alla gelificazione dell'alginato. Dopo aver lasciato raffreddare il substrato fino a temperatura ambiente si è proceduto con la reazione enzimatica e il saggio per la determinazione degli zuccheri riducenti come descritto nel paragrafo 3.6.

3.12 Materiali e strumentazione utilizzati

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

- centrifuga “MIKRO 20” (Hettich Zentrifugen).

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

- spettrofotometro “UVIKON 923 Double beam UV/Vis spectrophotometer” (Bio-tek Kontron Instruments);
- pH-metro micro pH 2001 - CRISON;
- centrifuga “ALC 4239R High Speed Refrigerated Centrifuge;

questa centrifuga è stata utilizzata sempre ad una temperatura interna di 20 °C.

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

- acetone puro al 99% per analisi (Polichimica);
- n-esano, purezza 99% per analisi (Riedel-de Haen);
- etanolo, purezza 99.8% (v/v) (Fluka);
- Fungamyl Super AX (Novozymes);

4 RISULTATI E DISCUSSIONI

4.1 Determinazione del rapporto ottimale tra la matrice vegetale e il volume di acqua di reazione

La metodica richiede di sospendere la matrice vegetale in acqua per cui si è studiata la determinazione del rapporto ottimale tra l'alga bruna e l'acqua al fine di ottenere un sistema omogeneo, facile da campionare per le successive analisi e che permettesse un contatto ottimale tra enzima e matrice sospesa.

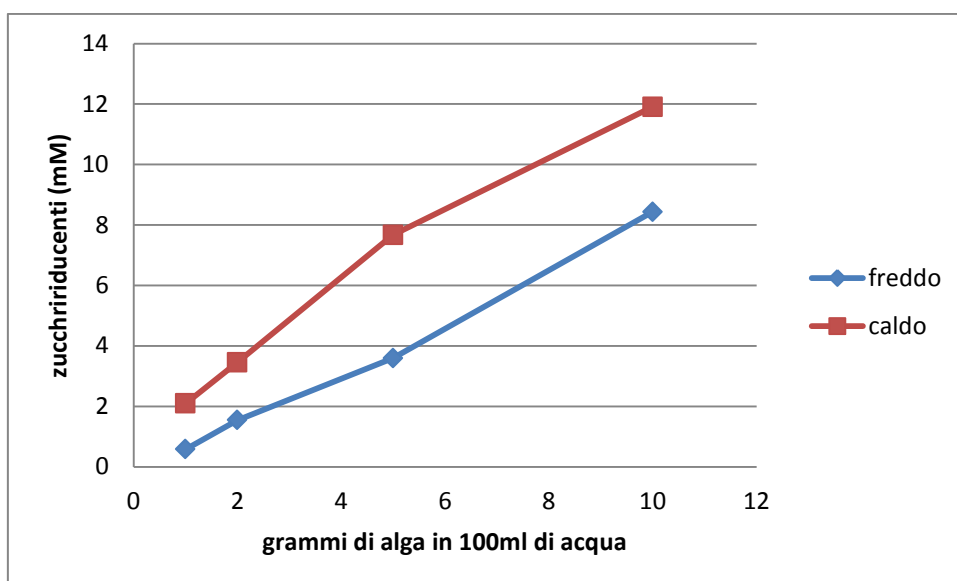


Figura 4-1: concentrazione di zuccheri riducenti espressa come $\text{mg}_{\text{glucosio equivalente}}/\text{ml}_{\text{soluzione}}$ relativo ai diversi grammi di acqua sottoposti a trattamento termico

Dal grafico riportato in figura 4-1 si può osservare che l'andamento della concentrazione di zuccheri riducenti liberati non è lineare con l'aumento dei grammi di alga disciolti, infatti dai 8,435mg/ml e 3,592mg/ml rispettivamente dei rapporti 1:10 e 1:20, si passa ai 1,546mg/ml e 0,58mg/ml dei rapporti 1:50 e 1:100. Al fine di studiare l'influenza della temperatura si sono effettuate prove con i diversi rapporti alga:acqua trattati termicamente, ottenendo un maggiore rilascio di principio attivo col riscaldamento. Pertanto si presume che ciò sia dovuto all'aumento di temperatura, conseguenza di cui è la probabile gelatinizzazione dell'alga.

Oltre ai rapporti alga:acqua descritti in figura 4-1, sono state effettuate le prove di estrazione con rapporto 1:5 (20gr in 100ml), tuttavia questo quantitativo di substrato si forma un pappone che non permette la movimentazione. Pertanto si è dedotto che il

rapporto ottimale alga:solvente è 1:20 poiché permette una corretta agitazione meccanica ed un'elevata estrazione di principio attivo.

4.2 Miscela acqua:glicerolo: effetto della temperatura

Dopo lo studio relativo al rapporto fra matrice vegetale e acqua, finalizzato a identificare il rapporto ottimale, è stato valutato l'utilizzo di glicerolo in qualità di solvente estraente allo scopo di massimizzare l'estrazione dei principi attivi. A questo fine sono state studiate miscele acqua:glicerolo con diverse % di glicerolo e in particolare, si è analizzato il comportamento delle varie miscele al variare della temperatura. L'utilizzo del glicerolo come co-solvente di estrazione è dovuto al fatto che è normalmente utilizzato su scala industriale per la preparazione di frazioni attive da matrici vegetali ad uso cosmetico e/o alimentare. In natura infatti le alghe marine, le piante resistenti al sole, insetti e pesci che vivono a basse temperature contengono glicerolo come componente cellulare comune, la cui presenza accresce inoltre la stabilità delle molecole biologiche. Ciò è probabilmente alla sua sviluppata rete spaziale di legami a idrogeno, come riporta A. Benamotz in un particolare studio ³⁵. Questo semplice triolo presenta inoltre una maggiore compatibilità con gli alimenti e in generale col corpo umano di altri solventi quali propilene glicole, etanolo e dicloro metano che possono provocare allergie.

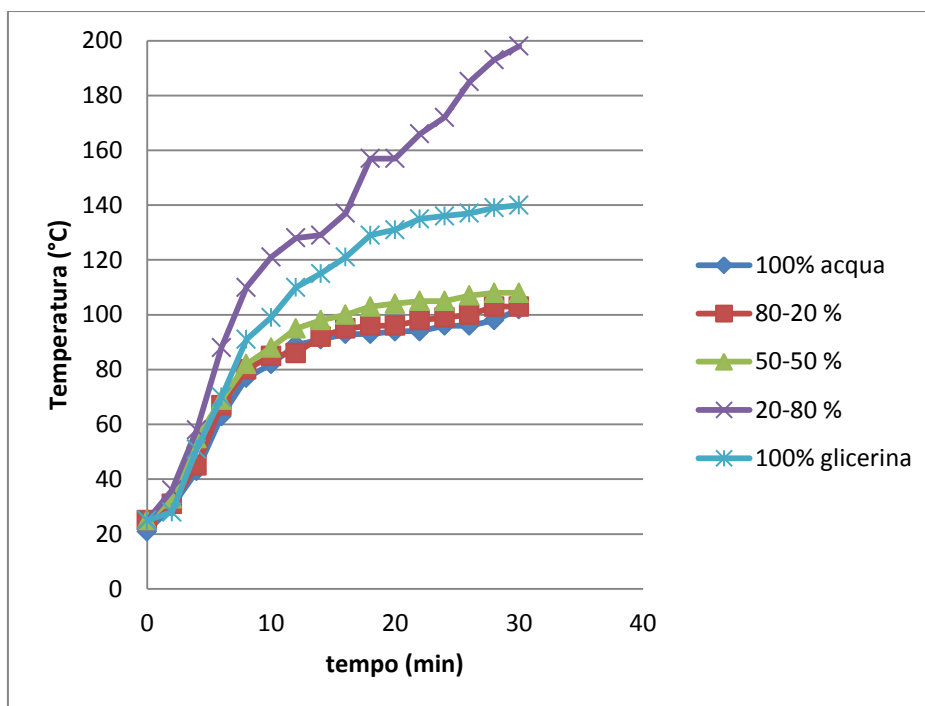


Figura 4-2: valori di temperatura di miscele solventi a diverse % di glicerina sottoposte a riscaldamento su piastra e agitazione magnetica

Dal grafico in figura 4.2 si nota come, dopo 30 minuti di riscaldamento, fino al 50% di glicerolo le miscele presentano andamento molto simile; al contrario con composizioni particolarmente ricche in glicerolo, le miscele assorbono meglio il calore e la temperatura sale più facilmente. Il risultato migliore è stato ottenuto dalla miscela acqua:glicerolo in rapporto 20:80, che presenta il maggiore incremento di temperatura.

4.3 Miscela acqua:glicerolo: effetto della temperatura in presenza di alga

Allo scopo di comprendere l'influenza della presenza dell'alga sulla temperatura, sono stati studiati i profili di temperatura delle diverse miscele estraenti in presenza di alga in concentrazione 1:20 (p/v). Miscele al di sotto del 50% di glicerolo si comportano infatti come l'acqua in quanto le molecole di glicerolo sono coordinate all'acqua mentre al di sopra del 50% abbiamo il fenomeno dell'interazione glicerolo-glicerolo e il coordinamento delle molecole di glicerolo all'acqua. È noto da studi precedenti che la molecola del glicerolo nelle miscele è stabilizzata tramite la combinazione ottimale di legami a idrogeno intra- e inter-molecolari. È ovvio che durante l'idratazione delle molecole di glicerolo, i suoi gruppi -OH formano legami a idrogeno anche con le molecole di acqua³⁶. Sebbene il glicerolo puro sia caratterizzato da un elevato grado di

associazione a causa della formazione di legami deboli intramolecolari nel 95% delle molecole, è stato rilevato che dopo diluizione con acqua le associazioni di glicerolo variano ^{37,38}.

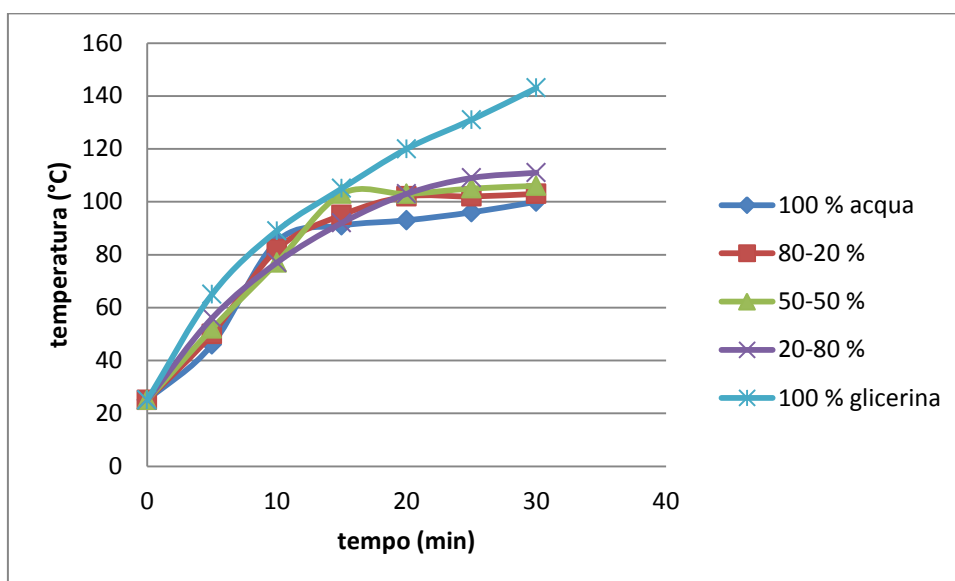


Figura 4-3: profili di temperatura di miscele a crescenti % di glicerina in presenza di alga

È importante notare come è cambiato il comportamento delle miscele ad elevate % di glicerolo rispetto alla fig.4.3 in assenza di alga. Per un migliore confronto si è strutturata la seguente tabella:

% glicerina	T miscela solvente	T miscela solvente in presenza di alga
0	102	100
20	104	103
50	108	105
80	198	111
100	143	140

Tabella 4-1: temperature delle miscele acqua:glicerolo a differenti percentuali di glicerolo in assenza e in presenza di alga

Le temperature presentano differenze intorno ai 3°C in tutte le miscele ad eccezione di quella contenente l'80% di glicerina in cui si osserva un calo di quasi 90°C. dalla tabella 4.1 si nota come la temperatura più elevata dopo 30 minuti di riscaldamento è quella della miscela al 100% di glicerina. Ciò è possibilmente dovuto al calore sottratto dal

processo di gelatinizzazione della matrice vegetale dell'alga secca, reso possibile dal riscaldamento in ambiente acquoso.

Il fenomeno di gelatinizzazione è legato a ciò che si può definire come la “cottura” dell'alga cioè alla gelatinizzazione della funzione polisaccaridica costituita per la maggior parte da alginati (20%) laminarina (11,5%) e fucoidano (6,5%). Ognuna di queste frazioni avrà una temperatura di gelatinizzazione caratteristica, perciò quella che constatiamo noi sarà una media di esse. Durante questa fase, in cui si osserva un progressivo rigonfiamento della matrice vegetale, le molecole di solvente, acqua e glicerolo, si coordinano agli alginati modificandone così l'ordine originale e causando un processo generalmente endotermico influenzato da diversi fattori:

- temperatura: la temperatura minima richiesta per iniziare il processo di gelatinizzazione è di circa 50-90°C in funzione delle frazioni polisaccaridiche presenti
- presenza di soluti, zuccheri o proteine: a particolari concentrazioni influenzano la temperatura di gelatinizzazione
- il tipo di alga: per le alghe brune il rapporto M/G (rapporto dei residui di acido mannuronico-guluronico) è dipendente dall'età e dalla profondità alla quale l'alga è cresciuta

Nel profilo di temperatura del solvente (acqua:glicerolo) in presenza di alga, l'innescò del fenomeno di gelatinizzazione si traduce in una riduzione della temperatura rispetto al profilo in assenza dell'alga stessa. È ragionevole pensare che la significativa riduzione della temperatura dopo 30 minuti nella miscela acqua:glicerolo 20:80 sia dovuta a questo effetto, per cui non si raggiungono 198°C ma solo 111°C. Lo stesso fenomeno non si genera con il solvente 100% glicerolo probabilmente per questo motivo la sua capacità di coordinare e quindi rigonfiare la matrice vegetale è inferiore a quella della miscela 20:80. La miscela 20:80 è quindi ottimale al fine di garantire con il glicerolo le temperature necessarie per la gelatinizzazione, e con l'acqua il rigonfiamento della matrice vegetale.

4.4 Prove di estrazione e determinazione di alcune componenti chimiche relative al campione di *Ascophyllum Nodosum* a diversi profili di temperatura

Dai profili di temperatura dei solventi è possibile osservare la grande influenza della temperatura sul processo estrattivo e di conseguenza, attraverso prove di estrazione, si è studiata l'influenza di questo parametro sulla concentrazione delle varie componenti chimiche investigate ovvero proteine, zuccheri, carboidrati, polifenoli e potere antiossidante. Al fine di ottenere la maggiore quantità possibile di principi attivi dalla matrice vegetale, sono state quindi effettuate prove di estrazione a caldo e a freddo per ognuna delle miscele solventi a crescente % di glicerolo. Per i fenomeni estrattivi è stato scelto un tempo di 30 minuti in quanto permette una buona idrolisi della matrice ed allo stesso tempo un consistente aumento della temperatura tale da consentire una sicura gelatinizzazione della frazione polisaccaridica. La determinazione dei componenti principali dell'*Ascophyllum nodosum* in miscele a diverso contenuto di glicerolo, ci permette di capire quanto i trattamenti termici portino ad un rigonfiamento della matrice stessa, il ruolo del glicerolo nell'idrolisi di quest'ultima e l'influenza della temperatura.

4.4.1 determinazione del contenuto di zuccheri riducenti e di carboidrati totali

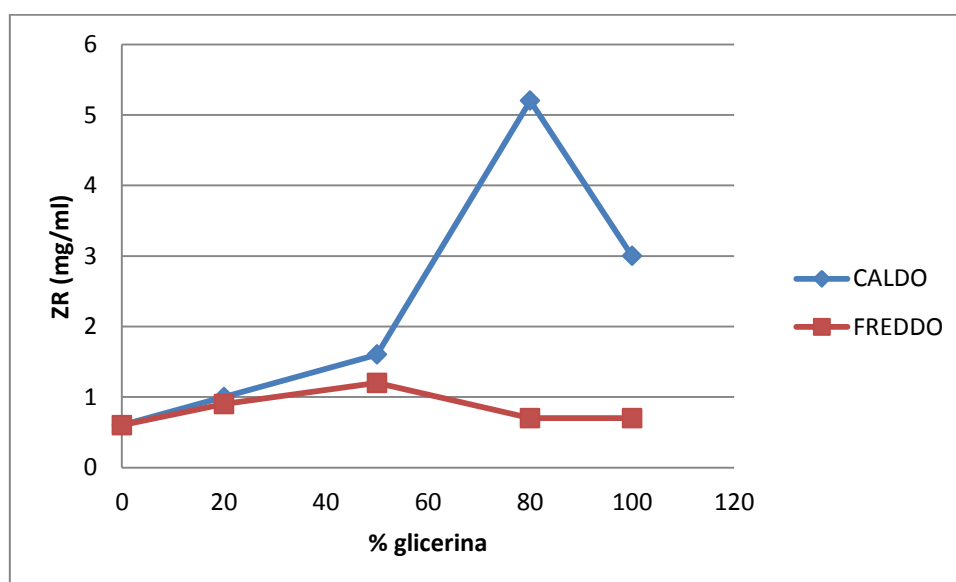


Figura 4-4: concentrazione di zuccheri riducenti espressa come media $\text{mg}_{\text{glucosio equivalente}}/\text{ml}_{\text{soluzione}}$, dopo un'estrazione di 30 minuti a diversi profili di temperatura

Dal grafico riportato in Figura 4.4 è possibile osservare come per basse o nulle percentuali di glicerolo la temperatura non influenza l'estrazione in quanto il contenuto di zuccheri riducenti risulta quasi invariato con o senza riscaldamento. Al contrario per le prove effettuate con una miscela solvente costituita prevalentemente da glicerolo, si registra un forte aumento nella concentrazione degli zuccheri riducenti. In particolare, la maggiore concentrazione di sostanza investigata si è riscontrata con il rapporto acqua:glicerolo 20:80 mentre la minima ad un valore di 100:0. Tali differenze possono essere imputabili alla capacità del solvente di rigonfiare la matrice vegetale come si è potuto osservare nei profili di temperatura. Il maggiore rigonfiamento con la miscela 20:80 riscaldata favorisce certamente tutti i processi diffusivi e la penetrazione del solvente nella matrice garantendo così una migliore estrazione delle componenti chimiche libere. L'effetto della temperatura sul processo di estrazione è certamente determinante come si osserva dalla correlazione diretta tra la quantità di zuccheri riducenti estratti in funzione della temperatura raggiunta dal solvente durante il riscaldamento in assenza di alga, riportata in figura 4.5.

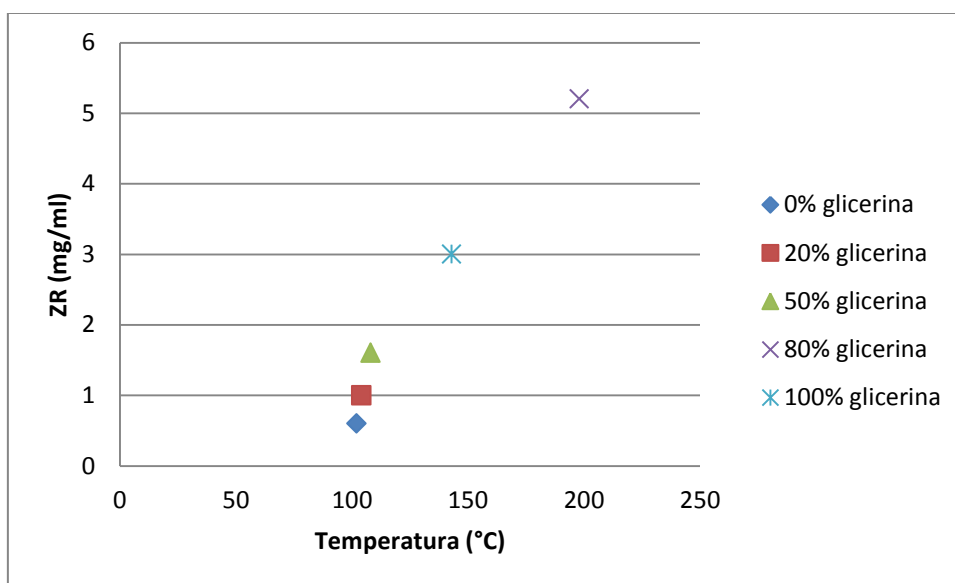


Figura 4-5: concentrazione di zuccheri riducenti espressa come media $\text{mg}_{\text{glucosio equivalente}}/\text{ml}_{\text{soluzione}}$, in funzione della temperatura delle sole miscele solventi dopo riscaldamento di 30 minuti

La relazione tra la temperatura del sistema e la concentrazione delle varie componenti chimiche rilasciate, dovuta probabilmente ad effetti di rigonfiamento della matrice e cambiamenti chimico-fisici della matrice stessa, si osserva anche nel rilascio dei carboidrati totali. (fig. 4.6)

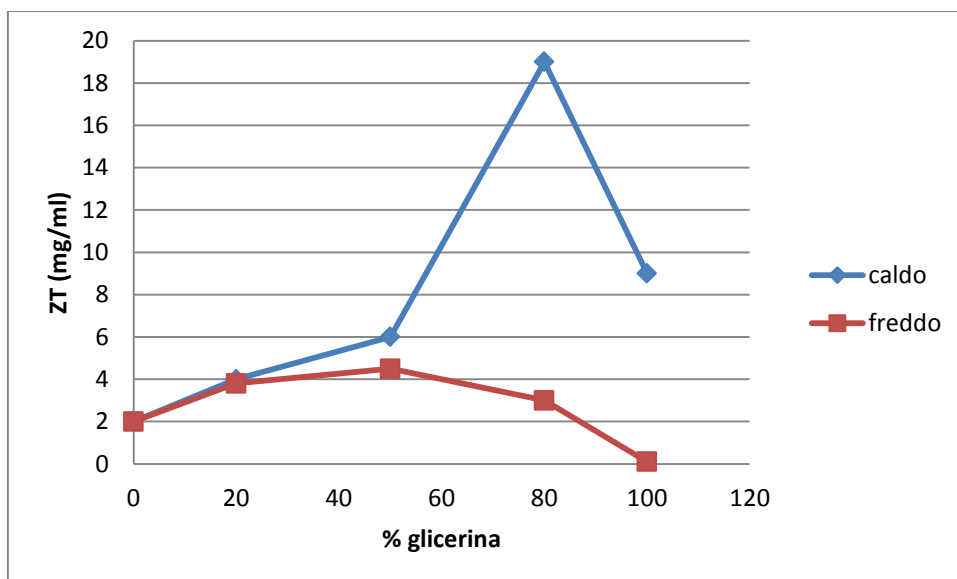


Figura 4-6: concentrazione di carboidrati totali espressa come media $\text{mg}_{\text{glucosio equivalente}}/\text{ml}_{\text{soluzione}}$, dopo un'estrazione di 30 minuti a diversi profili di temperatura

Dal grafico riportato in Figura 4.6 si può osservare che col trattamento termico della matrice vegetale, si raggiungono valori più elevati di carboidrati totali rilasciati, e che l'andamento della concentrazione per principio attivo rispetto alla glicerina è differente nei 2 profili di temperatura. A temperatura ambiente dopo 30 minuti, i valori massimi sono dati dal rapporto acqua:glicerolo 50:50, mentre il solo glicerolo riesce a estrarre quantità minime di sostanze. Ciò testimonia il ruolo-chiave svolto dai legami a idrogeno solvente-solvente e solvente-matrice nel processo estrattivo. Al contrario, quando il sistema viene gradualmente riscaldato, l'effetto sinergico della temperatura e della glicerina permettono un più elevato rilascio di carboidrati. La stessa miscela 20:80 estrae a temperatura ambiente solo 3mg/ml mentre con riscaldamento arriva ad estrarre 19mg/ml, a testimone del fatto che l'*A. Nodosum* rimane un'alga particolarmente ricca di carboidrati ed in particolare di fucoidano (11,5%), un biopolimero solforato solubile alle alte temperature. Analogamente all'andamento degli zuccheri riducenti, anche qui la miscela solvente che permette una migliore estrazione delle componenti chimiche è la 20:80 con trattamento termico, grazie alle ottimali interazioni acqua-glicerolo con l'alga bruna. A questo proposito si sono analizzate le prove di estrazione con riscaldamento riportando in grafico le concentrazioni di carboidrati rilasciati in funzione della temperatura dei solventi dopo 30 minuti

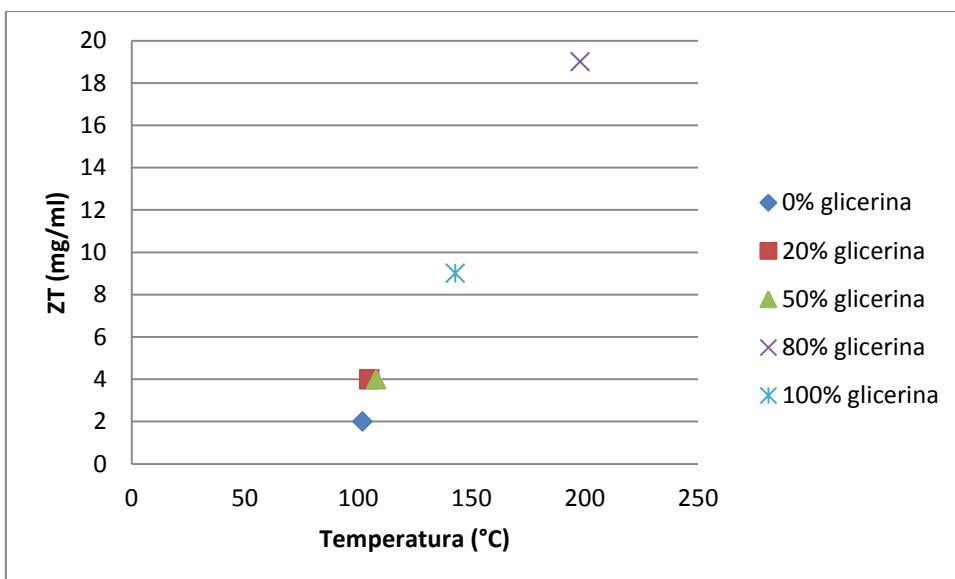


Figura 4-7: concentrazione di carboidrati totali espressa come media $\text{mg}_{\text{glucosio equivalente}}/\text{ml}_{\text{soluzione}}$, in funzione della temperatura degli estratti a caldo dopo 30 minuti

Dal grafico in figura 4.7 si può notare come all'aumentare della temperatura della miscela estraente in assenza di alga, aumenti anche il valore di frazione chimica chimica rilasciata. Ciò può essere dovuto ad un rigonfiamento della matrice per idrolisi delle catene di alginati e fucoidano presenti nell'*Ascophyllum nodosum*.

4.4.2 determinazione dei Polifenoli totali

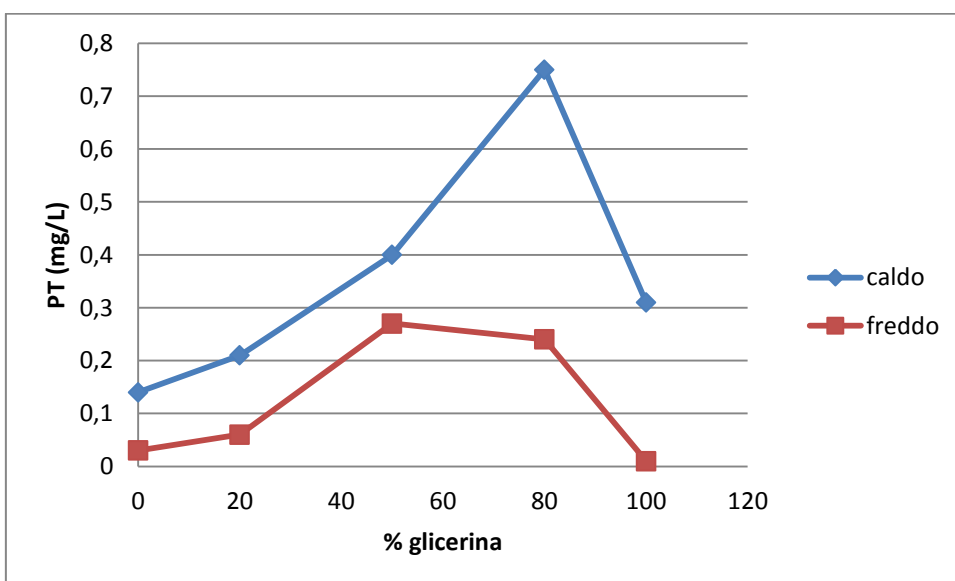


Figura 4-8: concentrazione dei polifenoli totali espressa come media $\text{mg}_{\text{catechina}}/\text{L}_{\text{soluzione}}$, dopo un'estrazione di 30 minuti a diversi profili di temperatura

Il grafico riportato in figura mostra come, una volta effettuato il trattamento termico, il rilascio aumenta notevolmente per tutti i rapporti acqua:glicerolo, ovvero da 0,03mg/L a 0,14mg/L per il 100:0, da 0,06mg/L a 0,21mg/L per il 80:20, da 0,27mg/L a 0,4 per il 50:50, da 0,24mg/L a 0,75mg/L per il 20:80 e da 0,01mg/L a 0,31mg/L per il 0:100. Invece per tutte le altre componenti della matrice vegetale analizzate, i valori di concentrazione rimangono pressochè invariati per basse percentuali di glicerolo. Per quanto riguarda le migliori prove di estrazione dei polifenoli, i valori con e senza trattamento termico seguono gli andamenti delle frazioni chimiche precedentemente analizzate, in particolare a freddo vince il rapporto 50:50 con 0,27mg/L e a caldo vince il 20:80 con 0,75mg/L di polifenoli rilasciati. Tali differenze possono essere semplicemente attribuite ad un effetto di rigonfiamento dell'alga bruna legato all'effetto sinergico di acqua e glicerolo e all'aumento di temperatura, come messo in evidenza anche dal grafico in Figura 4.9.

L'estrazione della funzione fenolica è maggiormente influenzata dalla frazione di glicerolo nella miscela estraente: a differenza degli zuccheri riducenti la quantità di polifenoli sembra che a maggiore concentrazione di glicerina, aumentano anche i polifenoli. Glicerolo influenza la solubilità probabilmente delle molecole più piccole ma non dei polisaccaridi, quindi il fenomeno qui è più marcato che nel rilascio degli zuccheri riducenti: è legato alla capacità del solvente di estrarre. Il glicerolo da solo ha il problema che non riesce ad aprire la matrice che non si rigonfia abbastanza per permettere al solvente di estrarre, questo fenomeno lo vedo sempre indipendentemente dalla temperatura. Basta anche solo un poco di rigonfiamento che le molecole piccole dei florotannini riescono a passare nel bulk della fase, mentre i polisaccaridi sono troppo grandi

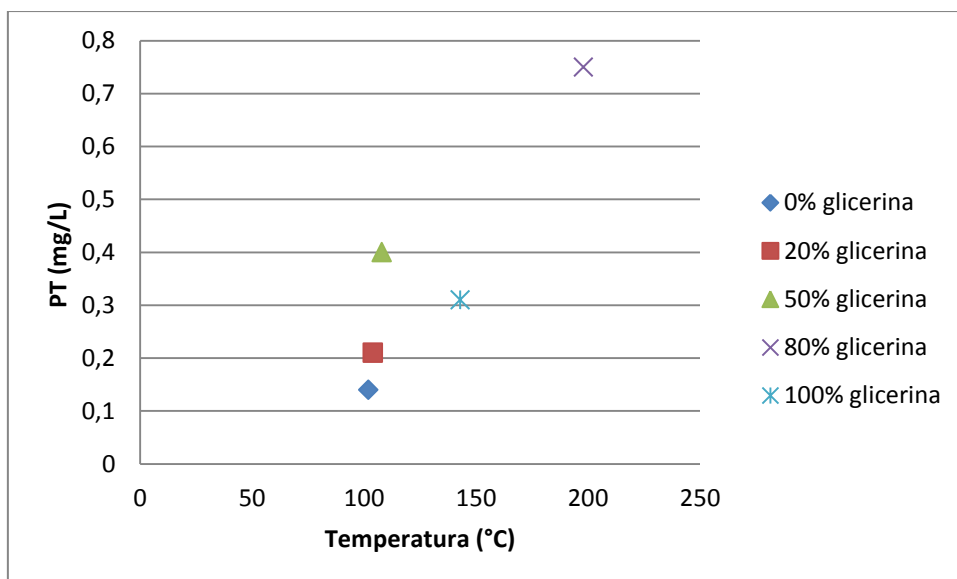


Figura 4-9: concentrazione dei polifenoli totali espressa come media $\text{mg}_{\text{catechina}}/\text{L}_{\text{soluzione}}$ in funzione della temperatura degli estratti a caldo dopo 30 minuti

Dal grafico riportato in Figura 4-8 è possibile constatare che il contenuto dei polifenoli totali per i diversi campioni caratterizzati da rapporti acqua:glicerolo differenti varia fortemente con la temperatura, da 0,03mg/L a 0,14mg/L per il rapporto 100:0, da 0,24 a 0,75 per il 20:80. Tuttavia sebbene la miscela solvente caratterizzata dal rapporto acqua:glicerolo 0:100 a 143°C estrae meno di quella 50:50 a 108°C, a dimostrazione del fatto che la percentuale di glicerina utilizzata gioca un ruolo dominante del processo estrattivo.

4.4.3 determinazione del Potere AntiOssidante totale

Una volta determinata la concentrazione di polifenoli nei diversi estratti, si è passati alla determinazione del potere antiossidante.

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

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

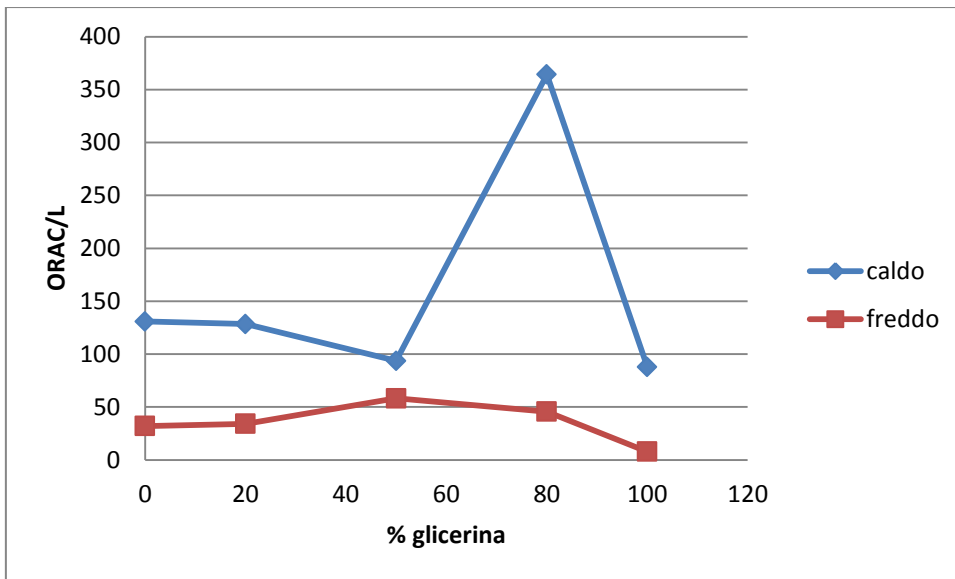


Figura 4-10: variazione indice ORAC dopo un'estrazione di 30 minuti a diversi profili di temperatura

Dal grafico riportato in Figura 4-10 è possibile notare come, per il rapporto acqua:glicerolo 20:80, si registra un forte aumento del potere antiossidante coerentemente col massimo dei polifenoli estratti riportato in figura 4.8. Tuttavia, il minimo del potere antiossidante riscontrato nell'estrazione con la miscela acqua:glicerolo 50:50 è probabilmente dovuto alla presenza di frazioni polifenoliche senza potere antiossidante o addirittura con potere pre-ossidante.

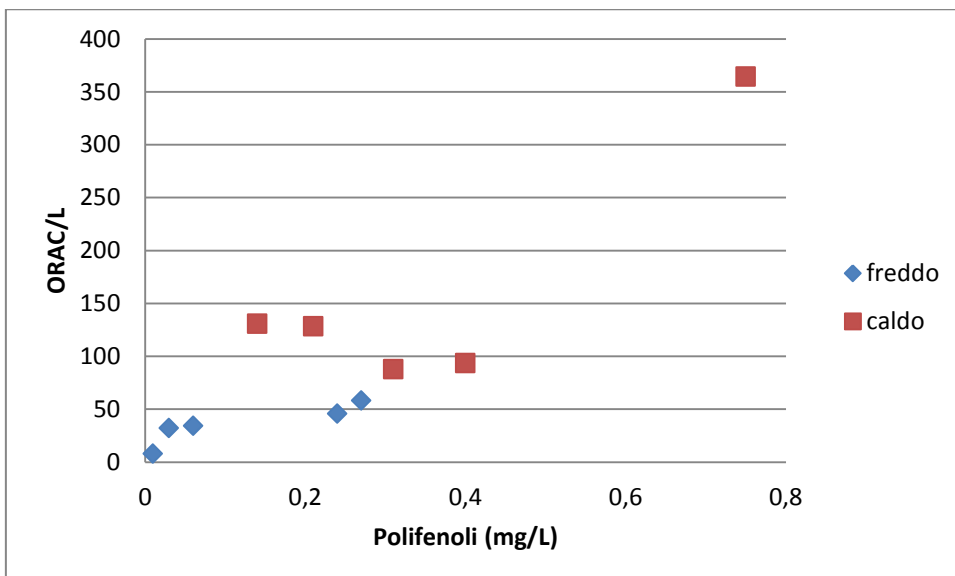


Figura 4-11: concentrazione dei polifenoli totali in funzione del potere antiossidante per tutte le miscele solventi con e senza trattamento termico

L'estrazione delle componenti fenoliche d'alto potere antiossidante non sembra essere influenzata dalla temperatura della miscela estraente (figura 4.12) ad indicare probabilmente una certa selettività nell'estrazione delle singole componenti; eccetto per la miscela 20:80 in cui i fenomeni di rigonfiamento, l'effetto del solvente e il miglioramento dei processi diffusivi ha probabilmente favorito l'estrazione di tutte le componenti fenoliche libere.

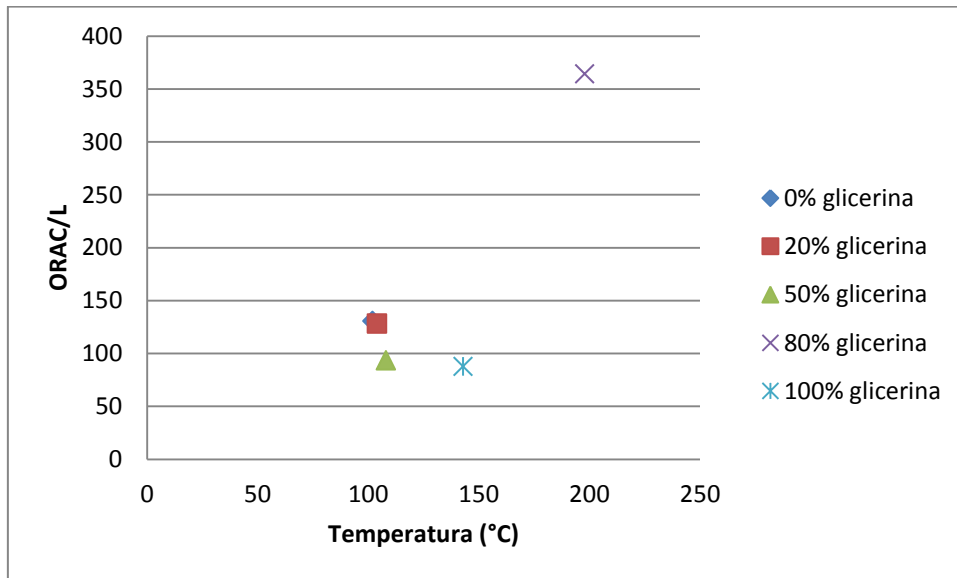


Figura 4-12: variazione indice ORAC in funzione della temperatura degli estratti a caldo dopo 30 minuti

4.4.4 determinazione delle proteine totali

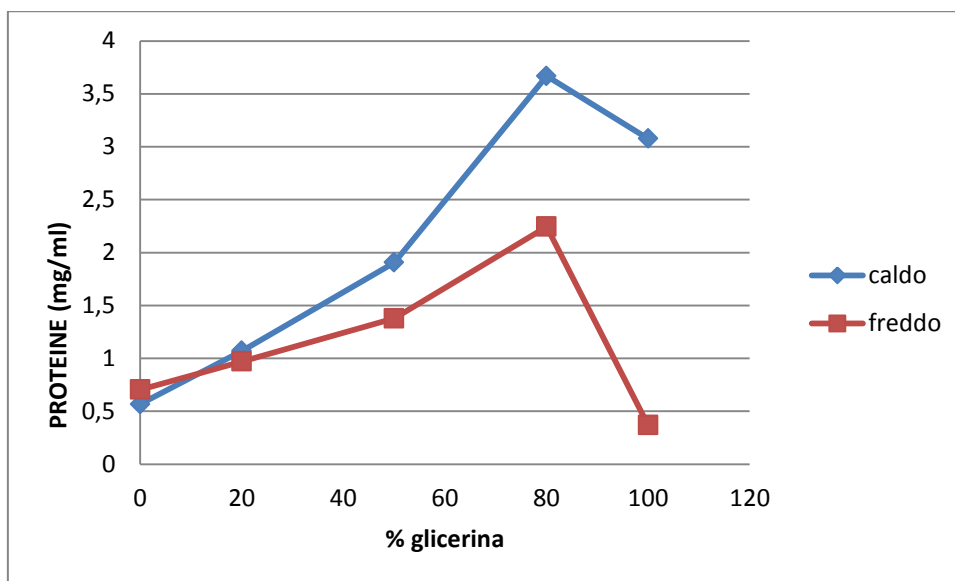


Figura 4-13: concentrazione delle proteine totali espressa come $\text{mg}_{\text{BSA protein standard}}/\text{ml}_{\text{soluzione}}$, dopo un'estrazione di 30 minuti a diversi profili di temperatura

Per quanto riguarda il contenuto proteico dell'*Ascophyllum nodosum*, gli andamenti delle concentrazioni nell'estrazione a caldo e a freddo si discostano da quelli ottenuti per gli zuccheri riducenti e i carboidrati totali, riportati nei paragrafi 4.4.1 e 4.4.2. In particolare è degno di nota il fatto che solo quando il solvente estraente è acqua pura i valori a freddo superano quelli a caldo, mentre con gli altri rapporti acqua:glicerolo la quantità di proteine rilasciata aumenta sempre col riscaldamento. Questo dato è interessante se si tiene conto del fatto che le proteine sono instabili quando sottoposte a trattamento termico ad alte temperature. Questi dati apparentemente contrastanti possono probabilmente essere spiegati da uno studio di Joan F. Back sulla accresciuta stabilità termica delle proteine in presenza di polioli. In funzione di quello che dice Back nell'articolo relativo allo studio sopracitato, allora si può supporre che anche in questo caso il glicerolo (triolo) aumenti la stabilità delle proteine algali, rallentandone il processo di denaturazione dovuto alle alte temperature. Inoltre, quanto ai valori ottenuti senza trattamento termico, dal grafico in figura 4.12 si può osservare che, diversamente dalle altre componenti chimiche dell'alga analizzate, il massimo valore di contenuto proteico è stato ottenuto col rapporto acqua:glicerolo 20:80. Il minor effetto della temperatura sembra legato al fatto che le proteine sono strettamente legate alla matrice polisaccaridica: essendo le proteine esterne alla parete cellulare, non è necessario

raggiungere alte temperature per gelatinizzare la matrice ed estrarre il principio attivo, ma basta l'azione della miscela solvente.

In seguito si sono analizzate le prove di estrazione con riscaldamento riportando in grafico le concentrazioni di carboidrati rilasciati in funzione della temperatura dei solventi dopo 30 minuti

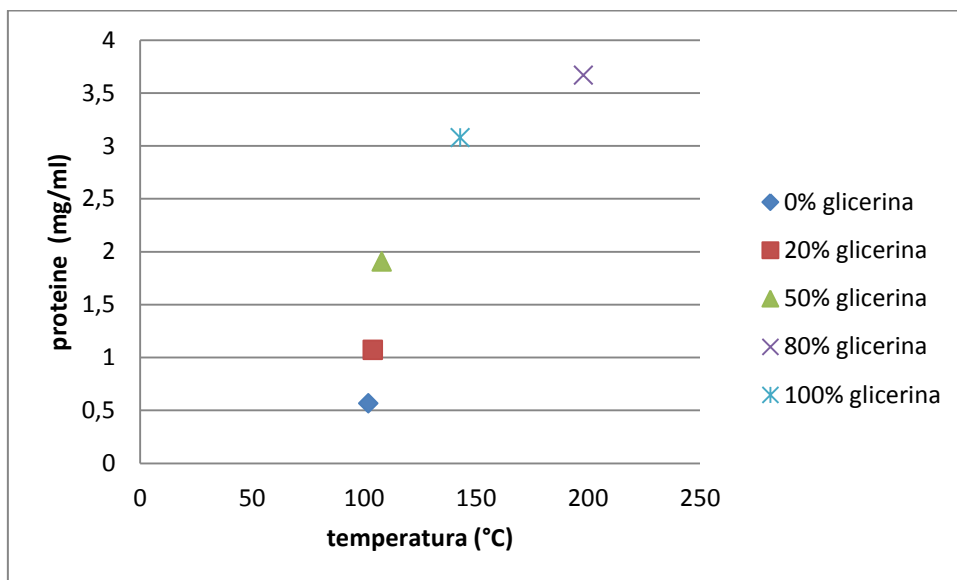


Figura 4-14: concentrazione delle proteine totali espressa come $\text{mg}_{\text{BSA protein standard}}/\text{ml}_{\text{soluzione}}$, in funzione della temperatura degli estratti a caldo dopo 30 minuti

Il grafico in figura 4.14 mostra come all'aumentare della temperatura della miscela estraente in assenza di alga, aumenti anche il valore di componente chimica rilasciata. Ciò può essere dovuto ad un rigonfiamento della matrice per idrolisi delle catene di acido alginico contenuto nell'*Ascophyllum Nodosum*.

4.5 studio di differenti trattamenti termici: effetto del gradiente di temperatura sul rilascio del colore

Dopo aver stabilito il rapporto ottimale alga:solvente e la migliore miscela solvente estraente, allo scopo di ottenere la massima concentrazione possibile di principio attivo nell'estratto, si è studiata la tipologia ottimale di trattamento termico. Dai grafici riportati nei paragrafi precedenti risulta che fornire energia al sistema sotto forma di calore è necessario per una buona estrazione, pertanto si sono studiati due differenti metodi di riscaldamento necessari alla gelatinizzazione della matrice vegetale.

Dai profili di temperatura dei solventi e dallo studio dei vari principi attivi contenuti nell'alga bruna è emersa la grande dipendenza della concentrazione di questi ultimi dalla temperatura del sistema, la quale varia molto a seconda della miscela estraente utilizzata. Si è notata una correlazione diretta in cui gli estratti che presentavano un maggiore contenuto di nutrienti erano anche quelli più scuri. Pertanto si è deciso d'investigarne il comportamento nel tempo analizzando allo spettrofotometro quanto colore viene rilasciato nel tempo in estrazioni successive dalla matrice vegetale. Al fine di studiare il rilascio delle componenti colorate dell'*A. Nodosum*, per le misurazioni di assorbanza si è considerato un intervallo di lunghezze d'onda tra 350nm e 650nm. Per ciascuna delle miscele utilizzate sono state effettuate 4 estrazioni successive della stessa matrice vegetale che è stata sottoposta quindi ogni volta ad un nuovo processo estrattivo.

4.5.1 trattamento termico con gradiente di temperatura

Al fine di investigare il processo di gelatinizzazione della matrice algale, sono state effettuate mediante metodi spettrofotometrici le analisi del rilascio nel tempo delle frazioni chimiche colorate. Se n'è studiata la variazione rispetto alla frazione in massa di glicerina presente nella miscela estraente nella prima estrazione e nelle 3 successive. Gli spettri risultanti, nonostante le differenti condizioni operative elencate sopra, presentano un profilo analogo a quello riportato in figura 4.15:

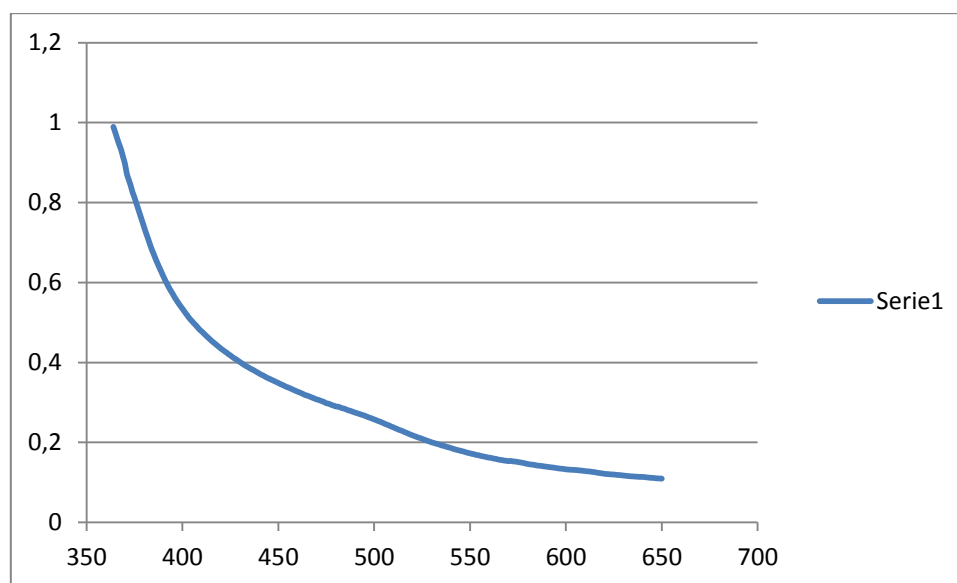


Figura 4-15: spettro UV-VIS ottenuto dopo 30minuti con la miscela acqua:glicerolo 100:0 e diluizione 1:100

Lo spettro riportato nella figura 4.15 è il risultato della compresenza di vari pigmenti presenti nelle alghe brune e che assorbono la luce a diverse lunghezze d'onda, dalla tipica fucoxantina che presenta un picco nel range 510-525nm, alla violaxantina che assorbe nel viola, ai carotenoidi che assorbono alle lunghezze d'onda del rosso.

La cinetica di estrazione è stata determinata scegliendo una lunghezza d'onda di 400nm che potesse rappresentare la media del colore dell'estratto dell'alga bruna.

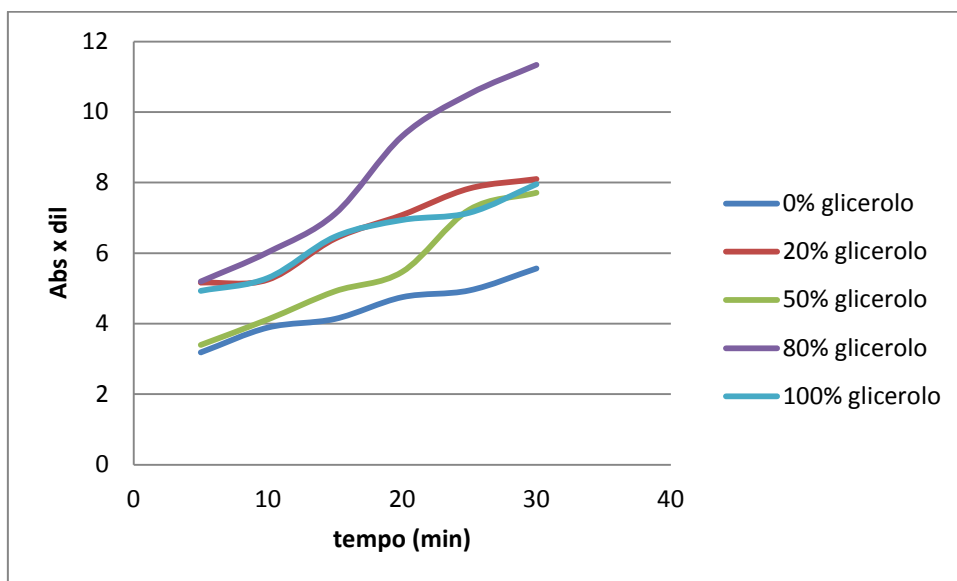


Figura 4-16: cinetica di rilascio delle frazioni colorate nella prima estrazione della matrice vegetale (diluizione 1:100) con miscela solvente a differenti percentuali di glicerolo alla lunghezza d'onda di 400nm. Le assorbanze sperimentali sono state moltiplicate per il fattore di diluizione.

Dal grafico riportato in figura 4.16 si può osservare che l'assorbanza relativa al rilascio delle frazioni colorate non aumenta proporzionalmente alla percentuale di glicerolo presente nella miscela estraente, ma il 20:80 risulta essere il solvente migliore nella prima estrazione, in accordo con i profili di temperatura investigati nei paragrafi precedenti. È interessante notare come il 80:20 si distingue per l'elevato valore di assorbanza, subito dietro al 20:80. Ciò può essere probabilmente riconducibile alle interazioni solvente-solvente e matrice-solvente e non al contributo della temperatura alla gelatinizzazione dell'alga. A testimone di quanto appena detto, la miscela solvente al 100% di glicerolo che raggiunge temperature maggiori, presenta assorbanze non particolarmente elevate.

Lo stesso procedimento è stato applicato alla seconda estrazione, i cui risultati sono riportati nel grafico seguente (fig 4.17)

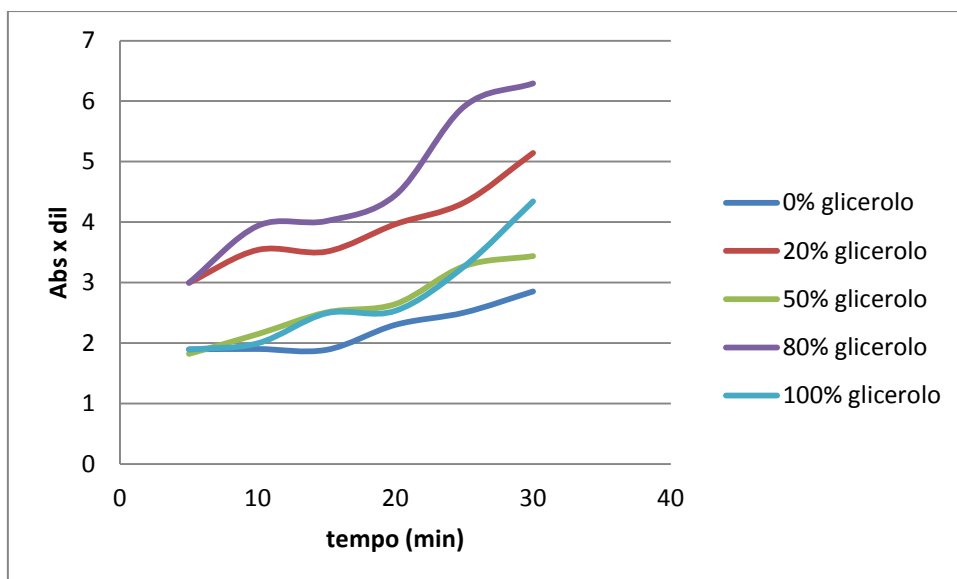


Figura 4-17: cinetica di rilascio delle frazioni colorate nella seconda estrazione della matrice vegetale (diluizione 1:50) con miscela solvente a differenti percentuali di glicerolo alla lunghezza d'onda di 400nm

Il grafico riportato in figura 4.17 mostra che la miscela estraente 80:20 riesce a estrarre un'elevata quantità di pigmenti in estrazioni successive alla prima, nonostante la migliore rimanga la 20:80. Le altre miscele si assestano invece su valori più o meno simili, con la sola acqua che probabilmente estrae poco poiché l'effetto di coordinazione del solvente alla matrice non è sufficiente a estrarre i principi attivi, ma servono temperature più alte per gelatinizzare la matrice vegetale.

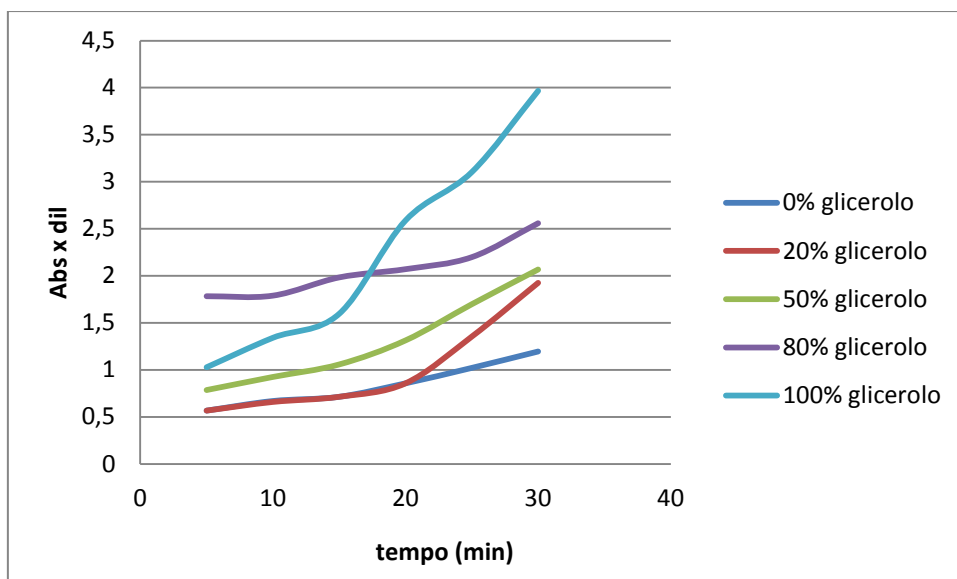


Figura 4-18: cinetica di rilascio delle frazioni colorate nella terza estrazione della matrice vegetale (diluizione 1:10) con miscela solvente a differenti percentuali di glicerolo alla lunghezza d'onda di 400nm

Nella terza estrazione si osserva un aumento del rilascio del colore particolarmente elevato nel tempo con la miscela costituita solo da glicerina, dovuto probabilmente ad un aumento della temperatura e alla conseguente gelatinizzazione della matrice vegetale. È proprio l'aumento di temperatura dovuto alla composizione delle miscele che gioca un ruolo chiave nel ampliare la rete della matrice vegetale e permettere l'estrazione delle frazioni colorate. Infatti, nonostante il glicerolo da solo sia un cattivo solvente in quanto non è sufficientemente piccolo e polare per coordinare il substrato vegetale, la miscela costituita solamente da glicerolo è quella che ha estratto maggiore quantità di principio attivo, oltre alla 20:80 di cui si è già parlato.

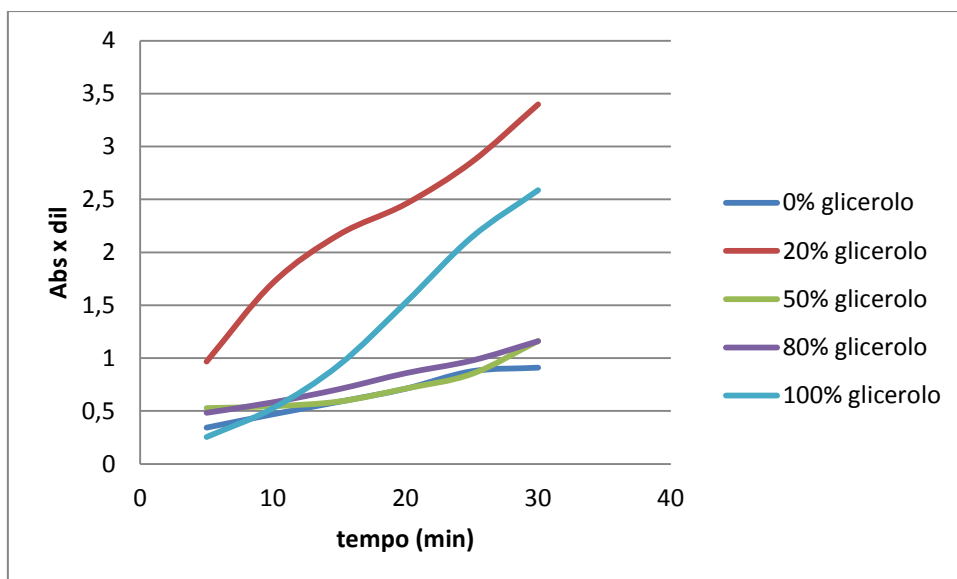


Figura 4-19: cinetica di rilascio delle frazioni colorate nella quarta estrazione della matrice vegetale (diluizione 1:10) con miscela solvente a differenti percentuali di glicerolo alla lunghezza d'onda di 400nm

Nella quarta estrazione le assorbanze sono ragionevolmente più basse come da aspettativa, tuttavia la miscela 20:80 presenta una prestazione peggiore della 80:20. A testimone del grande effetto della temperatura sul fenomeno estrattivo, la miscela al 100% di glicerina presenta fra i risultati più alti.

4.5.2 trattamento termico a temperatura costante: cottura dell'alga

Al fine di studiare l'influenza della temperatura sul processo di gelatinizzazione dell'alga e sul conseguente rilascio delle frazioni chimiche e del colore, sono state effettuate prove di estrazione a 50°C e a 100°C a differenti rapporti acqua:glicerolo.

La metodica utilizzata è la medesima che è stata descritta nel paragrafo precedente, tuttavia diversa è la tipologia di trattamento termico, a temperatura costante. Si tratta infatti di inserire l'alga bruna nella miscela solvente una volta che quest'ultima ha raggiunto la temperatura desiderata, così da letteralmente "cuocere" la matrice vegetale.

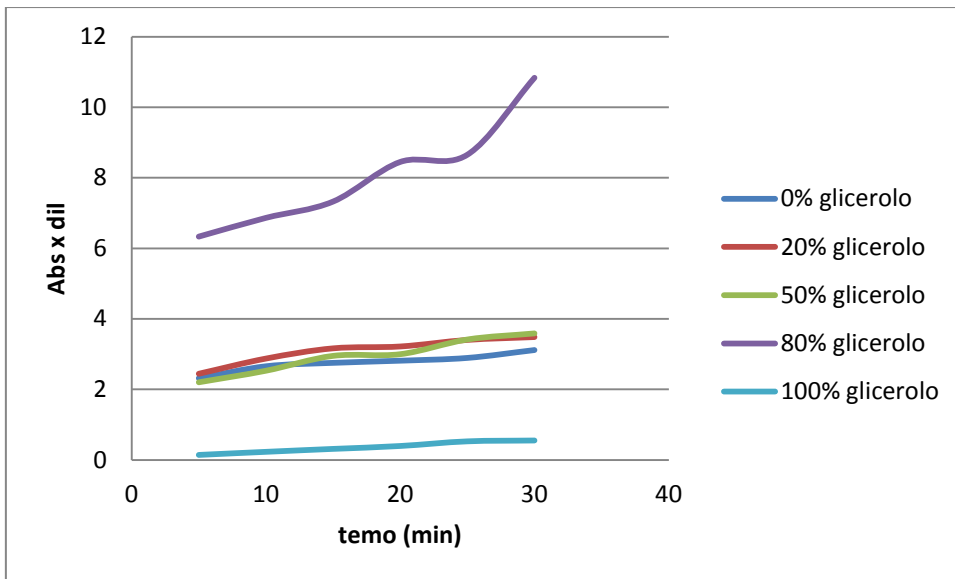


Figura 4-20: cinetica di rilascio delle frazioni colorate alla temperatura di 50°C della matrice vegetale con miscele a diverse percentuali di glicerolo

Dal grafico riportato in figura 4.20 si può notare come gli andamenti del rilascio di frazioni colorate siano analoghi per quasi tutte le miscele solventi, eccetto la 20:80 che presenta i risultati migliori e quella costituita interamente da glicerina che invece a 50°C non riesce a coordinare la matrice e ad ampliarla.

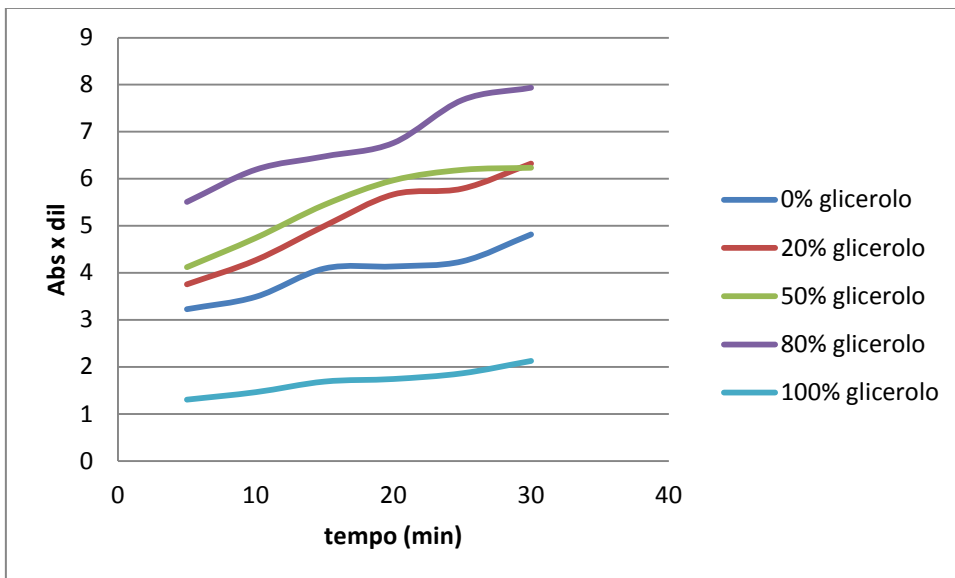


Figura 4-21: cinetica di rilascio delle frazioni colorate alla temperatura di 100°C della matrice vegetale con miscele a diverse percentuali di glicerolo

Confrontando i dati ottenuti dai differenti trattamenti termici a cui è stata sottoposta la matrice vegetale, si può dedurre che per la semplice cottura dell'alga bruna a temperatura costante si hanno recuperi inferiori. Tale fenomeno è stato attribuito ad una

rapida gelificazione superficiale quando la matrice viene immersa nel solvente bollente che ne pregiudica il trasporto diffusivo del solvente dall'esterno verso l'interno della matrice gelificata e viceversa. Pertanto il trattamento termico ottimale consiste nella somministrazione di calore al sistema alga:solvente attraverso un graduale aumento della temperatura.

4.6 Studio dell'influenza di differenti trattamenti enzimatici nella determinazione delle componenti chimiche dell'*Ascophyllum Nodosum* trattato termicamente

La determinazione delle rese di rilascio dei vari componenti in soluzione acquosa, ha messo in evidenza l'importanza dei trattamenti meccanici ed enzimatici favorendo la disgregazione della matrice stessa con conseguente rilascio di sostanze solubili in acqua.

4.6.1 determinazione dell'attività alginasica di enzimi commerciali e percolati

Al fine di ottenere un migliore rilascio di principi attivi, si è valutato l'utilizzo di preparati enzimatici che vadano ad agire selettivamente sulla struttura della matrice vegetale e ne è stata investigata la capacità di disgregare le catene di acido alginico in acidi mannuronico e guluronico. Data la somiglianza strutturale tra acido alginico e pectina, si può ritenere ragionevole che enzimi ad attività pectinasica presentino anche attività secondarie di tipo alginasico. Per questo motivo è stata verificata l'eventuale presenza di attività alginasica sia percolati derivati dalla crescita di fungo *Pleurotus ostreatus* già presenti nel laboratorio di biotecnologie del Dipartimento di Chimica Industriale "Toso Montanari" che in preparati industriali da tempo utilizzati nel laboratorio per processi di bioliquefazione di matrici vegetali. Nel primo caso si tratta di tratta di enzimi prodotti da un mix di scarti alimentari quali crusca di grano, paglia di grano, graspi d'uva e vinaccioli. Questi substrati vengono sottoposti ad un processo di Fermentazione in Stato Solido (SSF) in presenza del fungo *P. ostreatus* che crescendo in essi, produce una vasta gamma di enzimi esocellulari tra cui Cellulasi, Xilanasi, Laccasi, Pectinasi, Arilesterasi e Alginasi.

	pectinasi	percolato
Attività alginasica ($\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$)	76,5	48,4

Tabella 4-2: attività alginasica di preparati enzimatici

4.6.2 determinazione del contenuto di zuccheri riducenti

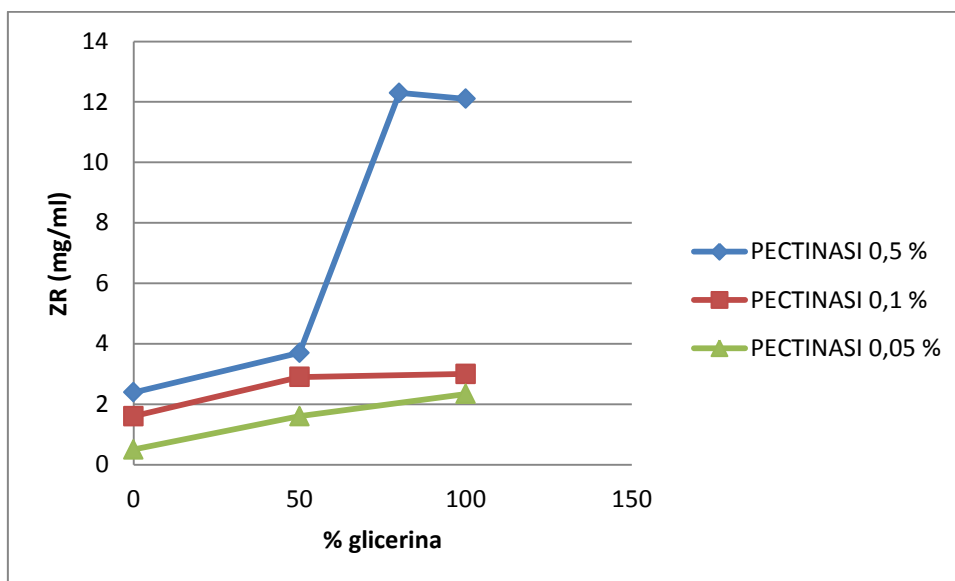


Figura 4-22: concentrazione di zuccheri riducenti espressa come media $\text{mg}_{\text{glucosio equivalente}}/\text{ml}_{\text{soluzione}}$, dopo un'estrazione di 30 minuti per campioni trattati enzimaticamente

Dal grafico riportato in figura 4.22 si può osservare che la concentrazione di zuccheri riducenti aumenta all'aumentare della percentuale di glicerina presente nella miscela solvente. Nonostante l'azione enzimatica nel degradare l'alga bruna, la sola acqua di reazione non permette una buona estrazione con soli 2,39mg/ml di frazione investigata, mentre una miscela costituita totalmente da glicerina riesce a estrarre ben 12,1mg/ml. Dai risultati delle prove di estrazione si può dedurre che la maggiore concentrazione di zuccheri riducenti liberati corrisponde ad un rapporto acqua:glicerolo 20:80, in accordo coi dati sperimentali riportati nei paragrafi precedenti. È interessante il grande aumento delle frazioni liberate con la miscela 100% glicerolo e 0,5% di pectinasi, probabilmente dovuto all'effetto sinergico dell'enzima e della glicerina, oltre al fatto che percentuali minori di enzima non degradano sufficientemente durante la cinetica di reazione la parete vegetale e non consentono quindi al glicerolo di coordinare le frazioni polisaccaridiche.

4.6.3 determinazione dei carboidrati totali

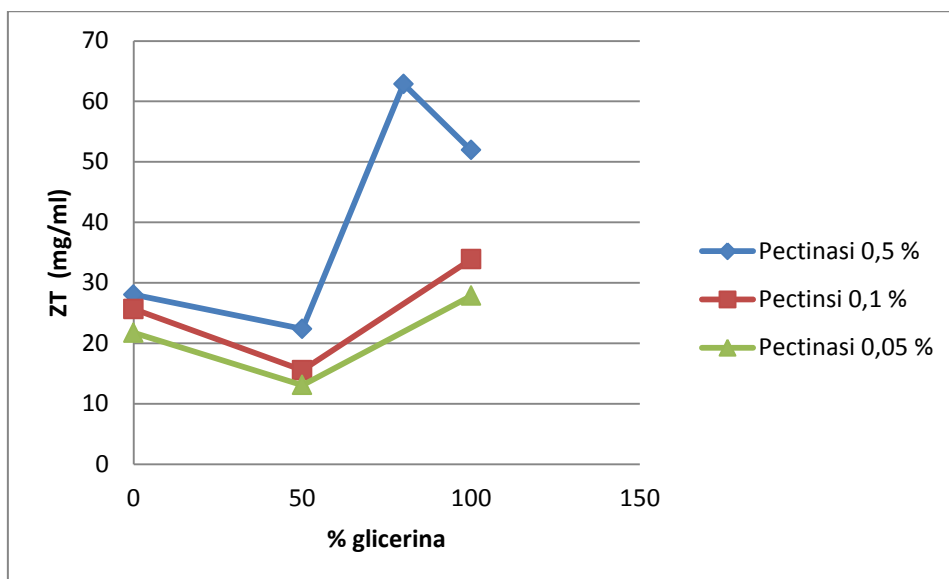


Figura 4-23: concentrazione di carboidrati totali espressa come media $\text{mg}_{\text{glucosio equivalente}}/\text{ml}_{\text{soluzione}}$, dopo un'estrazione di 30 minuti di campioni sottoposti a trattamento enzimatico

Il grafico riportato in figura 4-23 mostra come la concentrazione di principio attivo estratta con la miscela 50:50 sia notevolmente minore dei valori ottenuti con le altre miscele. Il rilascio delle frazioni chimiche dipende dall'interazione delle stesse con le miscele del solvente ma è soprattutto legato alle condizioni di pre-trattamento termo-meccanico utilizzate così come abbiamo visto nei paragrafi precedenti. In accordo con le altre analisi effettuate la miscela solvente ottimale si è dimostrata essere quella con rapporto acqua:glicerina 20:80, la cui egregia azione estraente è facilmente attribuibile alle forze d'interazione matrice-solvente, soluto-solvente e solvente-solvente così come alle condizioni di temperatura raggiunte durante lo stadio termo-meccanico.

4.6.4 determinazione dei Polifenoli totali

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

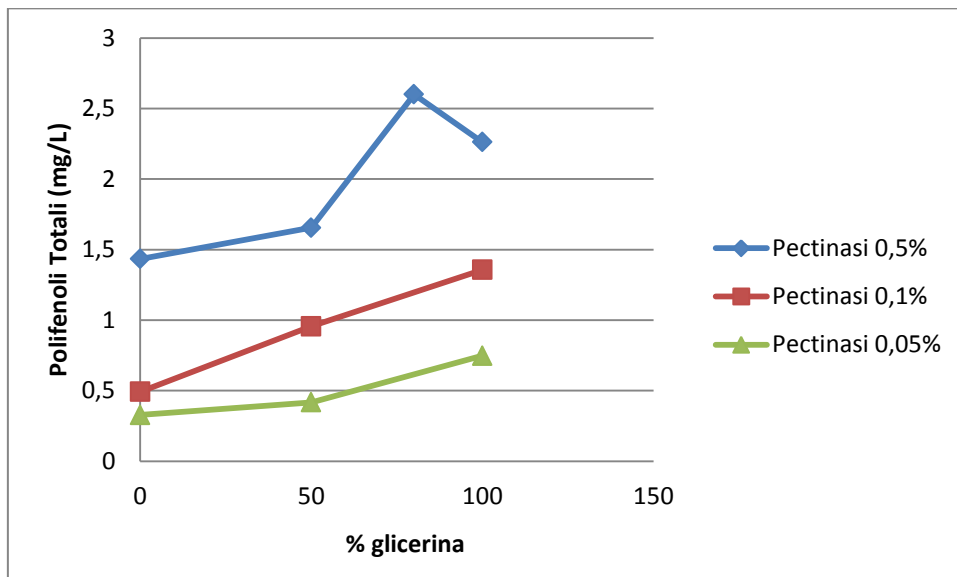


Figura 4-24: concentrazione dei polifenoli totali espressa come media $\text{mg}_{\text{catechina}}/\text{L}_{\text{soluzione}}$ in funzione della temperatura degli estratti a caldo dopo 30 minuti

Il grafico in figura 4-24 mostra come, aumentando di un fattore 10 la percentuale di enzima utilizzato, aumentano enormemente di conseguenza le concentrazioni di polifenoli estratti. La miscela al 100% di glicerolo si dimostra ancora essere un solvente estraente più efficace dall'acqua, come si vede dai dati sperimentali (1.4334mg/L versus 2,2619mg/L), probabilmente grazie alla maggiore solubilità dei florotannini in glicerolo piuttosto che in acqua e alle alte temperature raggiunte. Tuttavia la miscela solvente con rapporto acqua:glicerolo 20:80 risulta estrarre una quantità maggiore di polifenoli, a dimostrazione del fatto che una minima quantità di acqua è necessaria all'idrolisi delle catene di acido mannuronico e guluronico. La pectinasi commerciale utilizzata poi contribuisce all'estrazione del principio attivo andando ad agire selettivamente sulla matrice algale.

4.6.5 determinazione del Potere AntiOssidante totale

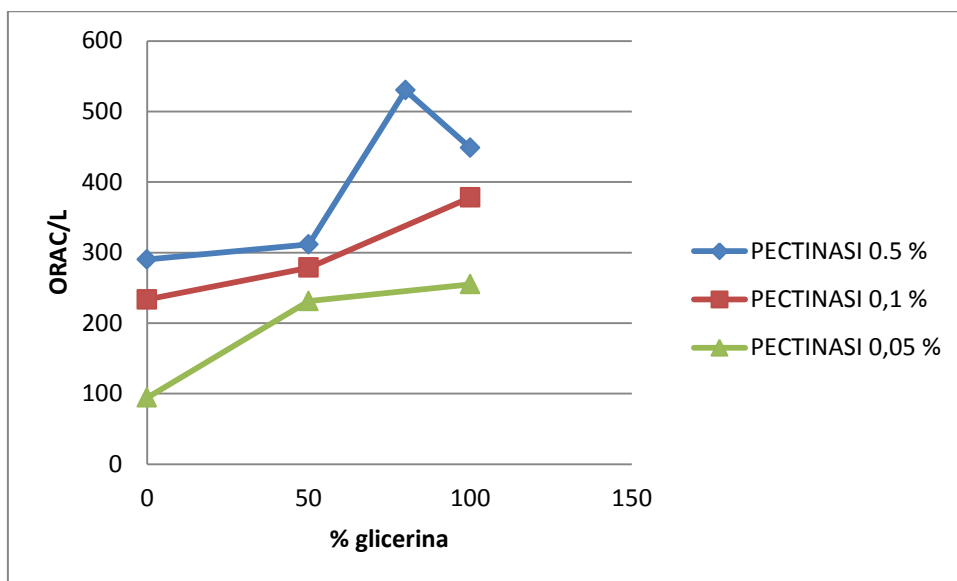


Figura 4-25: variazione indice ORAC dopo un'estrazione di 30 minuti a diversi profili di temperatura

Dal grafico riportato in figura 4.25 si può constatare che i dati relativi al potere antiossidante sono coerenti con quelli ottenuti per i polifenoli ad indicare come il potere antiossidante sia prevalentemente legato a questa frazione. Inoltre, è possibile notare come le differenze che si riscontrano negli andamenti dei vari campioni sottoposti a trattamento meccanico, termico ed enzimatico siano attribuibili ad una diversa percentuale di enzima utilizzato nella prova di estrazione. Il contenuto di principio attivo infatti è direttamente proporzionale alla quantità di estratto enzimatico utilizzato:, con valori di 94,2 ORAC/L, 233,5 ORAC/L e 290,4 ORAC/L rispettivamente per 0,05%, 0,1% e 0,5% di pectinasi per il campione con rapporto 100:0.

4.6.6 determinazione delle proteine totali

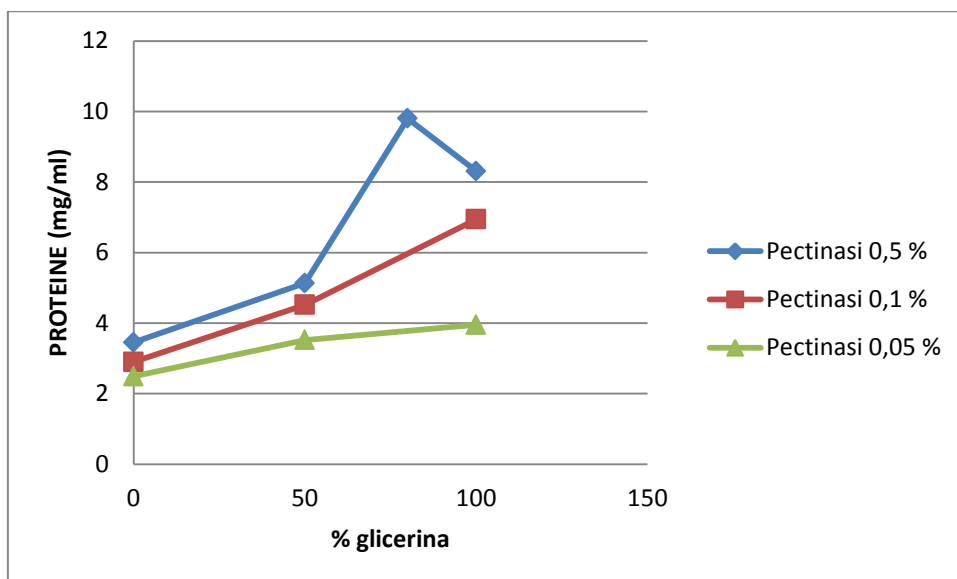


Figura 4-26: concentrazione delle proteine totali espressa come $\text{mg}_{\text{BSA protein standard}}/\text{ml}_{\text{soluzione}}$, dopo un'estrazione di 30 minuti a diversi profili di temperatura

Nella determinazione del rilascio di proteine totali l'enzima gioca un ruolo meno importante, poiché come si può notare dal grafico (fig 4.26) i valori a differenti percentuali di pectinasi sono molto vicini. Ciò significa che l'azione idrolitica sulla matrice vegetale non è strettamente necessaria all'estrazione di queste componenti, in accordo coi risultati ottenuti senza enzima anche perché le proteine sono situate all'esterno della parte cellulare e sono più facilmente estraibili. I valori di concentrazione maggiori riscontrati nell'estrazione con il solo glicerolo piuttosto che con l'acqua possono essere attribuiti alla natura delle proteine presenti e dalla loro capacità di essere solubilizzate dal glicerolo.

4.7 studio dell'attività alginasica di diversi enzimi in prospettiva di un futuro sviluppo industriale

E' stata ricercata attività alginasica in un estratto commerciale Fungamyl Super AX e confrontato con un preparato enzimatico ricco di alginato liasi.

Come sistema enzimatico sono stati utilizzati il ALGINATO LIASI e Fungamyl Super AX ad una concentrazione relativa pari allo 0,5% p/p dell'alga bruna.

	FUNGAMYL SUPER AX	ALGINATO LIASI
Attività alginasica ($\mu\text{mol/g} \cdot \text{min}$)	82,0	319,2

Tabella 4-3: attività enzimatiche dell'enzima Fungamyl Super AX ed Alginato-liasi

Si è deciso di trattare il campione separatamente con due diversi enzimi, Fungamyl Super AX e Alginato liase le cui attività caratteristiche sono riportate in Tabella 4-3.

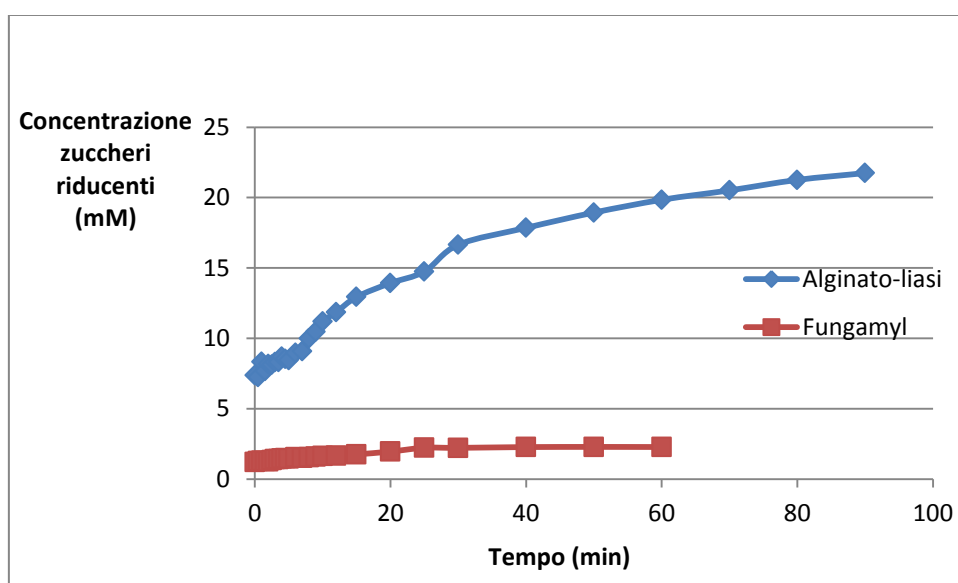


Figura 4-27: Rilascio nel tempo di zuccheri riducenti

Il tempo zero di tutte le cinetiche coincide con l'aggiunta degli estratti enzimatici dopo il trattamento termico durato 30 minuti. Dai dati si può osservare che l'alginato liasi presenta una capacità di degradare l'acido alginico molto maggiore del preparato commerciale in cui l'alginasi è un'attività secondaria.

5 CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi, si è valutata la possibilità valorizzare matrici vegetali mediante trattamenti biocatalitici; in particolare l'attenzione è stata focalizzata sull'alga bruna *Ascophyllum Nodosum*.

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

Da tali prove è risultato che il rapporto ottimale di lavorazione è 1:20 in quanto, in queste condizioni, non sono stati riscontrati problemi di saturazione del sistema, che impedirebbero il trattamento meccanico della matrice vegetale, e oltretutto l'estrazione ha portato a buoni risultati in termini di concentrazioni di principi attivi.

È stato inoltre valutato l'utilizzo di glicerolo in qualità di solvente estraente allo scopo di massimizzare l'estrazione dei principi attivi. A questo fine sono state studiate miscele acqua:glicerolo con diverse % di glicerolo, ed in particolare si è investigato l'effetto della temperatura sulle miscele.

I profili di temperatura mostrano come il riscaldamento in ambiente acquoso permette all'alga bruna di agire come volano termico e sottrarre calore al sistema, provocando la gelatinizzazione della frazione polisaccaridica costituita principalmente da alginati, laminarina e fucooidano. Dai risultati delle determinazioni delle varie componenti si può dedurre che il rapporto ottimale acqua:glicerolo è il 20:80 a testimone del fatto che una minima quantità di acqua è necessaria al fenomeno di gelatinizzazione e il glicerolo si conferma essere un ottimo solvente estraente.

Successivamente sono stati studiati differenti trattamenti termici al fine di valutare quale tipologia porta ad una maggiore concentrazione di principio attivo nell'estratto. Si è potuto osservare quindi che il trattamento termico con gradiente di temperatura si è dimostrato essere migliore della semplice "cottura" dell'alga (trattamento termico a temperatura costante), probabilmente perché in quest'ultimo caso si assiste ad una gelatinizzazione solo superficiale dell'alga.

La miscela estraente acqua:glicerolo in rapporto 20:80 ha portato ad un ottimale rilascio di frazioni chimiche anche in presenza dell'enzima idrolitico Pectinasi.

In un ottica di industrializzazione dello studio si è valutato inoltre l'utilizzo dell'enzima alginato liasi: l'attività alginasica di quest'ultimo enzima si è rivelata ovviamente essere maggiore di quella della Pectinasi, tuttavia il costo dell'enzima è proibitivo a livello industriale.

L'alga bruna *Ascophyllum Nodosum* si presta quindi ad una valorizzazione chimica delle matrici. L'alto contenuto in zuccheri ed il significativo contenuto in biofenoli può rendere queste matrici interessanti per sviluppare ingredienti per il settore cosmetico ed alimentare.

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

5 BIBLIOGRAFIA

- ¹ Malpeli F., “I Sistemi di gestione ambientale: certificazioni ISO 14001 e registrazioni emas”, Ingegneria Sanitaria ambientale 2002/2003
- ² Bioraffineria, l’alternativa alla petrolchimica, Leonardo Setti (il divulgatore)
- ³ Elena Ibanez* and Alejandro Cifuentes, “Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients”
- ⁴ Fujimoto 1990; Matsukawa et al. 1997
- ⁵ Le Tour et al 1998
- ⁶ la bioliquefazione molecolare, Leonardo Setti (il divulgatore)
- ⁷ www.sollevanteestetica.com
- ⁸ www.nordicwalkingvicenza.com
- ⁹ Elena Ibanez* and Alejandro Cifuentes, “Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients”
- ¹⁰ structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides
- ¹¹ Tabella 4; Arasaki e Arasaki 1983; Rasmussen e Morrissey 2007
- ¹² tesi di dottorato, Cremasco, “Studi sulla capacità sequestrante di polimeri e biopolimeri nei confronti di ioni metallici”
- ¹³ Berteau e Mulloy 2003
- ¹⁴ Berteau e Mulloy 2003; Li et al. 2005; Zhao et al. 2008
- ¹⁵ <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/plants/cellwall.html>
- ¹⁶ reviewed in Gross, 1999
- ¹⁷ Arnold and Targett, 2002
- ¹⁸ Brown algal phlorotannis, Riitta koivitto
- ¹⁹ Larsen e Haug 1958
- ²⁰ Haugan e Liaaen-Jensen, 1994
- ²¹ structure of the cell walls of marine algae

- ²² the occurrence and cellular significance of physodes in brown algae
- ²³ Rohit Sharma, Yusuf Chisti, Uttam Chand Banerjee, "Production, purification, characterization, and applications of lipases", *Biotechnology Advances*, 19, 627–662, 2001
- ²⁴ Han-Gyol Shin, Young-Min Choi, Ho-Kyoung Kim, Youn-Chul Ryu, Sang-Hoon Lee, Byoung-Chul Kim, "Tenderization and fragmentation of myofibrillar proteins in bovine longissimus dorsi muscle using proteolytic extract from *Sarcodon aspratu*", Article in Press, doi:10.1016/j.lwt.2007.08.019
- ²⁵ http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.15
- ²⁶ http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.4.4.4.
http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.4.4.5.
http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.4.4.10.
http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.4.2.1.
http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.4.4.1.
- ²⁷ Chaplin M.F., Kennedy J.F., Colorimetric assay, *Carbohydrate analysis*, 1986 Mecozzi M., Acquistucci R., Amici M., Cardilli D., Improvement of an ultrasound assisted method for the analysis of total carbohydrate in environmental and food samples, *Ultrasonics Sonochemistry* 9, 219-223, 2002
- ²⁸ Zanichelli D., "Processi di Biorefining per l'estrazione di secondary chemical building blocks da sottoprodotti dell'agroindustria", tesi di dottorato (2008)
- ²⁹ Bailey M.J., Biely P., Poutanen K., "Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity", *Journal of Biotechnology*, 23, 257-270, 1992
- ³⁰ Bradford, M. M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry* 72 (1976) 248-254
- ³¹ Di Stefano, Cravero, Gentilini, Vignevini, 1/2, 47-52, 1998
- ³² Donglin Zhang, Yasunori Hamazu, "Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and its antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking", *Food Chemistry*, 88, 2004, 503-509
- ³³ Chaplin M.F., Kennedy J.F., Colorimetric assay, *Carbohydrate analysis*, 1986 Mecozzi M., Acquistucci R., Amici M., Cardilli D., Improvement of an ultrasound assisted method for the analysis of total carbohydrate in environmental and food samples, *Ultrasonics Sonochemistry* 9, 219-223, 2002

³⁴ Dubois M, Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substances, Division of Biochemistry, University of Minnesota

³⁵ A. Benamotz, M. Avron, The role of glycerol in the osmotic regulation of the halophilic alga *Dunaliella parva*, *Plant Physiol.* 51 (1973) 875–878.

³⁶ Volume properties of liquid mixture of water + glycerol over the temperature range from 278.15 to 348.15 K at atmospheric pressure Gennadiy I. Egorov*, Dmitriy M. Makarov, Arkadiy M. Kolker

³⁷ C.S. Callam, S.J. Singer, T.L. Lowary, C.M. Hadad, Computational analysis of the potential energy surfaces of glycerol in the gas and aqueous phases: effects of level of theory, basis set, and solvation on strongly intramolecularly hydrogen-bonded systems, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 11743–11754.

³⁸ [Fukushima M, Tatsumi K, Wada S, Determination of intrinsic stability constants of toxic divalent metal ions to alginic acid. 2001 *Analytical Sciences.* 17:663-666]

RINGRAZIAMENTI

Beh, sono arrivata alla fine di questi 5 anni, sia i primi 3 che gli ultimi 2 sono stati ugualmente belli. Riguardo a ciò voglio prima di tutto ringraziare il Prof Setti che mi ha permesso di effettuare il tirocinio nel suo laboratorio, dove ho potuto nutrire la mia passione per la cosmesi, stando accanto ad Elena che mi ha dato degli ottimi consigli per la formulazione di creme e bagnoschiuma.

Un grazie a Fabio che mi ha seguito in laboratorio e mi ha aiutata nella stesura della tesi, e ovviamente agli altri ragazzi del laboratorio quali Francesco, Ilaria, Dayanne, Barbara ed Elena: quante risate in questi mesi! Siete degli elementi particolari (in positivo!), ma lo sarò anch'io se mi sono trovata così bene?

Ringrazio i miei compagni di corso e non, Martina (sole cuore ammore), Silvia, Fefè, Giovanni e Vir (certo non posso scrivere qui i nostri soprannomi..) che mi hanno accompagnata in questo percorso e mi sono stati accanto nei momenti belli e in quelli bui!

Un grazie immenso va alle mie coinquiline Samy, Michi, Daquero, Ca, Sissi e Lor, per aver reso questi anni indimenticabili e aver cercato d'introdurre in me il mondo dello spettacolo, senza totale riuscita purtroppo! Grazie per essermi state sempre vicine nonostante i miei cambiamenti (soprattutto nel fashion!).

Grazie alle mie sorelle Aurora e Lucia, che hanno seguito da vicino il mio processo di maturazione e posso dire che in questi anni si è consolidato anche il nostro rapporto. Grazie ai miei genitori perché senza di loro non sarei qui adesso a scrivere i ringraziamenti per la tesi.

Grazie a Gianni Fortunato, se ora sono così come sono è soprattutto merito suo.

Grazie agli amici del Tai Chi Saverio e Pierfranco che, ognuno a modo suo, hanno condiviso con me questi anni e mi hanno affiancato nel mio tuttora in atto cammino evolutivo.