

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

---

---

**DOTTORATO DI RICERCA**

***Biocatalisi Applicata e Microbiologia Industriale***

**Ciclo XX**

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza: CHIM/11

**IMPIEGO DELLA  
MODERNA CROMATOGRAFIA PLANARE STRUMENTALE  
PER LO STUDIO DELL' AFFINITA' DI  
*Bifidobacterium adolescentis* MB239  
PER DIVERSI SUBSTRATI GLUCIDI**

**Presentata da: Dott. Tatiana Bernardi**

**Coordinatore Dottorato**

Chiar.mo Prof.  
Diego Matteuzzi

**Relatore**

Chiar.mo Prof.  
Giuseppe Vaccari

**Esame finale anno 2008**  
Anno Accademico 2006-2007



# **INDICE**

## **CAPITOLO 1**

### **LA FIBRA ALIMENTARE**

<b>Introduzione</b>	<b>Pag.1</b>
<b>1.1. Oligosaccaridi come prebiotici</b>	<b>Pag.12</b>
<b>1.2. Provenienza degli frutto-oligosaccaridi</b>	<b>Pag.13</b>
<b>1.3. Galatto-oligosaccaridi</b>	<b>Pag.17</b>
<b>1.4. Xilo-oligosaccaridi</b>	<b>Pag.18</b>

## **CAPITOLO 2**

### **I BIFIDOBATTERI**

<b>2.1. Tassonomia, fisiologia e nutrizione</b>	<b>Pag.21</b>
<b>2.2. Ecologia</b>	<b>Pag.27</b>
<b>2.3. Proprietà probiotiche</b>	<b>Pag.29</b>
<b>2.4. Metabolismo dei carboidrati nei bifidobatteri</b>	<b>Pag.31</b>
<b>2.5. Metabolismo degli oligosaccaridi e polisaccaridi</b>	<b>Pag.32</b>
<b>2.6. Glicosil-idrolasi</b>	<b>Pag.32</b>
<b>2.7. Acidi organici</b>	<b>Pag.33</b>

## **CAPITOLO 3**

### **CINETICHE DI COLTURE MICROBICHE**

<b>3.1. Introduzione</b>	<b>Pag.35</b>
--------------------------	---------------

<b>3.2. Modalità batch</b>	<b>Pag.37</b>
<b>3.3. Modalità continua</b>	<b>Pag.40</b>
<b>3.4. Crescita microbica su miscele di substrati</b>	<b>Pag.42</b>

## **CAPITOLO 4**

### **CROMATOGRAFIA PLANARE**

<b>4.1. Storia della cromatografia</b>	<b>Pag.43</b>
<b>4.2. Concetti di carattere teorico</b>	<b>Pag.45</b>
<b>4.3. Adsorbimento</b>	<b>Pag.49</b>
<b>4.4. Partizione</b>	<b>Pag.50</b>
<b>4.5. Formazione di complessi</b>	<b>Pag.51</b>
<b>4.6. Efficienza, diffusione, selettività e risoluzione</b>	<b>Pag.52</b>
<b>4.7. Diffusione banda cromatografica</b>	<b>Pag.54</b>
<b>4.8. Equazione di Van Deemter</b>	<b>Pag.56</b>
<b>4.9. Separazione e risoluzione</b>	<b>Pag.58</b>
<b>4.10. La fase stazionaria</b>	<b>Pag.61</b>
<b>4.10.1. Gel di silice</b>	
<b>4.10.2. Allumina</b>	
<b>4.10.3. Fasi legate</b>	
<b>4.11. Il solvente</b>	<b>Pag.67</b>
<b>4.12. Flusso capillare</b>	<b>Pag.70</b>
<b>4.13. La fase mobile</b>	<b>Pag.73</b>

4.14.	Forza del solvente	Pag.74
4.15.	Interazioni intermolecolari tra campione e molecole della fase mobile	Pag.77
4.16.	Selettività	Pag.82
4.17.	Il modello "Prisma"	Pag.85
4.18.	Strategia di ottimizzazione	Pag.87
	4.18.1. Ottimizzazione delle sostanze non polari	
	4.18.2. Ottimizzazione per sostanze polari	
4.19.	Metodo dei quattro "solventi"	Pag.90

## CAPITOLO 5

### ASPETTI PRATICI DELLA MODERNA CROMATOGRAFIA PLANARE

5.1.	Preparazione del campione	Pag.91
5.2.	Derivatizzazione pre-cromatografica	Pag.94
5.3.	Prelavaggio, attivazione e manipolazione	Pag.94
5.4.	Applicazione del campione	Pag.95
5.5.	Sviluppo cromatografico	Pag.100
5.6.	AMD Sviluppo Multiplo Automatizzato	Pag.103
5.7.	Ottimizzazione di una separazione AMD	Pag.110
5.8.	Overpressured Thin Layer Chromatography (OPLC)	Pag.113
	5.8.1. Caratteristiche della strumentazione OPLC	

**5.8.2. Ottimizzazione del sistema eluente per separazioni OPLC**

<b>5.9.</b>	<b>Derivatizzazione</b>	<b>Pag.121</b>
<b>5.10.</b>	<b>Visualizzazione dei cromatogrammi</b>	<b>Pag.122</b>
<b>5.11.</b>	<b>Densitometria</b>	<b>Pag.123</b>

<b>SCOPO DELLA TESI</b>	<b>Pag.128</b>
-------------------------	----------------

## **CAPITOLO 6**

### **MATERIALI E METODI**

<b>6.1.</b>	<b>Microbiota</b>	<b>Pag.130</b>
<b>6.2.</b>	<b>Terreni e condizioni di coltura</b>	<b>Pag.130</b>

## **CAPITOLO 7**

### **CRESCITA DI *Bifidobacterium adolescentis* MB239 SU FOS**

<b>7.1.</b>	<b>Condizioni di fermentazione</b>	<b>Pag.135</b>
<b>7.1.1.</b>	<b>Bioreattore</b>	

7.1.2.	Fermentazioni batch	
7.1.3.	Chemostato	
7.2.	Metodi per la quantificazione della biomassa	Pag.141
7.2.1.	OD <sub>600</sub>	
7.2.2.	Peso secco	
7.3.	Determinazione degli acidi organici	Pag.142
7.4.	Determinazione delle attività glicosil-idrolasiche	Pag.143
7.4.1.	Preparazione dei campioni	
7.4.2.	Determinazioni di $\alpha$ -galattosidasi	
7.4.3.	Determinazione dell'attività della $\beta$ -fruttofuranosidasi	
7.5.	Messa a punto del metodo di analisi dei carboidrati	Pag.146
7.6.	Preparazione dei campioni e degli standard	Pag.155
7.7.	Deposizione delle soluzioni di campione e di standard	Pag.156
7.8.	Eluizione in gradiente dei campioni di fermentazione	Pag.158
7.8.1.	Fermentazione su miscela monosaccaridica: glucosio, fruttosio, galattosio	
7.8.2.	Fermentazione su miscela di di- ed oligosaccaridi: lattosio, raffiniosio, actilight	
7.8.3.	Fermentazione su miscela di mono, di- ed oligosaccaridi: glucosio, fruttosio, galattosio, lattosio, raffiniosio, actilight	
7.9.	Derivatizzazione	Pag.163

7.10.	Rivelazione	Pag.165
7.11.	Risultati: Crescita di <i>B. adolescentis</i> MB239 su singole fonti di Carbonio: modalità batch	Pag.166
7.11.1.	Fermentazione su miscela monosaccaridica: glucosio, fruttosio, galattosio	
7.11.2.	Fermentazione su miscela di di- ed raffinosio, actilight oligosaccaridi:lattosio,	
7.11.3.	Fermentazione su miscela di mono, di- fruttoio, galattosio, raffinosio, actilight	
7.12.	Crescita di <i>B. adolescentis</i> MB239 su singole fonti di carbonio: modalità chemostato	Pag.190
7.13.	Parametri cinetici	Pag.191
7.14.	Attività enzimatiche ed analisi zuccheri presenti	Pag.192
7.14.1.	Attività glicosil-idrolasiche	
7.15.	Conclusioni	Pag.199

## CAPITOLO 8

### CRESCITA DI *Bifidobacterium adolescentis* MB239 SU GOS

8.1.	Messa a punto del metodo di analisi	Pag.204
------	-------------------------------------	---------

8.1.1.	Fermentazione su unico nutriente: glucosio, galattosio e lattosio	
8.1.2.	Fermentazione su miscela oligosaccaridica: GOS	
8.2.	Derivatizzazione	Pag.214
8.3.	Risultati: Crescita di <i>B. adolescentis</i> MB239 su glucosio, galattosio, lattosio e GOS: modalità batch	Pag.214
8.3.1.	Fermentazione su monosaccaride: glucosio	
8.3.2.	Fermentazione su monosaccaride: galattosio	
8.3.3.	Fermentazione su disaccaride: lattosio	
8.3.4.	Fermentazione su miscela ligosaccaridica	
8.4.	Parametri cinetici	Pag.223
8.4.1.	Preparazione dei campioni	
8.4.2.	Determinazioni di $\alpha$ e $\beta$ -galattosidasi	
8.4.3.	Determinazione dell'attività della $\beta$ - fruttofuranosidasi	
8.5.	Attività enzimatiche	Pag.225
8.5.1.	Attività galattosil-idrolasiche	
8.6.	Conclusioni	Pag.155

## CAPITOLO 9

## **CRESCITA DI *Bifidobacterium adolescentis* MB239 SU XOS**

9.1.	Condizioni di fermentazione	Pag.229
9.2.	Determinazione delle attività glicosil-idrolasiche	Pag.230
9.3.	Eluizione in isocratica dei campioni di fermentazione	Pag.231
9.3.1.	Fermentazione su singolo nutriente: xilosio	
9.3.2.	Fermentazione su miscela di mono ed oligosaccaridi:XOS	
9.4.	Derivatizzazione	Pag.238
9.5.	Risultati: Crescita di <i>B.adolescentis</i> MB239 su diverse fonti di carbonio: modalità batch	Pag.239
9.5.1.	Fermentazione su xilosio	
9.5.2.	Fermentazione su XOS	
9.6.	Parametri cinetici	Pag.245
9.7.	Attività enzimatiche	Pag.247
9.7.1.	Attività xilosil-idrolasiche	
9.8.	Conclusioni	Pag.248
	Conclusioni finali	Pag.250

## CAPITOLO 1

### LA FIBRA ALIMENTARE

#### INTRODUZIONE

Verso la fine degli anni '70, la comunità scientifica, stabilì in modo unanime che per **fibra alimentare** si intendono i residui delle cellule dei vegetali commestibili, polisaccaridi, oligosaccaridi e lignina resistenti agli enzimi digestivi umani.

Un qualsiasi prodotto alimentare poteva essere etichettato come "fonte di fibra" solo se, attraverso test in vivo su soggetti umani, ne fosse stata provata la sicurezza d'uso e garantita l'efficacia fisiologica.

Dal punto di vista chimico la fibra non è costituita da un singolo composto, ma da un gruppo di sostanze chimicamente molto diverse tra loro, quali cellulosa, emicellulose, pectine, gomme, mucillagini, galattomannani, betaglucani, polisaccaridi di alghe (agar e carragenine) e lignina.

La lignina, normalmente inclusa nella definizione di fibra alimentare, non è in realtà un carboidrato, ma un insieme eterogeneo di polimeri costituiti da due a molte unità di fenilpropano, in grado di legarsi covalentemente ai polisaccaridi.

Molti alimenti sono ricchi in fibre, la crusca di avena, ad esempio, è ricca di gomme ed è considerata una buona fonte di fibre viscosi, mentre la crusca di frumento contiene più componenti insolubili.

In generale le verdure ed i semi eduli (cereali e legumi) sono buone fonti di cellulosa, mentre altri prodotti integrali sono più ricchi di emicellulose.

I legumi ed i prodotti di avena sono le fonti migliori di gomme; le mele e gli agrumi contengono una maggiore quantità di pectine.

In ogni caso la fibra alimentare si distingue in **solubile e non solubile**.

**La fibra non-solubile:** formata da polisaccaridi ad alto peso molecolare (si tratta prevalentemente di cellulosa e lignina ma in parte anche da emicellulosa) tende ad organizzarsi in strutture cristalline e ad espellere parte dell'acqua di idratazione formando una massa con peso inferiore, pari a 10-15 volte quello iniziale.

La capacità di trattenere l'acqua è però influenzata anche dalla dimensione delle particelle, cioè dalla granulometria.

La FA non-solubile produce un aumento del peso della massa fecale si traduce, innanzitutto, in un effetto meccanico, che, provocando la distensione della parete intestinale, stimola la peristalsi, cioè velocizza il transito della massa stessa, producendo effetti positivi sulla stipsi oltre che nella prevenzione e terapia del diabete e dell'obesità, come pure in quella di alcune forme tumorali del grosso intestino (cancro del retto e del colon).

**La fibra solubile** è costituita essenzialmente da polisaccaridi ( oligosaccaridi di fruttosio, glucosio e galattosio, inuline, gomme e mucillagini) che si differenziano fra di loro per la lunghezza e la ramificazione delle catene carboniose, nonché per la presenza di gruppi funzionali diversi.

La loro solubilità è determinata dal peso molecolare e dalla struttura, ed alla solubilità sono correlabili due proprietà fondamentali della fibra: la viscosità e la fermentiscibilità.

La fibra solubile interagisce con il contenuto del lume intestinale mediante meccanismi osmotici; a seconda del peso molecolare e della struttura chimica delle sue componenti, aumenta la viscosità del contenuto del lume intestinale interferendo con la sua velocità di transito; inoltre è fermentiscibile ad opera della microflora. I principali prodotti della fermentazione sono acidi grassi a corta catena, principalmente acido acetico, propionico e butirrico.

Le fibre, nel senso generale del termine, producono una serie di effetti positivi sull'uomo che sono oggetto di studio e che verranno qui di seguito elencati.

### **Assorbimento dei minerali**

I carboidrati non digeribili sono stati a lungo ritenuti responsabili di una riduzione dell'assorbimento dei minerali dell' intestino tenue per la loro capacità di legare i minerali stessi sequestrandoli in complessi non disponibili.

In condizioni di nutrizione adeguata ciò non sembra porre problemi e non si ritiene che livelli moderati di fibra causino carenze nutrizionali, infatti a questo riguardo se il consumo di fibre è da fonti diverse si riducono gli effetti potenzialmente negativi dell'aumentato consumo di fibra in generale.

Inoltre, studi recenti hanno indicato che i carboidrati non digeribili non influenzano di per se l'assorbimento od il bilancio dei minerali ma che questo è un effetto che sembra essere probabilmente dovuto, alla presenza di agenti in grado di complessarli.

In ogni caso, i minerali che sono legati o sequestrati e quindi non assorbiti nell'intestino tenue, raggiungono il colon, dove possono essere rilasciati dalla matrice del carboidrato ed assorbiti.

E' stato infatti osservato che l'inulina e gli oligosaccaridi non pregiudicano l'assorbimento dei minerali, anzi sembra addirittura che, grazie all'effetto osmotico, l'acidificazione del colon dovuto alla fermentazione ed alla successiva formazione di acidi grassi a catena corta (acido acetico, propionico e butirrico), la formazione di sali di questi acidi e l'ipertrofia della parete del colon, producano un effetto positivo.

Se vogliamo scendere nel particolare per quel che riguarda il calcio, l'assorbimento avviene a livello dell'intestino ceco, per azione a livello cellulare mediante stimolazione di una proteina che ha la proprietà di legare il calcio CALBINDINA-D9K .

L'incremento del bilancio del calcio, riportato per diete contenenti frutto-oligosaccaridi con basso grado di polimerizzazione (< 4) si traduce anche in un aumento nella concentrazione di calcio nel femore.

Sono stati condotti studi in vivo sull'uomo che confermano l'effetto positivo di inulina e frutto-oligosaccaridi con grado di polimerizzazione inferiore ad

otto, sull'assorbimento e sul bilancio del calcio, ma non del ferro, magnesio o zinco.

Tuttavia questi dati sull'assorbimento del ferro, sono in contrasto con quelli riportati in un progetto europeo sui carboidrati non digeribili (Van Loo J., Cummings J., Delzenne N., Englyst H., Franck A., Hopkins M., Kok N., Mcfarlane G., Newton D., Quigley M., Roberfroid M., Van Vliet T., Van den Heuvel E. " Functional food properties of digestible properties of digestible oligosaccarides: a consensus report from the END project (DGXIIAIRII CT<sub>94-1095</sub>) Br. J. Nutr. 81: 121-132,1999) dove in ratti che consumavano fruttani tipo inulina e quindi con un peso molecolare superiore alle otto unità monosaccaridiche, si osserva un incremento nel contenuto di ferro nel sangue.

Nello stesso progetto, usando ratti ovariectomizzati come sistema modello per la post-menopausa della donna, è stato osservato un effetto positivo dell' inulina sull'assorbimento di calcio e sull'incremento della densità minerale nelle ossa.

L'uso di differenti modelli ha confermato che l'aumentato assorbimento ha origine principalmente a livello dell'intestino crasso ed effettivamente risulta in un incremento della densità dei minerali delle ossa.

Esiste pertanto una promettente evidenza che il consumo di fruttani tipo inulina possa risultare in un incremento nell'assorbimento di calcio nell'uomo, aprendo nuove strade per considerare il consumo di inulina nella riduzione del rischio di osteoporosi.

Nell'insieme, l'assorbimento dei minerali nell'intestino crasso rappresenta un nuovo ed importante concetto, essendo generalmente accettato che l'assorbimento dei minerali avviene principalmente attraverso l'intestino tenue.

## **Obesità**

Per quanto riguarda l'obesità, la FA anticipa l'insorgenza del senso di sazietà provocando la distensione delle pareti gastriche e determinando una diluizione della densità energetica della dieta, in quanto fornisce carboidrati non disponibili.

Inoltre la regolazione del transito intestinale e l'ammorbidimento della massa fecale sono effetti molto utili in soggetti sottoposti a restrizioni dietetiche, in cui generalmente si ha insorgenza di stipsi.

I risultati ottenuti con il consumo alimentare delle fibre vegetali sui lipidi plasmatici sono alquanto contraddittori.

C'è da tener presente innanzitutto che solo alcuni tipi di fibre, come quelle idrosolubili (gomme, mucillaggini e pectine), sono in grado di influenzare il metabolismo lipidico, probabilmente per la loro capacità di formare soluzioni viscosi a livello intestinale.

Tali soluzioni determinano un diminuito o rallentato assorbimento di alcuni importanti nutrienti come il glucosio, i sali biliari, gli acidi grassi ed il colesterolo.

Risultati molto interessanti sono stati ottenuti da Jenkins e coll., (Jenkins D.J.A., Kendall C.W.C., Axelsen M., Augustin L.S.A., Vuksan V., Viscous and non-viscous fibres non adsorbable and low glycaemic index carbohydrates, blood lipids and coronary heart disease. Curr. Opin. Lipidol. 11: 49-56, 2000.) che con l'aggiunta agli alimenti di guar, una tipica fibra idrosolubile, hanno ottenuto una diminuzione di circa il 13% sia del colesterolo totale del plasma che di quello delle LDL in pazienti con iperlipoproteinemia.

Questo sistema comunque, più farmacologico che dietetico, è proponibile solo per brevi periodi di tempo, per la scarsa appetibilità e gli effetti collaterali delle preparazioni di guar e consimili.

La possibilità, invece, di utilizzare una dieta ricca in fibre, composta esclusivamente di cibi naturali, nella quale vengono preferiti gli alimenti a

più alto contenuto in fibre, soprattutto legumi e frutta, produce una significativa riduzione sia del colesterolo totale che di quello delle LDL .

La spiegazione più probabile di questa differenza è che la fibra alimentare agisce sul metabolismo lipidico dei pazienti diabetici iperlipidemici mediante due meccanismi:

- Migliorando il controllo glicometabolico, che a sua volta agisce sul metabolismo lipidico limitando la sintesi di VLDL e delle LDL.
- Ostacolando e rallentando l'assorbimento intestinale di colesterolo e sali biliari.

Questo secondo meccanismo è operante sia nei diabetici che nei non diabetici.

L'influenza più importante delle fibre alimentari si esplica nel controllo dell'iperfagia degli obesi.

Una dieta ricca di fibra può concorrere al mantenimento del peso corporeo ed al trattamento dell'obesità.

Probabilmente il più lento svuotamento dello stomaco induce un più prolungato senso di sazietà, inoltre la densità calorica della dieta risulta diminuita dalla presenza di elevate quantità di fibra.

Così come per il diabete, l'iperlipidemia ed altre malattie, l'importanza delle fibre nell'eziologia e nella correzione della obesità nasce da due ordini di evidenze:

- ➡ osservazioni epidemiologiche, che mettono in risalto come la prevalenza di obesità sia maggiore nei paesi industrializzati, abituati ad un alimentazione povera di fibra non digeribile.
- ➡ osservazioni sperimentali, che evidenziano come un pasto ricco in fibre o con aggiunta di vari tipi di fibra determini un

aumento del senso di sazietà con conseguente spontanea riduzione della quantità del pasto successivo e quindi a lungo andare dell'introito calorico globale.

Tali dati sono stati confermati in uno studio clinico su pazienti obesi eseguito in Svezia, alimentati con una dieta addizionata o meno con farina di guar. Si è ottenuto un significativo decremento ponderale nel gruppo alimentato con guar e tale diminuzione non era ottenuta con la stessa dieta ipocalorica senza aggiunta di fibre.

Perché le fibre determinano un senso di sazietà?

La prima possibilità esplorativa è la maggiore durata della masticazione con aumentata salivazione e quindi con un maggior numero di segnali di sazietà che arrivano al cervello.

Ancor più importante è che alcuni tipi di fibre, specialmente quelle idrosolubili, rallentano lo svuotamento gastrico, il che ovviamente induce sazietà.

Altra possibile spiegazione deriva dall'effetto che le fibre esercitano sulla secrezione di insulina: l'aggiunta di fibre ad un carico orale di glucosio determina un miglioramento della tolleranza glucidica ed una riduzione delle secrezione insulinica, che ha, a sua volta, una notevole importanza sulla delicata regolazione della fame e della sazietà.

In conclusione, una dieta ricca di fibre può essere estremamente utile nel trattamento del paziente obeso, determinando un maggiore senso di sazietà con riduzione a lungo andare dell'introito calorico globale e quindi una perdita di peso.

A questo aggiunge anche un altro vantaggio dato dalla possibile maggiore aderenza dei pazienti, specialmente per lunghi periodi, ad una dieta che, a differenza di tutti gli altri regimi ipocalorici in genere utilizzati, riesce a soddisfare anche il gusto ed il maggior senso di appetito dei pazienti obesi.

## **Diabete**

La soluzione al problema di un impiego terapeutico delle fibre vegetali, che richiede una valutazione sempre critica rispetto alla tipologia di paziente, è stata tentata attraverso l'uso di alimenti naturalmente ricchi di tali sostanze di facile reperibilità.

Numerosi studi condotti secondo questo approccio dimostrano effetti terapeutici addirittura sorprendenti sul compenso glicometabolico dei pazienti diabetici.

Trattamenti che comprendono una somministrazione quotidiana di un alto contenuto di fibre producono un miglioramento dell'equilibrio glicometabolico sia in pazienti diabetici insulino-dipendenti che non insulino-dipendenti.

E' stato dimostrato che gli effetti delle fibre sul metabolismo dei carboidrati sono diversi non solo a seconda del tipo di fibra utilizzato, ma anche a seconda del loro diverso stato fisico: una mela consumata intera, una frullata (con fibre quindi alterate nel loro stato fisico) ed il solo succo di una mela (virtualmente senza fibre), determinano risposte glicemiche ed insulinemiche differenti (N.M. Delzenne 2001): gli incrementi glicemici sono quasi sovrapponibili, ma il decremento glicemico successivo è tanto maggiore quanto maggiore è la manipolazione dell'alimento; la risposta insulinica, invece, è significativamente maggiore nei due casi con fibre alterate nel loro stato fisico.

Questo suggerisce che le fibre contenute nei diversi tipi di alimenti agiscono solo quando sono intatte e che qualsiasi processo che ne modifichi le caratteristiche può compromettere i loro fisiologici effetti sull'assorbimento intestinale.

Comunque il possibile meccanismo atto a spiegare l'azione ipoglicemizzante delle fibre non è ancora completamente chiarito ed è probabilmente differente a seconda delle priorità chimico-fisiche delle diverse fibre.

Per quelle solubili in acqua la proprietà più importante a tal riguardo sembra essere quella di formare a livello gastro-intestinale delle soluzioni viscosi che rendono più difficile la diffusione delle sostanze nutritive dal lume alla mucosa intestinale con conseguente rallentato assorbimento dei carboidrati.

Per le fibre insolubili in acqua, invece, non è ancora chiarita la modalità con la quale esse potrebbero agire sul metabolismo del glucosio.

Verosimilmente la loro proprietà di aumentare la velocità di transito intestinale ridurrebbe i tempi di permanenza del cibo nelle sedi idonee all'assorbimento e conseguentemente la stessa utilizzazione dei nutrienti.

### **Neoplasie**

Il consumo frequente di FA associato ad una dieta ricca in vegetali, cereali e frutta è stato messo in relazione con la riduzione del rischio di insorgenza di neoplasie dell'apparato digerente, in particolare del cancro colon-rettale.

Una delle possibili spiegazioni è che la fibra eserciti la sua azione sia attraverso la riduzione del tempo di contatto della parete intestinale con sostanze citotossiche sia attraverso la fermentazione con produzione di acidi grassi a catena corta.

In tal caso, però, qualsiasi carboidrato che raggiunge il colon ed è fermentato in maniera analoga potrebbe essere protettivo.

Il ruolo preventivo della FA si esplica, in particolare, nei confronti del cancro al colon ed è riconducibile anch'esso, alle sue proprietà igroscopiche, infatti l'acqua trattenuta diluisce le sostanze citotossiche presenti nel lume e

la velocizzazione del transito intestinale ne riduce il tempo di contatto con la mucosa e quindi il possibile effetto mutageno sulle cellule della parete.



Fig.1 Caratteristiche della fibra alimentare

Riassumendo, le principali ipotesi (F. Brighenti 1999; N.M. Delzenne 2001; S.R. Glore *et al.* 1994) sono:

- interferenza con l'assorbimento dei nutrienti
- riduzione dell'assorbimento intestinale del colesterolo in seguito all'accelerato transito della massa fecale
- diluizione del contenuto energetico del pasto conseguente riduzione della quota di energia proveniente dai lipidi.

- contenimento della trigliceridemia attraverso il controllo dell'iperinsulinemia postprandiale.
- riduzione della sintesi epatica di colesterolo attraverso l'inibizione operata attraverso l'acido propionico, prodotto dalla fermentazione intestinale della frazione solubile
- interferenza con il riassorbimento intestinale degli acidi biliari e conseguente stimolazione della captazione epatica di colesterolo destinato alla sintesi ex-novo.

In merito a quest' ultimo punto, la FA modifica l'entità di assorbimento di alcuni acidi biliari; questi, una volta deconiugati, idrossilati e pertanto resi solubili, possono interagire con i gruppi polari liberi della fibra e legarsi ad essa.

In tal modo la FA ne impedisce l'assorbimento intestinale: l'aumento della loro escrezione fecale ne richiede il reintegro, che avviene a carico del colesterolo epatico, inducendo una riduzione del pool di colesterolo totale e di quello circolante in particolare.

### **Prebiotici**

Oltre a questi effetti correlati fondamentalmente all'azione meccanica, la FA, e soprattutto la frazione solubile, svolge effetti prebiotici.

Recentemente si è scoperto che alcuni componenti della fibra (soprattutto oligosaccaridi ed inulina) sono in grado di funzionare come substrato di crescita per i batteri intestinali umani (Cummings J., 2001).

Quando questi componenti (prebiotici) vengono ingeriti insieme con batteri selezionati gastro-resistenti (probiotici) quello che si verifica è una positiva sostituzione ed integrazione della flora intestinale.

Questa associazione di componenti è quella che si trova attualmente negli alimenti funzionali a base di latte che stanno conquistando, in questi ultimi anni, quote di mercato sempre più ampie.

Nel tratto intestinale di tutti i mammiferi dimora infatti una complessa collezione di microrganismi, molti dei quali anaerobi, nota come microflora intestinale.

Nel caso degli animali monogastrici, quale l'uomo, la microflora è localizzata nell'intestino crasso ed in particolare nel colon, che contiene fino a miliardi di batteri per ogni grammo di contenuto intestinale.

Circa 400 specie batteriche sono state rilevate nelle feci umane, sebbene soltanto 30-40 specie costituiscono il 99% della collezione nei soggetti umani.

La microflora dell'intestino umano influenza la salute ed il benessere dell'ospite.

E' opinione ormai condivisa che alcuni componenti della microflora possano avere effetti benefici sulla resistenza alle gastroenteriti, sulla tolleranza al lattosio, sull'immunità gastrointestinale e sull'assorbimento dei minerali, nonché ridurre i livelli di colesterolo ematico ed esercitare un'azione antitumorale.

Sebbene gli aspetti benefici della flora gastrointestinale nell'uomo necessitino ancora di conferme definitive e spiegazioni relative ai meccanismi coinvolti, c'è attualmente grande interesse nel modulare la composizione della flora intestinale in modo da ottenere una popolazione batterica con specifiche proprietà benefiche mediante l'uso di specifici supplementi nella dieta.

Si definisce "PREBIOTICO" un componente della dieta che influenza in modo benefico l'ospite stimolando selettivamente la crescita, l'attività, od entrambe di una o di un limitato numero di specie batteriche già residenti nel colon e l'alimento che lo contiene è definito ALIMENTO FUNZIONALE ovvero ricco di componenti che hanno la capacità di interferire positivamente con lo stato di salute dell'uomo.

Per essere classificato come prebiotico, un alimento deve possedere le seguenti caratteristiche:

- Non essere idrolizzato né assorbito nella parte alta del tratto gastrointestinale.
- Essere un substrato selettivo per uno od un limitato numero di potenziali batteri benefici commensali del colon.
- Essere in grado di alterare la microflora del colon a favore di una microflora più salutare per l'uomo.

Recentemente, l'interesse nei confronti degli oligosaccaridi non digeribili è cresciuto non solo per le ottime proprietà funzionali (che includono la capacità dolcificante e di sostituzione dei grassi), ma anche per la resistenza alla digestione nel tratto gastrointestinale superiore e, quindi, per la possibilità di una successiva fermentazione nel colon.

Studi effettuati sia in vivo che in vitro hanno dimostrato che questi carboidrati possono essere metabolizzati da batteri anaerobi, comuni costituenti della flora microbica intestinale.

Attraverso il processo di fermentazione di questi composti, i batteri del colon producono una grande varietà di composti che possono influenzare l'attività dell'intestino così come l'intera fisiologia.

La fermentazione dei carboidrati che raggiungono il colon produce acidi grassi a corta catena (acetato, propionato, butirato) ed acido lattico, che permette all'ospite di recuperare parte dell'energia degli oligosaccaridi non digeribili e che potrebbe giocare un ruolo nella regolazione del metabolismo cellulare, nonché nella divisione e differenziazione.

L'identificazione di specifiche frazioni della fibra alimentare con proprietà prebiotiche richiede ulteriori studi.

Sebbene colture pure di specie batteriche possano già discriminare le proprietà di carboidrati in funzione della loro capacità di utilizzarli come

substrati per la fermentazione, l'uso di colture miste o di opportuni modelli animali può mimare il colon e rappresentare pertanto un passaggio preliminare agli studi su volontari umani.

La caratteristica più importante di questa categoria di sostanze, nell'ambito dello studio che si propone questa tesi, è la loro azione prebiotica (A. Mangano *et al.* Ruolo degli alimenti contenenti probiotici nella nutrizione umana. *Nutrizione Umana* Ed. ADI; J.H. Cummings *et al.* 2001) quindi la capacità di stimolare nel colon, in modo selettivo, la crescita di specie batteriche ad azione probiotica (in particolare *Bifidobacterium bifidum*, *longum*, *adolescentis*, ed *infantis* ), cioè di microrganismi vivi e vitali che esercitano un effetto positivo nell'intestino umano, favorendo l'equilibrio della microflora intestinale ( Gibson G.R, 2000 ).

## 1.1. OLIGOSACCARIDI COME PREBIOTICI

Il termine "oligosaccaride" si applica a polimeri saccaridici, costituiti da legami glicosidici da due a dieci unità monosaccaridiche e se in passato si sono utilizzati come dolcificanti negli alimenti oggi entrano a far parte delle fibresolubili.

La loro caratteristica è quella di resistere all'attacco ad opera degli enzimi digestivi umani ed animali e quindi non sono assorbibili direttamente dall'ospite.

I metodi per ottenere queste molecole sono:

- estrazione da piante (frutto-oligosaccaridi, xilo-oligosaccaridi)
  
- idrolisi di polisaccaridi attraverso controllo enzimatico (frutto-oligosaccaridi, xilo-oligosaccaridi)

- sintesi enzimatica (frutto-oligosaccaridi, gluco-oligosaccaridi, galatto-oligosaccaridi)

Il termine "oligosaccaride" è utilizzato in particolare per identificare un gruppo di carboidrati costituiti da 2 - 20 unità zuccherine.

Gli oligosaccaridi (F. Brighenti 1999 ) possono contenere blocchi costitutivi zuccherini simili o diversi, strutture di legame diverse, possono essere lineari o ramificati e sono solubili nell'acqua e nei fluidi fisiologici.

La maggior parte di queste caratteristiche è collegata alla resistenza degli oligosaccaridi nell'essere degradati dagli enzimi digestivi secreti nel tratto gastro-intestinale, in combinazione con le loro proprietà come substrato solubile per specifiche popolazioni microbiche nel tratto digestivo dei monogastrici.

Gli oligosaccaridi sono costituenti naturali delle piante e di prodotti alimentari di origine vegetale.

Sono stati identificati in quantità consistente in germogli di bambù, cipolle, asparagi, *Verbascum thapsus*, carciofi, frumento, salsa di soia e sakè.

Anche prodotti di origine animale, come il latte di diverse specie, si è dimostrato che contengono uno o più tipi di oligosaccaridi o gluco-coniugati.

Di seguito verranno illustrati i principali gruppi di oligosaccaridi utilizzati per questo lavoro di ricerca.

## **1.2. Provenienza dei frutto-oligosaccaridi**

I frutto-oligosaccaridi (figura 2) sono sostanze che negli ultimi anni stanno ricoprendo grande importanza e suscitando grande interesse nel settore alimentare, grazie alla crescente domanda di cibi a basso contenuto calorico e di carattere salutare.

La loro produzione viene fatta utilizzando due differenti tecniche:

- Produzione per via enzimatica, che fornisce un prodotto estremamente puro ma che richiede una lavorazione difficile ed indubbiamente onerosa ( occorre allestire ambienti adatti e lavorare con enzimi).
- Estrazione delle molecole presenti in piante e radici (tipo topinambur, cicoria, carciofi ..... ) che però richiede fasi di depurazione e caratterizzazione del prodotto finale.

### **Produzione per via enzimatica**

Diversi frutto-oligosaccaridi ad alto peso molecolare, sono stati prodotti per azione dell'enzima fruttosiltransferasi estratto da funghi come *Aureobasidium pullulans* e *Aspergillus Niger*.

In realtà questo enzima lo troviamo in molte altre specie fungine o lieviti, ma è stato estratto anche da foglie di barbabietola, carciofi, cipolle, asparagi, agave.....

In generale, gli enzimi estratti dai microrganismi sono più grandi e più resistenti alla temperatura rispetto a quelli estratti da piante.

La fruttosiltransferasi è conveniente per usi a scopo commerciale in quanto è attiva già con modeste concentrazioni di saccarosio nel brodo di fermentazione e Ca, Mg, Co e Li attivano la reazione di sintesi, mentre Hg, Cu, e Pb ( I. S. Bhatia, *J. Biochem.* 57, (1954), 22 ) sono dei veleni.

La definizione di unità enzimatica differisce da autore ad autore, per alcuni è la quantità di enzima responsabile del trasferimento di una mole di fruttosio al minuto, mentre per altri è la quantità di enzima necessaria a produrre una mole di glucosio al minuto.

Il meccanismo di reazione dell'enzima fruttosiltransferasi dipende dalla specie da cui è stato estratto e per la produzione di frutto-oligosaccaridi a livello industriale, è stato individuato il seguente meccanismo (W. N. Arnold *Biophys. Acta*, 110, (1965), 134-147 ):

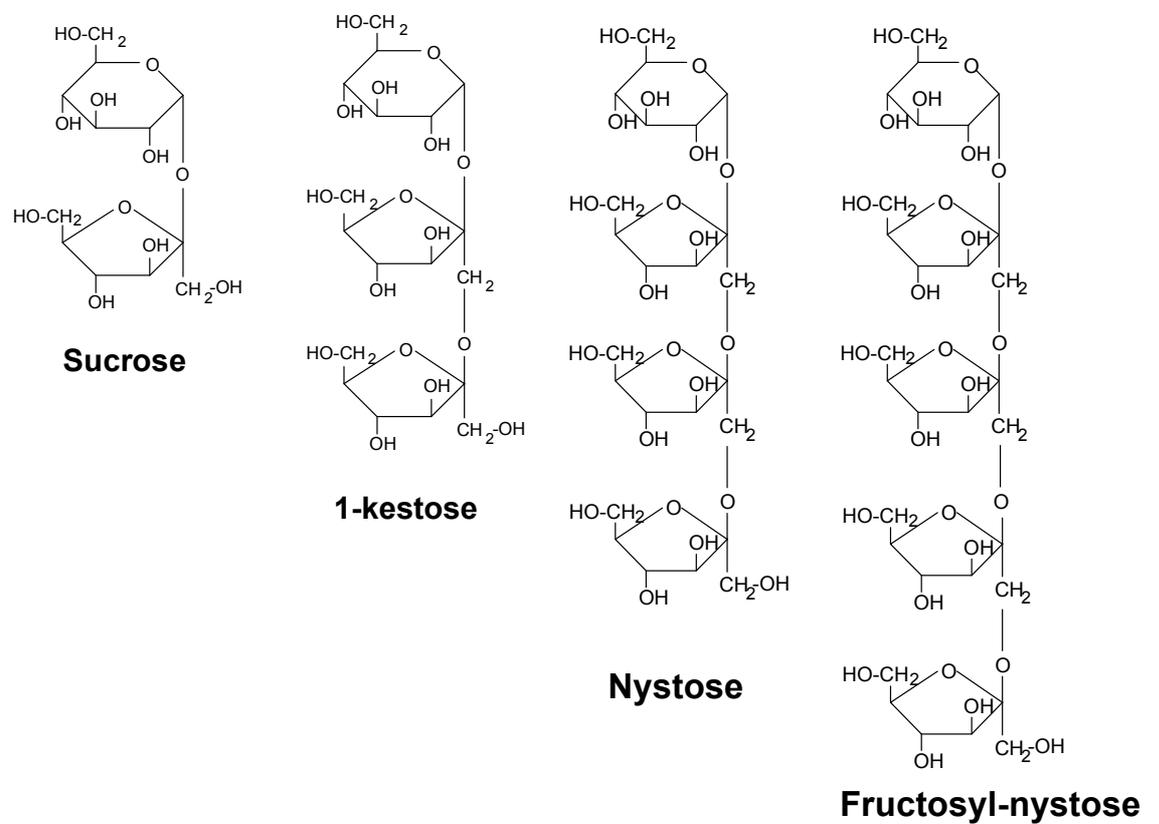
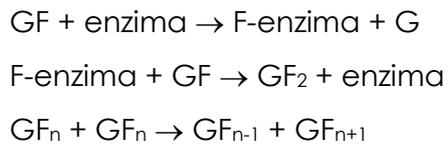


Fig.2 Strutture chimiche del saccarosio e dei frutto-oligosaccaridi (GF<sub>2</sub>,GF<sub>3</sub>,GF<sub>4</sub>), in cui si ricorda che le unità fruttosidiche si legano al saccarosio in posizione β-(2,1).

Con questo meccanismo si osserva che l'enzima agisce sul saccarosio con una tipica reazione di disproporzione, dove una molecola di saccarosio serve da donatore ed una agisce da accettore.

La fruttosiltransferasi viene prodotta attraverso una fermentazione aerobica in presenza di colonie fungine.

Sebbene le condizioni di fermentazione, come l'aerazione, l'agitazione, il pH e la temperatura, debbano essere impostate per ogni tipo di microrganismo, le condizioni generali sono:

- il saccarosio come migliore fonte di carbonio
- pH circa 5,5
- la temperatura si aggira attorno ai 30°C (J. W. Yun (1980)).

E' importante ricordare che l'attività intracellulare migliora fortemente in presenza di ioni magnesio e nel caso in cui venga a mancare il saccarosio allora le cellule demoliscono i frutto-oligosaccaridi prodotti per continuare a crescere.

Le cellule vengono raccolte facilmente in centrifughe e gli enzimi vengono estratti attraverso lisozimi oppure le cellule stesse vengono immobilizzate per la fermentazione.

I sistemi industriali di produzione di frutto-oligosaccaridi sono essenzialmente due:

- Il primo è un sistema a batch che utilizza enzimi solubili
- Il secondo è un sistema continuo ed utilizza enzimi immobilizzati o le cellule stesse.

Con il sistema a batch esiste l'inconveniente di dover separare gli enzimi dallo sciroppo di frutto-oligosaccaridi che viene poi concentrato a non meno di 800 g/l in un tradizionale sistema di evaporatori.

La fase finale è quella di sterilizzazione del prodotto che può avvenire sia per trattamento con elevate temperature, sia con luce UV.

L' inconveniente maggiore, in questo tipo di produzione, nasce dal glucosio che si accumula durante la lavorazione e risulta essere un forte inibitore enzimatico.

E' quindi necessario eliminarlo per ottenere alte rese e questo viene fatto utilizzando due tipi di enzimi: la glucosio isomerasi e la glucosio ossidasi.

Il secondo di questi enzimi sembra essere quello che dà i migliori risultati.

### **Produzione per estrazione**

La tecnica di estrazione dei frutto-oligosaccaridi è in linea generale eseguita nel seguente modo:

- riduzione della materia prima in fettucce per agevolare l'operazione di estrazione
- estrazione delle sostanze solubili in acqua (tra cui i frutto-oligosaccaridi) ad una temperatura di circa 70-80°C
- filtrazione del sugo di estrazione a caldo
- sugo limpido ad 80°C
- flocculazione e decantazione a freddo
- lavaggio del precipitato con acqua e/o alcol etilico
- depurazione del sugo di estrazione con calce e/o carbone attivo.
- concentrazione del sugo depurato
- liofilizzazione del concentrato

## **1.3. GALATTO-OLIGOSACCARIDI**

I galatto-oligosaccaridi sono oligomeri la cui struttura generale è costituita da unità di galattosio legate ad un glucosio terminale.

Il più piccolo saccaride di questa famiglia è il lattosio, dimero formato da glucosio e galattosio (Fig. 3).

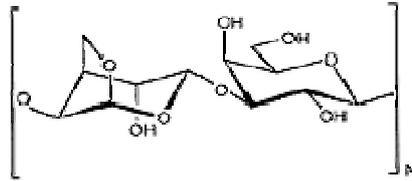


Fig. 3 Struttura dei galatto-oligosaccaridi.

I galatto-oligosaccaridi sono prodotti a partire dal lattosio per l'azione dell'enzima  $\beta$ -galattosidasi ( $\beta$ -Gal).

La  $\beta$ -Galattosidasi idrolizza i  $\beta(1-4)$  galattosidi, ma si comporta da galattosil-transferasi in presenza di elevate concentrazioni di lattosio.

La reazione enzimatica porta ad una miscela di oligosaccaridi, definiti in tal caso anche transgalattosilati o TOS, che presentano un grado di polimerizzazione (DP) variabile tra 3 e 6, con un valore medio di 3-4 unità zuccherine.

Il tipo di legame tra le varie unità galattosidiche, (essenzialmente  $\beta(1-4)$ ;  $\beta(1-6)$ ;  $\beta(1-3)$ ) l'efficienza della transgalattosidasi ed i componenti della miscela finale di reazione dipendono dall'origine dell'enzima e dalle condizioni di reazione ( Boon et al 2000, Tzortzis et al 2005, Sako et al 1999, Rabiou et al 2001, Chen et al 2006, Roy et al 2002).

I galatto-oligosaccaridi non sono idrolizzati né assorbiti nell'intestino tenue umano ed è stato osservato che sono rapidamente fermentati nel colon prossimale in particolare dai bifidobatteri.

È stato evidenziato che esercitano un'attività bifidogenica sia *in vivo* ( 2005, Knol et al. 2005 Bouhnik et al. 1997, Ito et al. 1990, Gopal19 et al. 2001, Rabiou et al. 2001, Tzortzis et al. 2005, Knol et al. 2005) che *in vitro* (2005, Knol et al.

2005 Bouhnik *et al.* 1997, Ito *et al.* 1990, Gopal19 *et al.* 2001, Rabiou *et al.* 2001, Tzortzis *et al.* 2005, Knol *et al.* 2005, Gopal *et al.* 2001) e non solo, infatti gli oligosaccaridi con legami  $\beta(1-4)$  sono selettivamente utilizzati da tutti i *Bifidobacterium* ed alcune specie di *Lactobacillus* e *Bacteroides*, mentre non sono fermentati da *Clostridium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Enterococcus*, *Fusobacterium* ed *Escherichia coli*.

I GOS hanno un'interessante attrattiva, cioè il fatto di essere i componenti saccaridici del latte umano e contribuiscono alla colonizzazione intestinale batterica dei neonati che si nutrono di latte materno.

Per questo motivo, negli ultimi decenni i GOS sono utilizzati come ingredienti prebiotici nell'industria farmaceutica ed alimentare.

In particolare l'aggiunta di frutto e galatto-oligosaccaridi nel latte artificiale, consente e stimola l'insediamento e la crescita dei bifidobatteri nell'intestino dei neonati allo stesso modo dei neonati allattati con latte materno.

### **1.3. XILO-OLIGOSACCARIDI**

Gli xilani sono dei polisaccaridi appartenenti alla categoria delle emicellulose, caratterizzati dalla presenza di xilosio quale unità monomerica di base.

Gli xilani sono da ritenersi fra le sostanze di origine naturale più diffuse in natura in quanto entrano a far parte della parete cellulare vegetale e rientrano pertanto nella composizione di materiali legnosi, semilegnosi, di paglie, gusci, ecc.

La catena principale degli xilani è costituita da D- $\beta$ -xilopiranosio le cui unità sono legate fra loro con legame (1 $\rightarrow$ 4); irregolarmente e con frequenza variabile a seconda della specie vegetale e/o della parte della pianta interessata, su questa catena possono innestarsi ramificazioni, costituite ancora da xilosio, oppure da: (in ordine decrescente di frequenza)

arabinosio (in forma L-arabinofuranosidica), acido 4-O-metil-glucuronico, mannosio, galattosio, ramnosio. L'abbondanza delle ramificazioni costituite da arabinosio, nel più dei casi singole unità legate in posizione 2 e/o 3 sullo xilosio, giustifica l'identificazione di una sottoclasse di emicellulose anch'essa molto frequente in natura, gli arabino-xilani.

Se consideriamo gli arabino-xilani della farina di frumento si può dire che il tipo di sostituzioni della catena non sono casuali in quanto generate da un meccanismo di carattere enzimatico mentre pare sia casuale la distribuzione delle stesse.

Generalmente si tratta di catene di 1500-5000 unità con conformazione di nastro attorcigliato che in soluzione assumono una larga varietà di conformazioni ma con strutture che non risultano mai estese (fig.4)

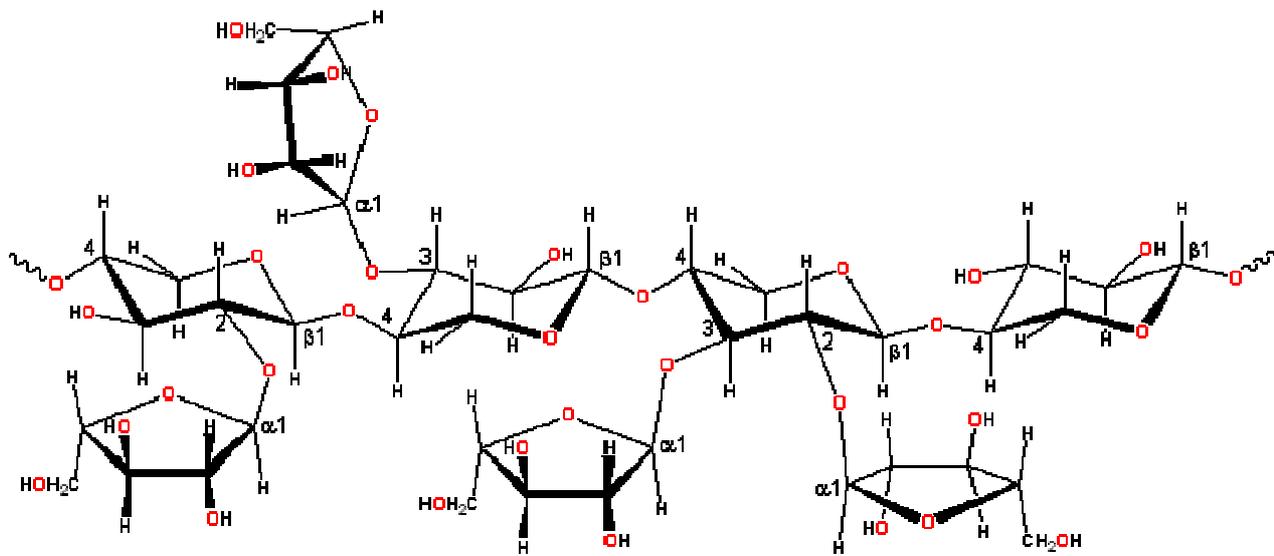


Fig. 4 Struttura di base degli xilo-oligosaccaridi

Sebbene la struttura degli xilani ricorda quella della cellulosa esiste una piccola driving force che produce una struttura cristallina in cui i legami

idrogeno intra ed inter-molecolari associati ai gruppi idrossilici in posizione 6, sono assenti.

La presenza di catene laterali di arabinosio riduce le interazioni tra le catene a causa della maggiore affinità nei confronti dell'acqua delle conformazioni furanosidiche inoltre quando ci sono due sostituenti sulla stessa molecola la catena è rigida e lineare.

Gli xilani mostrano una solubilità in acqua ridottissima o nulla, che può tuttavia aumentare con la riduzione del grado di polimerizzazione della molecola.

In natura gli xilani risultano per lo più interconnessi con le molecole di lignina, tramite legami chimici di tipo etere o estere.

In particolare il legame più frequente si realizza fra un gruppo fenolico della lignina ed un'unità di ramificazione secondaria di arabinosio o di acido 4-O-metil-glucuronico dell'emicellulosa.

I legami con la lignina costituiscono un notevole fattore di complicazione qualora si desiderasse dal punto di vista tecnologico operare l'estrazione di xilani puri, in quanto è frequente che, nel tentativo di separare le due molecole, frammenti di lignina costituiti da uno o più strutture aromatiche, restino legate allo xilano, impartendone una colorazione beige-bruna e modificandone inevitabilmente alcune proprietà chimico-fisiche.

## CAPITOLO 2

### I BIFIDOBATTERI

#### 2.1. TASSONOMIA, FISILOGIA E NUTRIZIONE

I primi bifidobatteri furono osservati nelle feci di neonato agli inizi del secolo e classificati *Bacillus bifidus* a causa della loro strana ma caratteristica forma ad Y (Fig. 6).

Tra il 1900 ed il 1957 furono sviluppate numerose conoscenze in merito a questi batteri, tra cui citiamo la più importante ad opera di Scardovi e Trovatelli (Scardovi V., Trovatelli L.D. 1965).

Il genere *Bifidobacterium* possiede la caratteristica comune del pathway metabolico di fermentazione degli esosi attraverso un enzima chiave che è il fruttosio 6 fosfato fosfochetolasi, che splitta l'esoso-6-fosfato in eritrosio-4-fosfato ed acetilfosfato(Fig. 5).

L'attività della fruttosio-6-fosfato-fosfochetolasi, per la sua unicità di appartenenza al solo genere *Bifidobacterium*, viene usata come marker per l'attribuzione tassonomica delle specie bifidobacteriaceae.

Il glucosio, una volta internalizzato, viene fosforilato dall'esochinasi, generando il glucosio 6-fosfato che viene poi isomerizzato a fruttosio-6-fosfato.

Il fruttosio-6-fosfato è scisso in acetil-fosfato ed in eritroso-4-fosfato ad opera della fruttosio-6-fosfato-fosfochetolasi, enzima principale di questo processo fermentativo.

Da esosofosfati e tetrososofosfati, attraverso la successiva azione di transaldolasi e transchetolasi si formano pentosofosfati.

In seguito alla scissione fosforolitica dello xilulosio-5-fosfato si formano gliceraldeide-3-fosfato ed acetil-fosfato.

Si giunge alla produzione di acido lattico da gliceraldeide-3-fosfato per ottenere piruvato con la formazione di 2ATP e NADH per arrivare all'acido grazie all'azione della lattico-deidrogenasi-NADH ed alla produzione di quantità aggiuntive di acido acetico da acetil-fosfato con produzione di 3 ATP.

I due acidi sono prodotti in un rapporto che almeno in via teorica è di 1,0:1,5,

Formazione di acido formico ed etanolo, possono alterare il bilancio di fermentazione sopra riportato.

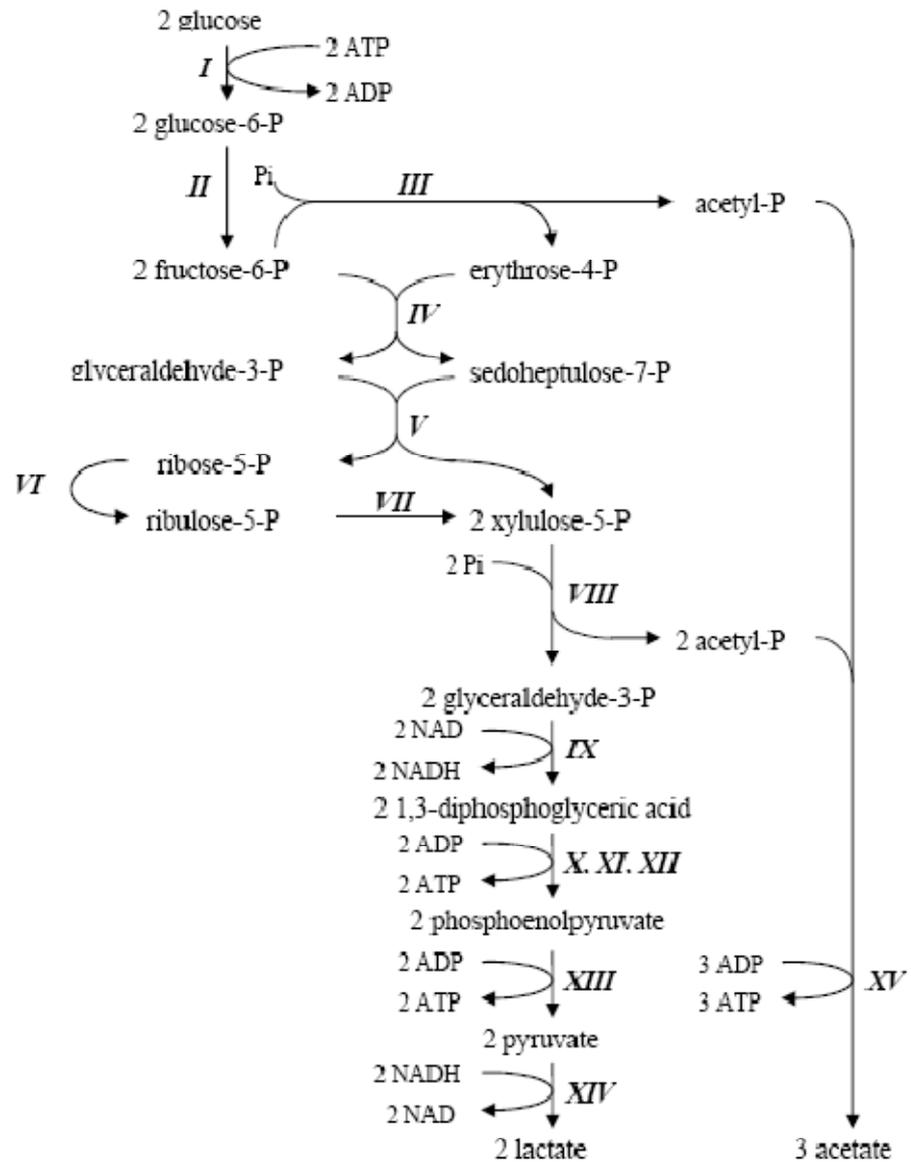


Fig. 5 Pathway del catabolismo del glucosio nel genere *Bifidobacterium*. **I** esochinasi, **II** glucosio-6-fosfato isomerasi, **III** fruttosio-6-fosfato fosfochetolasi, **IV** transaldolasi, **V** transchetolasi, **VI** ribosio-5-fosfato isomerasi, **VII** ribulosio-5-fosfato epimerasi, **VIII** xylulosio-5-fosfato fosfochetolasi, **IX** gliceraldeide-3-fosfato epimerasi, **X** fosfoglicerochinasi, **XI**

fosfogliceromutasi, **XII** enolasi, **XIII** piruvato chinasi **XIV** lattico deidrogenasi, **XV** acetato chinasi.

Naturalmente non è solo il glucosio ad essere la fonte di nutrimento, tutti i monosaccaridi catabolizzati, dopo essere stati opportunamente modificati, vertono nello shunt fruttosio-6-fosfato a diversi livelli.

Il fruttosio, ad esempio una volta internalizzato, viene fosforilato dalla fruttochinasi che genera il fruttosio-6-fosfato.

Il galattosio, dopo essere fosforilato, può essere catabolizzato attraverso due differenti vie: il pathway di Leloir, usato principalmente in fase esponenziale e la via della pirofosforilasi, usata principalmente nelle fasi stazionarie. (Bezkorovainy e Miller-Catchpole 1989).

Il saccarosio può essere idrolizzato da due differenti enzimi con la formazione di due differenti prodotti.

La  $\beta$ -fruttofuranosidasi idrolizza il saccarosio in fruttosio e glucosio, mentre la saccarosio fosforilasi utilizza un pirofosfato per generare fruttosio e glucosio-1-fosfato.

Questa seconda via è energeticamente molto più favorevole rispetto alla prima in quanto genera un prodotto fosforilato con conseguente risparmio di energia (Bezkorovainy e Miller-Catchpole 1989).

Il genere *Bifidobacterium* rappresenta uno dei principali gruppi microbici dell'ecosistema intestinale.

Sono batteri gram-positivi la cui parete cellulare ha una sottile pellicola di peptidoglicano che racchiude in sé polisaccaridi, proteine ed acidi teicoici.

Hanno un alto contenuto di GC (guanina-citosina), sono anaerobi stretti ma la loro sensibilità all'ossigeno varia in funzione ad ogni specie ed ai differenti ceppi di una stessa specie.

Risultano non mobili, asporigeni e traggono energia fermentando carboidrati in acido acetico e lattico senza produrre gas.

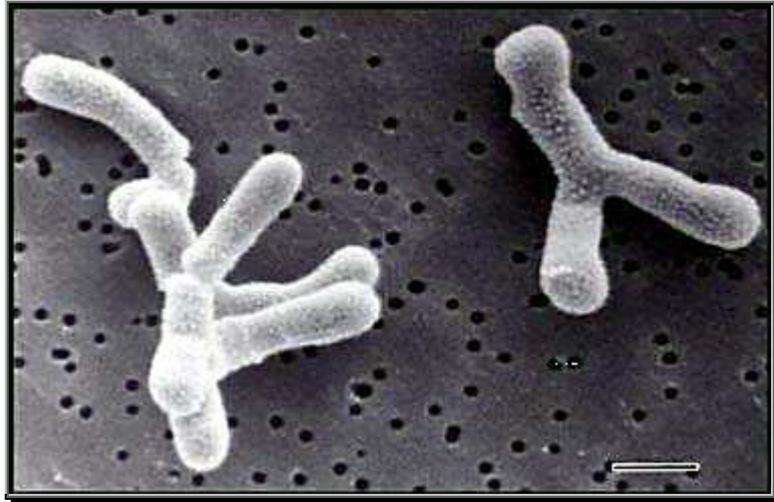


Fig.6 Immagine al microscopio elettronico di *Bifidobacterium*

I bifidobatteri hanno una morfologia cellulare pleiomorfica che comprende bastoncelli curvi, bastoncelli dalle caratteristiche estremità a Y, forme maggiormente ramificate e forme irregolari con rigonfiamenti e protuberanze. Le cause di tale pleomorfismo non sono state completamente chiarite, ma sono riconducibili in gran parte alle condizioni di coltura. La morfologia a bastoncino si osserva generalmente in condizioni nutrizionali e fisiologiche ottimali, generalmente quelle dell'habitat naturale. Le morfologie più ramificate e irregolari invece si originano in risposta a pH acidi, temperature elevate, stress nutrizionali, fonti di azoto o composizioni saline inadeguate, sintesi difettiva della parete cellulare, ma non rappresentano né forme di resistenza, né forme cellulari morenti o degenerate (Bezkorovainy A 1989).

L'optimum della temperatura di crescita è 37-41°C, mentre non esiste possibilità di crescita al di sotto dei 20°C ed al di sopra dei 46°C, la sola

eccezione è dovuta a *B. thermoacidophilum* in grado di svilupparsi in condizioni moderatamente termofile (49,5°C).

Il pH ottimale di crescita è tra 6,5 e 7,0, e nessuna crescita si registra al di sotto di 4,5 od al di sopra di 8,5.

La classificazione tassonomica odierna, che sfrutta l'rRNA16S, identifica 35 specie diverse all'interno del genere *Bifidobacterium* (tab. 1).

Insieme al genere *Gardnerella*, il genere *Bifidobacterium*, è classificato parte della famiglia delle ***Bifidobacteriaceae***, ordine ***Bifidobacteriales***, sottoclasse ***Actinobacteridae***, classe ***Actinobacteria***, linea dei **Firmicuti ad alto GC**, dominio dei **Batteri** (Biavati B.,1986; Biavati B., 2001).

Il genoma di *B. longum* NCC2705, recentemente sequenziato (Thomas Schell, 2002) è costituito da 2.26 Mbp con 1.730 ORF e un contenuto in GC del 60%.

I bifidobatteri sono batteri saccarolitici obbligati che traggono carbonio ed energia fermentando i carboidrati disponibili nell'intestino ad acido acetico ed acido lattico. Per quello che riguarda le fonti di azoto il genere *Bifidobacterium* è piuttosto eterogeneo.

Molte specie (*B. bifidum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. thermophilum*, *B. longum*, *B. pseudolongum*) sono in grado di crescere in presenza di sali di ammonio e cisteina come uniche fonti d'azoto mentre altre necessitano di composti azotati organici.

La sequenza genomica di *Bifidobacterium longum* indica, infatti, che questa specie possiede tutti i geni necessari per la sintesi di almeno 19 amminoacidi a partire da ammonio, utilizzando fosfoenolpiruvato, ossalacetato e fumarato provenienti dal catabolismo dei carboidrati(Thomas Schell, 2002).

<u>Specie</u>	<u>Origine</u>	<u>Specie</u>	<u>Origine</u>
1. <i>B. adolescentis</i>	adulto	19. <i>B. inopinatum</i>	carie dentaria

2. <i>B. angulatum</i>	adulto	20. <i>B. lactis</i>	latte
3. <i>B. animalis</i>	pollo / ratto	21. <i>B. longum</i>	infante / adulto
4. <i>B. asteroides</i>	ape	22. <i>B. magnum</i>	coniglio
5. <i>B. bifidum</i>	bambino	23. <i>B. merycicum</i>	rumine bovino
6. <i>B. boum</i>	rumine bovino	24. <i>B. minimum</i>	acque reflue
7. <i>B. breve</i>	bambino	25. <i>B. pseudocatenolatum</i>	bambino
8. <i>B. catenolatum</i>	adulto	26. <i>B. pseudolongum</i>	suino
9. <i>B. choerinum</i>	lattonzolo	27. <i>B. psychraerophilum</i>	suino
10. <i>B. coryneforme</i>	ape	28. <i>B. pullorum</i>	pollo
11. <i>B. cuniculi</i>	coniglio	29. <i>B. ruminantium</i>	rumine bovino
12. <i>B. denticolens</i>	carie dentaria	30. <i>B. saeculare</i>	coniglio
13. <i>B. dentium</i>	carie dentaria	31. <i>B. scardovii</i>	uomo
14. <i>B. gallicum</i>	pollo	32. <i>B. subtile</i>	acque reflue
15. <i>B. gallinarum</i>	pollo	33. <i>B. suis</i>	suino
16. <i>B. globosum</i>	rumine bovino	34. <i>B. thermoacidophilum</i>	suino
17. <i>B. indicum</i>	ape	35. <i>B. thermophilum</i>	rumine bovino
18. <i>B. infantis</i>	bambino		

Tab. 1 Specie del genere *Bifidobacterium* e loro origine.

In alternativa all'ammonio libero, altre fonti di ammonio possono essere rappresentate da glutamina, asparagina e, nelle specie dotate di ureasi (*B. infantis*, *B. breve*, *B. magnum* e *B. subtilis*), urea (Crociani F., 1982).

Dall'analisi del genoma di *B. longum* si è riscontrata la presenza di tutti gli enzimi necessari alla sintesi di vitamine come acido folico, tiamina e acido nicotinico mentre sono assenti le vie di sintesi per riboflavina, biotina, cobalamina, pantotenato e piridossina.

## **2.2. Ecologia**

L'intestino dei mammiferi, nel quale sono presenti in concentrazioni che raggiungono le  $10^{10}$  cfu ml<sup>-1</sup>, rappresenta sicuramente l'habitat più consono per lo sviluppo dei bifidobatteri.

Nell'uomo i bifidobatteri sono presenti nel colon a tutte le età.

Alla nascita, l'apparato gastrointestinale del neonato è sterile, ma la colonizzazione microbica inizia già nel primo giorno di vita, quando il neonato viene a contatto con i microrganismi del tratto genito-urinario della madre e con quelli presenti nel latte materno o in quello artificiale.

I primi colonizzatori sono batteri anaerobi facoltativi come streptococchi ed enterobatteri, incluso *E. coli*, i quali contribuiscono a generare l'anaerobiosi necessaria alla colonizzazione dei batteri anaerobi.

La successione con cui i gruppi microbici si succedono nella colonizzazione del colon varia enormemente da caso a caso e porta all'instaurarsi di una microflora relativamente stabile in poco più di una settimana, per i bambini nati di parto naturale e allattati al seno, od in tempi leggermente superiori per quelli allattati con latte artificiale.

Nel colon dei bambini allattati con latte materno i bifidobatteri sono i primi anaerobi a subentrare: a partire dal terzo giorno di vita rappresentano il gruppo microbico maggioritario e solo successivamente saranno seguiti nella colonizzazione da *Bacteroides* e *Lactobacillus*.

La rapidità con cui il colon è colonizzato dai bifidobatteri è dovuta alla composizione del latte materno.

Rispetto al latte bovino, infatti, il latte umano contiene una quantità molto superiore di oligosaccaridi che stimolano la crescita di *Bifidobacterium*.

Questi oligosaccaridi hanno DP compreso tra 4 e 9 e sono stati classificati in 9 categorie, in funzione del contenuto glucidico, dei legami glicosidici e delle ramificazioni presenti.

Tutti i 9 gruppi condividono la presenza di una molecola di lattosio all'estremità riducente, legata ad un'unità di N-acetilglucosamina mediante un legame  $\beta$ -(1→3).

Su questo core si innestano catene saccaridiche più o meno ramificate e costituite prevalentemente da unità di galattosio, fucosio, N-acetilglucosamina e acido N-acetilneuraminico (Crociani F., 1982) (fig. 7)

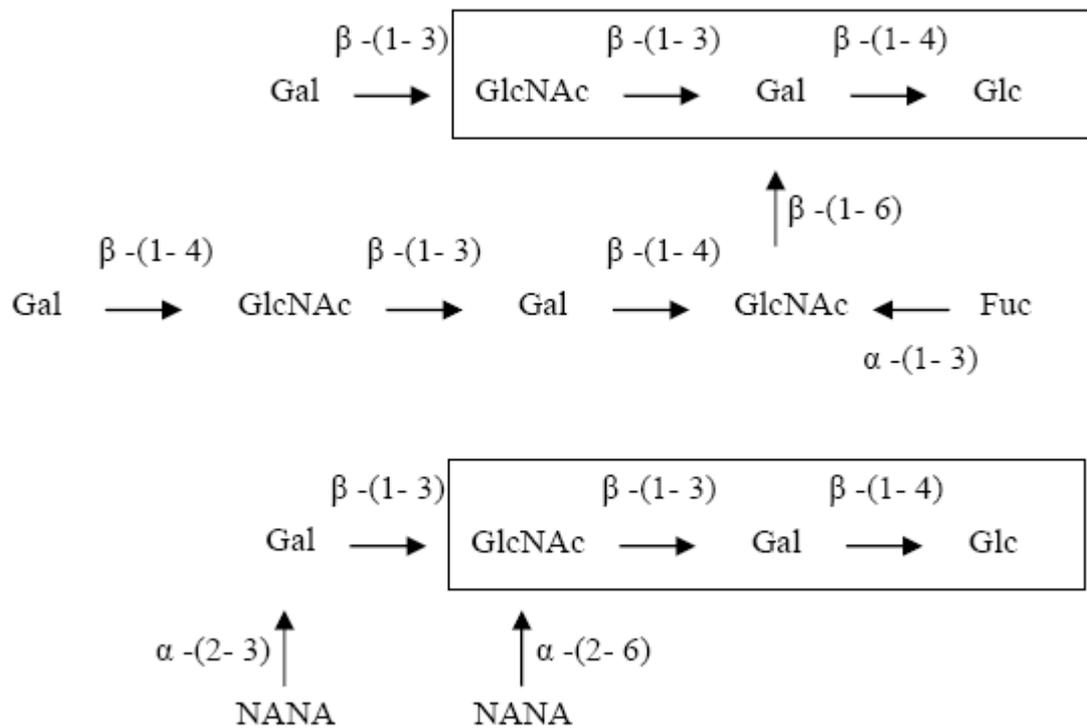


Fig. 7 Oligosaccaridi del latte materno con attività bifidogenica. Glc glucosio,

Gal galattosio, Fuc fucosio, GlcNAc N-acetilglucosamina, NANA acido N-

acetilneuraminico. Nei riquadri il core oligosaccaride.

Sebbene esistano notevoli differenze legate alle caratteristiche dell'ospite, quali fisiologia, età, alimentazione, eventuali patologie e terapie, nel lattante la presenza di bifidobatteri è dell'ordine di  $10^{11}$  cfu  $g^{-1}$ , nell'adulto si stabilizza su valori di  $10^9$ - $10^{10}$  cfu  $g^{-1}$  e nell'anziano si riduce ulteriormente.

I bifidobatteri costituiscono mediamente circa il 12 % dei batteri intestinali totali e non rappresentano il gruppo microbico maggioritario nell'uomo adulto, superati in numero da *Bacteroides* (25 %) ed *Eubacterium* (25 %) e seguiti da peptostreptococchi e fusobatteri (entrambi 9 %).

Anche per quello che riguarda le specie presenti esiste una notevole variabilità da individuo a individuo.

Nell'intestino adulto le specie mediamente più rappresentate sono, nell'ordine, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve* e *B. bifidum*.

I Bifidobatteri esercitano attività che comporta un apporto positivo alla salute dell'ospite, uno di questi apporti importanti da questo punto di vista è l'effetto inibitore sulle altre popolazioni microbiche.

Si è dimostrato che i neonati alimentati con un latte che include *B. bifidum* e *S. thermophilus* hanno una probabilità più bassa di risultare infettati da rotavirus rispetto ai bimbi alimentati con un latte normale.

L'effetto antagonista contro i differenti patogeni includono: *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* ed *Yersinia enterocolitica* fu dimostrato in diverse prove in vitro.

Tuttavia, più che l'appartenenza alle specie, è significativo considerare i diversi ecotipi, organismi che, pur avendo una stessa base genetica, hanno sviluppato adattamenti diversi conformi a habitat e fattori diversi (Y Benno, K Endo, T Mizutani, Y Namba, T Komori and T Mitsuoka "Comparison of Fecal Microflora of Elderly Persons in Rural and Urban Areas of Japan" Vol. 55, No. 5: 1100-1105).

Oltre all'intestino esistono altri ecosistemi animali colonizzati da bifidobatteri, anche se con concentrazioni drasticamente inferiori.

La cavità orale, che ospita infatti *B. adolescentis* e *B. dentium*, quest'ultimo forse coinvolto nella formazione della carie, e nella vagina sono presenti *B. breve*, *B. longum* e *B. adolescentis*.

Per quello che riguarda i bifidobatteri di origine non umana, vanno citate le molte specie isolate dalle feci di conigli, polli, suini, bovini, ratti ed insetti, alcune delle quali sembrano essere caratterizzate da una certa specificità d'ospite. Altre specie infine, *B. minimum* e *B. subtile*, sono state isolate da acque reflue smentendo l'assunto che i bifidobatteri siano presenti esclusivamente nel tratto gastrointestinale degli animali.

### 2.3. Proprietà probiotiche

In virtù dei benefici apportati nell'ospite, i bifidobatteri sono considerati uno dei più importanti gruppi microbici probiotici. Il loro effetto probiotico, nutritivo e terapeutico, è dovuto a svariati meccanismi (Salminen S., 1998; Tannock GV., 1999; Tannock GV., 2002).

Uno dei principali effetti benefici dei bifidobatteri consiste nell'abbassamento del pH del tratto ascendente del colon.

Infatti, il metabolismo dei carboidrati in *Bifidobacterium* produce principalmente acidi acetico e lattico che inibiscono lo sviluppo di molte specie microbiche acido sensibili potenzialmente patogene favorendone l'eliminazione. *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* sono tra i patogeni sensibili all'azione inibitoria dei bifidobatteri.

E' stato dimostrato che la somministrazione di preparati probiotici contenenti bifidobatteri riduce l'incidenza di alcuni tipi di tumori, in particolare di quello intestinale.

Questa azione antitumorale è correlata alla capacità di questi batteri probiotici di metabolizzare composti potenzialmente cancerogeni e di diminuire la quantità di enzimi microbici coinvolti nella produzione di queste sostanze, quali  $\beta$ -glucuronidasi, nitroreduzioni e azoreduzioni.

Infatti, l'acidificazione del pH intestinale inibisce la crescita di molti microrganismi nitrato-riduttori che producono ioni nitrito per riduzione del nitrato, altamente cancerogeno.

Analogamente il metabolismo di *Bifidobacterium* contribuisce a reprimere le specie responsabili della deconiugazione dei sali biliari primari e della loro trasformazione in derivati cancerogeni.

La presenza dei bifidobatteri nel colon ha effetti immunostimolanti, che si traducono in un'aumentata produzione di citochine. La risposta immunitaria nei confronti delle infezioni virali e dell'insorgenza di tumori ne risulta migliorata, così come si verifica un'azione antinfiammatoria particolarmente utile nella prevenzione e nel trattamento delle patologie infiammatorie del colon.

Un ulteriore beneficio apportato da alcune specie di bifidobatteri consiste nella secrezione di aminoacidi e vitamine che saranno disponibili per l'utilizzo da parte del microbiota intestinale o dell'ospite.

In particolare la produzione di acido folico da parte di alcuni ceppi di *Bifidobacterium* risulta di particolare utilità nel prevenire l'insorgenza di forme neoplastiche dei colonociti (Crittenden *et al* 2003).

Infine è stato dimostrato che la somministrazione di yogurt contenente  $10^9$  bifidobatteri  $g^{-1}$  causa una riduzione sostanziale del colesterolo plasmatico totale, sebbene il meccanismo alla base di tale azione non sia ancora stato chiarito.

## **2.4. METABOLISMO DEI CARBOIDRATI NEI BIFIDOBATTERI**

I bifidobatteri possono utilizzare una grande varietà di carboidrati come fonte di carbonio.

Molti di questi composti, quali il glucosio, fruttosio, lattosio, galattosio e saccarosio, vengono utilizzati da tutte le specie appartenenti al genere *Bifidobacterium*.

Altri zuccheri invece, come il mannitolo e sorbitolo, vengono fermentati solo da alcune specie.

Per la degradazione di zuccheri complessi, i bifidobatteri secernono nel periplasma enzimi idrolitici che si occupano di spezzare tali complessi in

composti saccaridici più semplici che possono poi essere internalizzati, ulteriormente idrolizzati e poi fermentati.

I prodotti di tale fermentazione sono principalmente acido lattico, acido acetico ed a volte formiato ed etanolo, ma non gas. (Bezkorovainy e Miller-Catchpole 1989)

In tabella 2 si riportano i principali substrati che caratterizzano alcune specie di bifido batteri

<b>BIFIDUM</b>	<b>ADOLESCENTIS</b>	<b>INFANTIS</b>	<b>BREVE</b>	<b>LONGUM</b>
Glucosio	Arabinosio	Glucosio	Glucosio	Arabinosio
Galattosio	Xilosio	Galattosio	Galattosio	Glucosio
Lattosio	Glucosio	Fruttosio	Fruttosio	Galattosio
e per	Galattosio	Lattosio	Lattosio	Fruttosio
alcuni	Fruttosio	Maltosio	Maltosio	Lattosio
ceppi	Mannosio	Saccarosio	Saccarosio	Maltosio
Saccarosio e	Lattosio	Melibiosio	Melibiosio	Saccarosio
Melibiosio	Maltosio	Salicina	Salicina	Melibiosio
	Saccarosio	Raffinosio	Raffinosio	Raffinosio
	Cellobiosio			
	Melibiosio			
	Raffinosio			

Tab.2 Principali substrati utilizzati dalle differenti specie probiotiche di *Bifidobacterium*

## 2.5. METABOLISMO DEGLI OLIGO E POLI-SACCARIDI

Il colon è un ambiente povero di mono e disaccaridi poiché questi vengono principalmente assorbiti dall'ospite od utilizzati dalla microflora del tratto del colon ascendente.

Molti studi evidenziano il fatto che i bifidobatteri si sono specializzati nell'utilizzo di vari polisaccaridi, che l'ospite non riesce a digerire (Schell et al. 2002).

La natura di questi polisaccaridi è molto varia a partire dai residui glicolitici delle proteine glicosilate alle fibre di origine vegetale.

I principali tipi di oligo e polisaccaridi utilizzati dai bifidobatteri sono l'amilosio, l'amilopectina, gli xilani, i poligalatturonati, gli arabinogalattani, la gomma arabica, l'inulina, i frutto-oligosaccaridi ed il raffinose (Salyers et al. 1978-9, Crociani 1994).

Non tutti i bifidobatteri sono capaci di utilizzare tutti i tipi di polisaccaridi. *Bifidobacterium longum* è capace di utilizzare tutti i composti contenenti arabinosio, ma non è in grado di utilizzare amilosio, amilopectina.

Gli xilani invece sono utilizzati da *Bifidobacterium breve*, *infantis*, *adolescentis* i quali però non riescono ad usare l'arabinosio.

## **2.6. GLICOSIL-IDROLASI**

I Bifidobatteri sintetizzano molti enzimi per idrolizzare diversi tipi di legami saccaridici.

Alcuni di questi enzimi sono stati sequenziati e clonati per poi essere caratterizzati a livello biochimico tra i quali l' $\alpha$ -galattosidasi (Leder et al. 1999), la  $\beta$ -fruttofuranosidasi (Erhmann et al. 2003) e le  $\beta$ -galattosidasi (Rossi et al. 2000).

Le  $\alpha$ -galattosidasi, enzimi intracellulari in forma tetrameric, idrolizzano importanti prebiotici quali raffinose ed altri oligo-saccaridi della soia quali stachiosio e melibiosio.

La  $\beta$ -galattosidasi idrolizza i legami tra glucosio e galattosio presenti principalmente in lattosio e TOS.

Altri studi hanno dimostrato che le  $\beta$ -galattosidasi di *B. bifidum* sono anche capaci di sintetizzare galatto-oligosaccaridi per trans-galattosilazione.

Van Laere dimostrò come le due  $\beta$ -galattosidasi isolate da *B. adolescentis* abbiano differenti specificità di substrato e diversa regolazione dell'espressione genica. (Van Laere et al.2000).

La  $\beta$ -fruttofuranosidasi, od inulasi, idrolizza unità di fruttofuranosio terminali, quindi contribuisce ad idrolizzare frutto-oligosaccaridi, inulina e raffinosa; nei confronti del saccarosio agiscono come invertasi.

Substrati contenenti legami  $\alpha$ -glicosidici o residui che non siano lattosio, non vengono attaccati da tale enzima (Ehrmann et al. 2003); la sua espressione è stimolata dalla presenza di fruttosio (Perrin 2001).

Recentemente si è visto che alcuni ceppi (Rossi et al. 2005) hanno un'attività  $\beta$ -fruttofuranosidica extracellulare, che li renderebbe capaci di degradare le lunghe catene dell'inulina fuori dalla cellula.

## **2.7. ACIDI ORGANICI**

Una volta generato, il piruvato può portare alla formazione di diversi sottoprodotti attraverso differenti vie illustrate in figura 8.

Non sempre il rapporto tra acido lattico ed acetico è 1:1,5.

Ciò è dovuto all'attività dell'enzima fosforoclastico che, con l'aiuto di un fosfato, scinde il piruvato in formiato ed acetil-fosfato.

Rispondendo alle esigenze metaboliche della cellula l'acetil-fosfato può essere utilizzato per produrre ATP o può essere ridotto ad etanolo per rigenerare NAD.

Evidentemente il genere *Bifidobacterium* indirizza il flusso di carbonio verso i suoi prodotti in funzione delle richieste di ATP e NADH legate ai processi metabolici.

Il rapporto acido acetico: acido lattico, come la formazione di altri sottoprodotti, varia in funzione dello stato metabolico della cellula, della specie considerata (Palfram 2003) e dello zucchero presente nel terreno di coltura (De Vries et Stouthamer 1967).

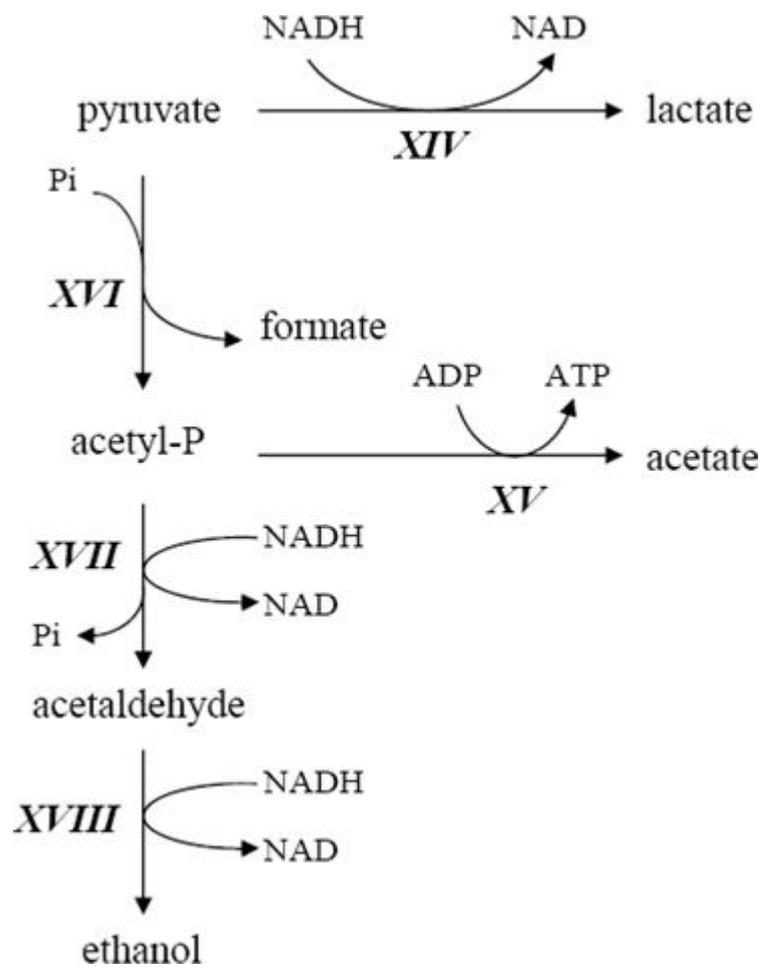


Fig. 8 Formazione di etanolo nel pathway metabolico dei bifidobatteri.

## CAPITOLO 3

# CINETICHE DI COLTURE MICROBICHE

### 5.1. INTRODUZIONE

La crescita di cellule viventi si manifesta con l'aumento della concentrazione delle cellule che può avvenire sotto condizioni fisiche, chimiche e nutrizionali diverse ed è sostanzialmente accompagnata da due fenomeni:

- ➔ Assunzione di nutrienti
- ➔ Rilascio dei prodotti metabolici.

L'equazione generale che descrive l'andamento della biomassa nel tempo è:

$$\frac{dx}{dt} = \mu X$$

X è la concentrazione cellulare

$\mu$  è la velocità specifica di crescita

t è il tempo

Il mezzo di crescita è un sistema a molti componenti, la cui composizione e le cui caratteristiche chimico fisiche (pH, temperatura, forza ionica) sono destinate a variare per effetto dei fenomeni collegati alla crescita cellulare. La prima approssimazione introdotta riguarda la composizione del mezzo di crescita: si ritiene infatti che tutti i componenti, tranne uno siano presenti in concentrazione elevata, la cui eventuale variazione non comprometta la velocità globale del processo; il solo componente in grado di condizionare la cinetica è detto nutriente limitante o substrato limitante.

Va da sé che in alcuni casi non possono essere trascurati gli effetti da inibizione da prodotto di altri componenti che si accumulano nel mezzo.

Per quanto riguarda le caratteristiche chimico-fisiche, si può assumere che esse non subiscano variazioni significative, almeno nell'intervallo di tempo considerato ai fini dello studio e/o della conduzione del processo; nella pratica, si cerca di controllare il sistema di reazione in modo che pH, temperatura ed ossigeno disciolto mantengano valori costanti per l'intera durata del processo.

In generale, la velocità di crescita è legata alla concentrazione di un solo nutriente limitante; negli anni '40, Jacques Monod espresse la relazione funzionale tra velocità di crescita specifica  $\mu$  e concentrazione del substrato limitante  $S$  modificando l'equazione di Michaelis-Menten nella seguente forma:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_s}$$

Questa è quindi nota come equazione di Monod;  $\mu_{max}$  è la massima velocità specifica di crescita,  $S$  la concentrazione del substrato limitante e  $K_s$  la costante corrispondente al valore di  $S$  per cui si ha una velocità  $\mu$  pari a metà di  $\mu_{max}$ .

L'andamento dell'equazione di Monod è del tutto analogo a quello dell'equazione di Michaelis-Menten e per maggiore chiarezza la riportiamo nella figura 9.

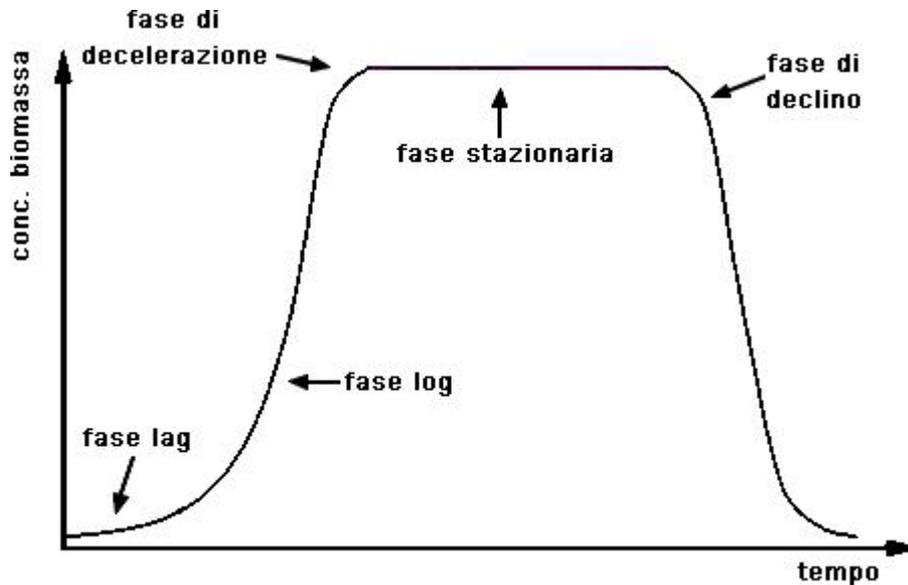


Fig.9 Curva di sviluppo di una coltura batterica

## 5.2. MODALITA' BATCH

I processi batch sono caratterizzati da un sistema chiuso rispetto allo scambio di brodo di coltura con l'esterno.

Dopo l'inoculo non si ha altro apporto di terreno fresco né fuoriuscita di brodo esausto dal fermentatore sino al recupero finale del prodotto.

Tale sistema permette la moltiplicazione cellulare solo per un limitato periodo di tempo durante il quale si verificano progressivi cambiamenti della composizione del terreno di coltura.

Durante la fermentazione la composizione chimica del brodo di coltura cambia a causa del consumo di substrato e dell'accumulo di biomassa e prodotti metabolici.

Il consumo di un nutriente essenziale o l'accumulo di un metabolita inibente determinano il calo della velocità di crescita fino al raggiungimento della fase stazionaria, durante la quale non si ha generazione netta di biomassa a causa dell'equilibrio tra morte e sviluppo cellulare.

Benché lo sviluppo sia cessato, può esserci ancora metabolismo ed accumulo di metaboliti od enzimi nella cellula o nel brodo di fermentazione.

Alimentando con un inoculo un reattore batch contenente un adeguato mezzo di crescita, si verifica che la concentrazione delle cellule inizialmente introdotte varia nel tempo secondo un andamento riportato figura 9 in cui è possibile discriminare cinque fasi.

### **Fase lag**

Inizialmente la concentrazione delle cellule introdotte come inoculo non varia:

questa fase è detta lag, cioè fase di latenza ed è dovuta al processo di adattamento delle cellule, al nuovo ambiente di sviluppo.

Le cellule devono infatti riconoscere quali nutrienti siano presenti e quindi selezionare le adeguate reazioni metaboliche: tutto ciò richiede del tempo perché si compia una sorta di assestamento-adattamento.

Quando il mezzo di crescita contiene più fonti di carbonio, si verificano più periodi di latenza dovuti ai successivi adattamenti del metabolismo cellulare rispetto ai diversi nutrienti; questo fenomeno è noto con il nome di diauxia.

### **Fase esponenziale**

Una volta assestati i meccanismi metabolici, ha inizio la fase di crescita

esponenziale, durante la quale la cinetica è del primo ordine rispetto alla concentrazione cellulare:

$$\frac{dx}{dt} = \mu X$$

Integrando la precedente equazione tra i tempi  $t_0$  dell'inoculo ed un generico tempo  $t$  della crescita, si ottiene

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu t \quad \text{oppure} \quad X = X_0 e^{\mu t}$$

### **Fase di decelerazione**

Man mano che la crescita cellulare sottrae nutrienti all'ambiente e causa il rilascio e l'accumulo di prodotti tossici, la fase di crescita esponenziale subisce una decelerazione: l'ambiente comincia a diventare ostile e la fisiologia delle cellule si predispone a questo cambiamento riducendo la velocità di crescita.

### **Fase stazionaria**

Segue una fase stazionaria durante la crescita cellulare netta è nulla, a causa del preminente effetto legato alla scomparsa di nutrienti e/o all'accumulo di tossine.

Le cellule possono conservare un metabolismo latente pur non riproducendosi.

### **Fase di declino**

Quando infine i fenomeni di inibizione prendono il sopravvento, la crescita della popolazione cellulare diminuisce fino a fermarsi completamente nella fase di declino.

Anche la cinetica di declino segue una legge del primo ordine in cui il consumo del substrato nel tempo è descritto con la seguente equazione:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu}{Y_{X/S}} - mX$$

Dove  $Y_{X/S}$  è la resa di biomassa su substrato escluso ed  $m$  la costante di mantenimento.

Tale curva, nella prima fase, ha un andamento complementare a quella della biomassa fino ad arrivare a zero senza più risalire.

L'equazione generale che descrive l'andamento della formazione di prodotto è:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha\mu + \beta X - K_d P$$

Dove  $K_d$  è il termine di degradazione del prodotto.

Per prodotti legati alla crescita  $\alpha > 0$ , per i metaboliti secondari  $\beta > 0$ .

### **5.3. MODALITA' CONTINUA**

La fermentazione continua avviene alimentando la coltura con un uniforme apporto di terreno fresco con un flusso  $F_0$  ed un efflusso di terreno esausto  $F_s$  con la stessa portata; gli stessi valori di velocità di entrata ed uscita garantiscono il mantenimento di un volume di fermentazione costante.

La modalità continua viene utilizzata per ottenere uno stato stazionario nel quale tutti i parametri (pH, T, DOT, Redox, Stiring,  $OD_{600}$ , Volume) sono, appunto stazionari; in questo modo la composizione chimica del terreno uscente è sempre uguale nel tempo.

In questo stato, anche il metabolismo cellulare è stabile, non soggetto a variazioni nel tempo.

Operando in questo modo lo sviluppo può continuare per lunghi periodi, in quanto la coltura raggiunge uno stato stazionario (steady-state) in cui concentrazione cellulare, concentrazione del substrato e del prodotto, velocità specifica di sviluppo ed ambiente colturale rimangono costanti nel tempo.

Lo scopo di una fermentazione continua è quindi di prolungare la fase esponenziale di crescita di una coltura discontinua.

Ciò è reso possibile sia dall'apporto di nutrienti che dall'eliminazione di sostanze tossiche e delle cellule morte prodotte durante l'incubazione.

Un processo fermentativo continuo viene avviato, dunque, a partire dalla fase esponenziale di una fermentazione batch.

Nell'istante in cui viene avviata la fermentazione continua, si possono definire delle equazioni di bilancio per la biomassa, per il substrato limitante e per il prodotto.

L'equazione generale che descrive l'andamento nel tempo della biomassa X, è:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{F}{V}X + \mu X = 0$$

Dove  $F/V$  è per definizione il fattore di diluizione

Si ottiene che allo stato stazionario la velocità di sviluppo eguaglia la velocità di diluizione  $\mu=D$ .

## 5.4. CRESCITA MICROBICA SU MISCELE DI SUBSTRATI

In natura le condizioni ambientali sono quelle in cui il microrganismo si trova in presenza di miscele complesse di nutrienti.

Nel colon, il microbiota intestinale si trova ad utilizzare come fonte di carbonio una miscela eterogenea di oligo e polisaccaridi.

In vitro il comportamento dei microrganismi, in presenza di miscele binarie o complesse di nutrienti, può essere classificata in tre categorie:

- *Consumo sequenziale indipendente dalle condizioni dell'inoculo (diauxia):* i substrati vengono consumati in sequenza, uno alla volta; l'ordine con cui i substrati vengono metabolizzati è indipendente dal substrato utilizzato dalla precoltura. La curva di crescita mostra fasi esponenziali alternate da periodi di adattamento.
- *Consumo simultaneo indipendente dalle condizioni dell'inoculo:* i substrati sono consumati simultaneamente, durante un' unica fase di crescita, indipendentemente dal substrato utilizzato dalla precoltura.
- *Consumo dipendente dalle condizioni dell'inoculo:* il substrato su cui è stato cresciuto l'inoculo influisce sul comportamento della coltura, sulla velocità di crescita e sul successivo pattern di utilizzo dei substrati.

Nei batteri, numerosi meccanismi molecolari sono responsabili delle diverse dinamiche di consumo dei substrati, in particolare delle fonti di carbonio.

Tali meccanismi sono stati evolutivamente selezionati perché consentono alla cellula un notevole risparmio energetico.

## CAPITOLO 4

### CROMATOGRAFIA PLANARE

#### 4.1. STORIA DELLA CROMATOGRAFIA

- Negli anni '30, la cromatografia di assorbimento su colonna, ideata da Tswett (1872-1919) risultava un tecnica separativa estremamente utile per l'analisi di miscele di origine naturale ed estratti vegetali.
- Contemporaneamente, la necessità di disporre di una tecnica alternativa che fosse in grado di identificare in modo rapido tali miscele, una volta separate, portò all'ideazione di un sistema cromatografico "aperto", la TLC (Thin Layer Chromatography).
- **1938.** Izmailov e Shraiber (Izmail N., Schraiber M., 1966) documentano la separazione di una miscela di alcaloidi di *Atropa belladonna L.* su di uno strato sottile adsorbente e planare. Piccole quantità di campione furono applicate al centro del piatto sottoforma di spot e lasciate eluire con differenti solventi per identificare la migliore separazione. La novità del metodo stava nella estrema rapidità di separazione ed identificazione dei componenti del campione e nelle piccole quantità di fasi stazionaria e mobile impiegate.

- **1944.** Gordon, Consen e Martin (Consden R., Gordon AH., Martin AJP., 1944) utilizzarono un differente approccio della cromatografia di partizione. Questo si concretizzò con l'impiego della carta come fase stazionaria, che divenne rapidamente una tecnica cromatografica universale. La TLC non segnalò progressi significativi sino agli anni '50 quando furono apportate modifiche significative
- **1951.** Kirchen, Miller e Keller incorporarono alla fase stazionaria un indicatore fluorescente. In questo modo il gel di silice divenne la fase adsorbente più utilizzata.
- **1956.** Stahl introdusse il termine *Thin-layer chromatography*. Merck ideò strati sottili costituiti da ossido di alluminio, Kieselguhr e gel di silice con specifiche ben precise suggerite dallo stesso Stahl e Desaga immise sul mercato un kit-base di cromatografia planare.
- **1962.** Stahl, pubblicò il libro *Thin layer Chromatography: A Laboratory Handbook* in cui riassunse tutte le conoscenze di carattere cromatografico.
- Fine anni '70 . Vennero commercializzati strati sottili di qualità riproducibile definiti High-performance layer HPTLC. Lo sviluppo rapido della tecnica è quindi giustificabile grazie ad un solido fondamento di carattere teorico ed alla comparsa di una valida tecnica di rivelazione delle sostanze dovuta alla densità ottica. Quest' ultima caratteristica permise uno sviluppo di carattere quantitativo della tecnica

- Fine anni '80. Migliorie di ordine strumentale furono apportate alla tecnica per assisterla in tutti i suoi steps critici e contributi di carattere teorico furono apportati da Snyder, Kaiser, Ebel e Geiss.
  
- **1987.** Geiss pubblicò *Fundamentals of Thin-layer Chromatography* che a tutt'oggi continua a rimanere un manuale fondamentale della tecnica.
  
- **1988.** Fù fondato *The Journal of Planar Chromatography* pubblicazione di importante confronto e discussione di tutti gli aspetti della moderna cromatografia planare.
  
- High-performance thin-layer chromatography, allo stato attuale, significa l'opportunità di eseguire analisi di carattere quali-quantitativo grazie alla combinazione dei seguenti fattori:
  - Una strumentazione moderna e tecnologicamente avanzata (apporto di carattere tecnologico)
  
  - Fondamenti di carattere teorico decisamente solidi (apporto di carattere scientifico)
  
  - Una buona metodologia di standardizzazione delle analisi (apporto importante dal punto di vista delle prestazioni).

## **4.2. CONCETTI DI CARATTERE TEORICO**

Prima di affrontare argomenti legati alla strumentazione a disposizione della tecnica analitica, si desidera descrivere i processi molecolari che sono alla

base della cromatografia, per una migliore comprensione della dinamica a cui sono sottoposte le molecole che compongono il sistema cromatografico stesso.

## Principi generali di cromatografia

La cromatografia, come tecnica separativa, si basa sulla "affinità" dei componenti che costituiscono il campione nei confronti della fase stazionaria e della fase mobile.

Per ogni sostanza è possibile definire un **Coefficiente di Partizione** che definisce il rapporto tra le concentrazioni (anche se sarebbe più corretto parlare di attività) della sostanza stessa rispettivamente nella fase stazionaria  $c_s$  e nella fase mobile  $c_m$ :

$$K = c_s / c_m$$

A volte lo troviamo anche riportato come Fattore di capacità in cui si riportano i tempi di permanenza e non le concentrazioni del soluto nelle due fasi, ma è una grandezza più consona all'HPLC.

Il concetto di ripartizione è facilmente compreso se si pensa che la sostanza in questione ha, grazie alla sua natura, una differente solubilità rispetto alle due fasi.

Dopo un certo tempo, che è definibile come il tempo necessario affinché si raggiunga un equilibrio di distribuzione della sostanza nel sistema cromatografico, il valore di K diviene costante ed assume un valore

caratteristico atto ad individuare la sostanza stessa che la distingue dalle altre presenti nel campione.

Nonostante esista una condizione dinamica, dettata dalla mobilità di una delle due fasi, la sostanza da separare, tenta di raggiungere il suo equilibrio di distribuzione, quindi per un certo tempo la troveremo bloccata sulla superficie della fase stazionaria e per un certo tempo la troveremo in movimento grazie all'interazione con la fase mobile.

In questo modo risulterà che sostanze da separare all'interno di uno stesso sistema cromatografico, possiedono un differente coefficiente di ripartizione, si muovono con la stessa velocità che è governata dalla fase mobile, ma grazie a solubilità diverse, restano nelle due fasi con tempi diversi e quindi a parità di tempo di eluizione percorrono diverse distanze dello strato sottile.

A questo punto risulta comodo definire una nuova grandezza cromatografica che indica lo spazio percorso dalle sostanze sullo strato sottile e che si definisce come **fattore di ritenzione (retention factor)  $R_f$** .

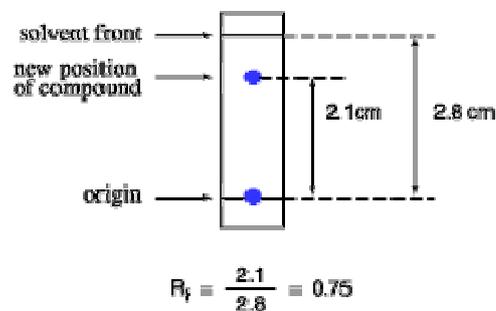


Fig.10 Esempio del calcolo del fattore di ritenzione

Si tratta di una grandezza relativa in quanto generata dal rapporto tra due distanze, lo spazio percorso dalla sostanza calcolato dal punto di

deposizione e lo spazio percorso dall'eluente preferibilmente calcolato rispetto alla linea di immersione.

Detto questo quindi, risulta importante per avere risultati riproducibili, non solo la posizione di applicazione ma anche il livello di immersione del piatto nella fase mobile.

In questo modo è possibile confrontare sostanze standard ed incognite utilizzate in uno stesso sistema cromatografico in quanto questa grandezza le accomuna.

I suoi valori sono compresi tra 0 ed 1 e sono legati alle condizioni cromatografiche ed alla matrice ed ha senso calcolarlo su cromatogrammi che si sono ottenuti da una sola eluizione.

E' ormai di uso comune l'utilizzo degli  $R_f$  in valore percentuale

$$hR_f = 100R_f$$

Per lavori di carattere teorico, si utilizza un secondo termine utile per definire le relazioni ritenzione-struttura:

$$R_m = \log \frac{(1 - R_f)}{R_f}$$

$R_m$  è definito **fattore di capacità**.

Tornando alla ritenzione dal punto di vista molecolare, è importante considerare l'incidenza di una molteplicità di cause che concorrono a determinare il valore finale  $R_f$

1. dimensione e tipo della camera
2. natura e dimensione dello strato
3. direzione del flusso della fase mobile
4. il volume e la composizione della fase mobile

5. condizioni di equilibrio umidità
6. metodo di preparazione del campione

Infatti le molecole interagiscono con tutto ciò che le circonda e ci sono vari tipi di interazioni che governano i meccanismi più rilevanti della TLC e che saranno descritti di seguito.

Prima di concludere osserviamo che i fattori di capacità e ritenzione sono legati dalla seguente relazione

$$K=1-R_f/R_f$$

### 4.3. ADSORBIMENTO

Nella cromatografia di adsorbimento la fase stazionaria è solida e generalmente la sostanza di interesse rimane legata ad essa a causa di una varietà di interazioni specifiche e non.

Materiale adsorbente come l'ossido di alluminio, il gel di silice od altro materiale di carattere inorganico sono dotati di un'ampia superficie "interna" grazie alla loro struttura porosa.

La loro superficie è eterogenea e disponibile a legarsi con molecole di campione attraverso interazioni dipolo-dipolo od interazioni acido-base (Lewis), legame idrogeno e/o interazioni ioniche.

Il grado di ritenzione di una sostanza si basa sul numero e sul tipo di gruppi funzionali interessati ed in modo non secondario sulla struttura di carattere sterico.

In **fase normale** la fase mobile è solitamente un solvente organico e meno polare della fase fissa, per di più le molecole di fase mobile vengono

anch'esse adsorbite dalla fase stazionaria e quindi entrano in competizione con quelle della sostanza di interesse.

Una descrizione decisamente ostica (trattazione dal punto di vista matematico) dell'adsorbimento, la possiamo trovare espressa da due importanti modelli:

Il modello della competizione espresso attraverso l'equazione di **Snyder-Soczewinsky** (Snyder LR., 1968; Soczewinski E., 1969)

In breve si può descrivere questo modello dicendo che, si considerano le interazioni tra le molecole di solvente ed i siti nei quali si trovano adsorbite sulla fase fissa e le interazioni delle molecole della sostanza da separare ed i siti liberati dal solvente.

Quindi questa equazione è una espressione della competizione solvente-analita nei riguardi della fase fissa dal punto di vista matematico.

Il modello della interazione con il solvente di **Scott e Kucera** (Scott RPW, Kucera P., 1978; Conway WD., 1990) dove, in questo secondo caso, si studiano le sole interazioni fase mobile-analita.

#### **4.4. PARTIZIONE**

La **cromatografia di partizione** utilizza le differenti solubilità della sostanza di interesse in due solventi immiscibili.

La fase stazionaria liquida è immobilizzata su di un solido, solitamente un supporto poroso inerte, per adsorbimento o tramite un legame di ordine chimico.

Sistemi dinamici di partizione possono essere generati se un componente della fase mobile viene molto più fortemente adsorbito o bagna la superficie meglio degli altri componenti, in questo caso la fase stazionaria si genera grazie all'azione del solvente.

Ad esempio l'acqua forma una sorta di multistrati sia su gel di silice che su cellulosa quando bagna la fase stazionaria e la troviamo mescolata ad un solvente organico, questi sistemi risultano adatti a separare miscele di sostanze polari e solubili in acqua.

Alle fasi mobili di questo tipo si possono addizionare soluzioni acide, basiche o tampone per separare le sostanze analitiche che altrimenti rimarrebbero indissociate e che quindi non risulterebbero discriminabili.

Le fasi stazionarie più recenti per la cromatografia di ripartizione sono chimicamente legate al gel di silice che funge da supporto.

Le **fasi inverse (RP)** e le **fasi polari legate (PBP)** le si può immaginare come uno strato liquido monomolecolare su di un supporto solido.

I sistemi RP consistono di una fase stazionaria apolare ed una mobile polare, la ritenzione in tali sistemi può essere descritta attraverso il concetto di "solvofobicità" di Horvath (Horvath CS., 1976).

A causa della loro natura parzialmente idrofobica, le molecole organiche vengono "espulse" dalla fase mobile acquosa ed "incorporate" nella fase stazionaria lipofila, in funzione della lunghezza della catena carboniosa, della assenza o meno di ramificazioni e dell'ingombro sterico.

Le fasi legate ciano, amino e diolo (PBP), possiedono una abilità intrinseca ad "ingabbiare" il campione attraverso i gruppi funzionali dello stesso.

## **4.5. FORMAZIONE DI COMPLESSI**

Un altro possibile meccanismo di ritenzione può essere la formazione reversibile di un composto di coordinazione tra acidi e basi di Lewis, quindi la fase stazionaria può essere impregnata con questi composti, dotati o che necessitano di doppietti elettronici (ioni metallici  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  o acido picrico, caffeina).

Questi sistemi sono in grado di separare composti in funzione del loro grado di insaturazione e degli effetti sterici, come i composti cis-trans.

Per i composti chirali è pensabile di immobilizzare un selettore chirale, come può essere l'idrossiprolina, nella fase stazionaria e che possono formare composti di coordinazione con amminoacidi enantiomerici.

#### **4.6. EFFICIENZA, DIFFUSIONE, SELETTIVITA' E RISOLUZIONE.**

Le grandezze che saranno di seguito descritte risultano essere fondamentali per comprendere i meccanismi attraverso i quali si "muove" la cromatografia planare.

In maniera semplice e rapida si può dire che il tempo che trascorre affinché il campione raggiunga un equilibrio dinamico tra le fasi del sistema cromatografico ha un valore finito ed in questo lasso di tempo la fase mobile avanza per un certo tratto di lastra.

Questa distanza la si definisce **altezza del piatto teorico H**.

Questa definizione viene presa in prestito dalla teoria della separazione per distillazione in cui assume un significato simile a questo.

Dal punto di vista fisico, l'altezza equivalente di un piatto teorico si aggira attorno ai 10-100  $\mu\text{m}$ , oppure possiamo anche definire H come l'efficienza del sistema cromatografico, cioè la capacità di fornire picchi stretti e simmetrici.

Legata alla definizione di piatto teorico troviamo anche quella di **numero di piatti teorici N**, dove:

$$N = \frac{L}{H}$$

in cui la grandezza L rappresenta la distanza percorsa dall'eluente durante la separazione.

Sia il numero che l'altezza dei piatti sono un indice dell'**efficienza** di una separazione ed N può essere calcolato utilizzando un picco e presupponendo che abbia una forma gaussiana.

Tanto minore sarà il valore di H, tanto maggiore sarà l'efficienza del sistema cromatografico.

Per raggiungere tale scopo si usano:

- particelle della fase stazionaria più piccole
- basse velocità di flusso della fase mobile
- fasi mobili poco viscosi

A queste condizioni esistono dei limiti fisici che possono essere descritti in maniera chiara dall'equazione di Van Deemter

Per un calcolo pratico del numero di piatti di un sistema cromatografico si possono utilizzare sia la larghezza alla base che a metà altezza di uno dei picchi ottenuti dall'eluizione di interesse.

Se dobbiamo separare due sostanze è necessario che queste abbiano due coefficienti di ripartizione diversi e che il **fattore di selettività  $\alpha$**  risulti maggiore di 1:

$$\alpha = K_1/K_2 \quad (K_1 > K_2)$$

dove  $K_i$  rappresentano le costanti di ripartizione delle  $i$ -esime sostanze.

Per aumentare il valore di  $\alpha$  si possono variare i seguenti parametri:

- la composizione della fase mobile
- il pH della fase mobile
- la fase stazionaria

➤ la temperatura

## 4.7. DIFFUSIONE DELLA BANDA CROMATOGRAFICA

In tutte le tecniche cromatografiche, il campione che si distribuisce tra fase fissa e mobile è sottoposto ad un processo di diffusione che produce un allargamento della banda cromatografica finale.

I contributi che influenzano tale comportamento sono di diversa origine, quando la fase mobile attraversa un letto di particelle densamente impaccate, il flusso non risulta omogeneo e le molecole di soluto sono o più veloci o più lente rispetto alla velocità media di spostamento della maggior parte del soluto.

Questo processo, noto come **diffusione vorticoso o tortuosità dei percorsi**, può essere tenuto sotto controllo solo da una buona qualità di impaccamento della fase stazionaria ed è indipendente dalla velocità del flusso.

L'effetto della **diffusione longitudinale**, invece, è legato non tanto alla qualità dell'impaccamento quanto all'ampiezza della distribuzione delle dimensioni delle particelle ed è inversamente proporzionale al flusso in quanto diminuendone la velocità il soluto ha più tempo a disposizione per diffondere.

Se osserviamo una fessura tra due particelle di fase stazionaria, si vede chiaramente che le molecole che scorrono più vicino alle particelle, procedono più lentamente rispetto a quelle che si muovono al centro del canale ed in questo caso si parla di **trasferimento di massa** e l'effetto a

livello macromolecolare è dato dal flusso laminare in accordo con la legge di Hagen-Poiseuille.

Maggiore è la dimensione delle particelle, maggiore è la larghezza dei canali e quindi maggiore sarà la differenza di velocità fra il liquido a ridosso delle pareti e quello al centro del canalicolo.

Il **trasferimento di massa in fase mobile stagnante** è dovuto al fatto che ci sono particelle di fase mobile che rimangono bloccate nei pori della fase stazionaria e quindi rimpiazzate con grande difficoltà, è un fattore che aumenta all'aumentare della dimensione delle particelle e con il diminuire del coefficiente di diffusione del soluto in fase mobile.

E' ovvio che più piccolo è il coefficiente di diffusione e più grande è il diametro delle particelle maggiore è la profondità a cui le molecole di soluto penetrano entro la particella e quindi maggiore sarà l'allargamento del picco.

Si parla anche di **trasferimento di massa in fase stazionaria** in cui le particelle diffondono a diverse profondità.

Anche per questo contributo all'altezza del piatto teorico, importanti fattori sono il tipo e la forma delle particelle che costituiscono la fase fissa, la velocità relativa di migrazione del soluto nella fase mobile e lo spessore della fase stazionaria permeabile al soluto, la velocità lineare media della fase mobile ed il coefficiente di diffusione del soluto nella fase stazionaria.

La combinazione di tutti questi effetti produce picchi che si allargano progressivamente all'aumentare del tempo di separazione.

Un elemento chiave di gestione di questi effetti è la velocità di flusso della fase mobile, infatti se questa è troppo bassa allora gioca un ruolo fondamentale la diffusione longitudinale ed il caso estremo di tutto questo si esprime in una separazione mancata quando la fase mobile è stagnante. All'opposto, se la velocità della fase mobile è troppo alta, la fase mobile stagnante ed il trasferimento di massa in fase stazionaria sono gli effetti che prevalgono.

L'ideale è un corretto valore di velocità di flusso che può essere calcolato attraverso una delle equazioni più importanti nella cromatografia:

l'equazione di **Van Deemter**.

#### **4.8. EQUAZIONE DI VAN DEEMTER**

E' un'equazione di fondamentale importanza in quanto tiene conto di tutte le componenti che concorrono all'allargamento della banda cromatografica e le mette in relazione con l'altezza di piatto teorico.

$$H=A+B/u+Cu$$

dove H è l'altezza equivalente del piatto teorico, A è la costante che tiene conto della diffusione vorticoso e del trasferimento di massa in fase mobile, B è la costante in cui si riporta l'effetto della diffusione longitudinale, C riguarda la fase mobile stagnante ed il trasferimento di massa in fase stazionaria ed u è la velocità di flusso in cm/sec.

Tali costanti dipendono dalle caratteristiche del solido microporoso che compone la fase stazionaria, dalla natura della fase mobile e del soluto ed infine dalla temperatura del sistema.

Si possono calcolare le costanti attraverso le seguenti relazioni

$$A=2\lambda d_p$$

dove  $d_p$  è il diametro della particella e  $\lambda$  dipende dall'impaccamento delle particelle nella fase stazionaria, è una sorta di fattore di tortuosità.

$$B=2\gamma D_m$$

$\gamma$  è il coefficiente legato alla distribuzione delle particelle nella fase fissa o fattore di ostruzione,  $D_m$  è il coefficiente di diffusione del soluto nella fase mobile

$$C=\omega d_p^2/D_m$$

dove  $\omega$  è un fattore che dipende dall'impaccamento delle particelle e dal tipo di fase stazionaria

$$D=Q U d_f^2/D_s$$

dove  $d_f$  è lo spessore della fase stazionaria,  $D_s$  è il coefficiente di diffusione del soluto nella fase stazionaria, mentre  $Q$  è un fattore che dipende dal tipo e dalla forma delle particelle che costituiscono la fase fissa ed  $U$  è una costante legata alla velocità relativa di migrazione del soluto nella fase mobile.

Le tre componenti vengono riportate separatamente nella figura e l'iperbole in azzurro ha come asintoti l'asse delle ordinate e la retta  $y = Cu + A$  ed è la risultante dei loro contributi.

Come si nota a velocità estremamente basse è il termine  $B/u$ , cioè quello relativo alla diffusione longitudinale, che dà il maggior contributo all'HEPT, e ciò è ovvio perché a flussi bassi vi è più tempo a disposizione per la diffusione.

A velocità elevate diventa invece importante il termine  $Cu$  legato a trasferimenti di massa in fase mobile e stazionaria.

Il coefficiente  $A$  è legato alla disposizione delle particelle nella colonna: un buon impaccamento e molto regolare costituita da particelle di forma e

dimensioni simili, o meglio uguali, non ha cammini preferenziali con diversa tortuosità e quindi ha il coefficiente A basso.

Il coefficiente C può essere diminuito agendo sul tipo e sulla dimensione delle particelle.

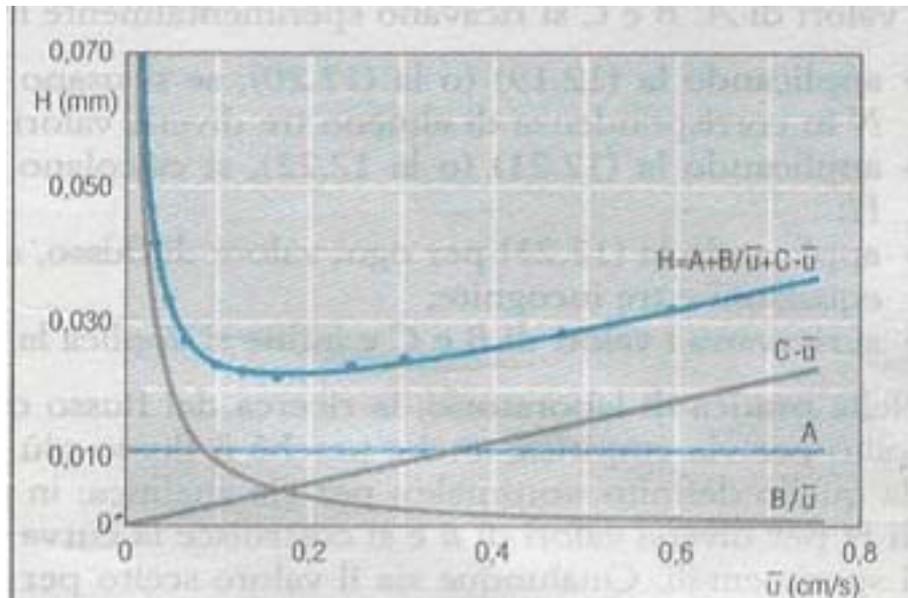


Fig.11 Grafico relativo all'equazione di Van Deemter

## 4.9. Separazione e Risoluzione

Sino ad ora abbiamo visto che per aumentare la risoluzione si può aumentare l'efficienza, cioè fare in modo che sia minimo l'allargamento delle bande dei soluti; abbiamo analizzato i fattori da cui dipende l'efficienza e per caratterizzarla quantitativamente abbiamo introdotto il concetto di numero di piatti teorici.

Un altro modo per migliorare la risoluzione di una separazione consiste nell'aumentare la differenza tra gli  $R_f$ , ossia nel rendere più selettivo lo strato sottile.

Cambiare lo strato sottile significa cambiare i coefficienti di ripartizione e quindi aggiustare il valore di selettività a

La separazione di due composti può essere espressa come **Risoluzione** tra i corrispondenti picchi ottenuti in un cromatogramma.

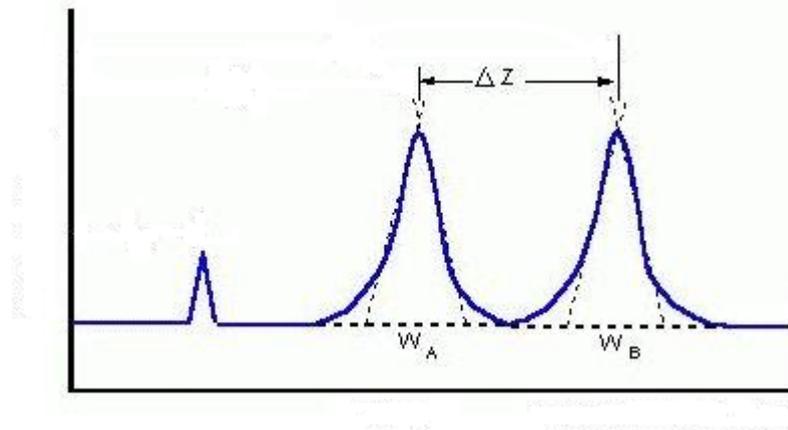


Fig.12 Risoluzione tra due picchi

$$R_s = \frac{z_2 - z_1}{\frac{1}{2}(w_1 + w_2)}$$

dove  $R_s$  è la risoluzione,  $z_i$  sono le distanze di migrazione e  $w_i$  sono le ampiezze delle bande delle sostanze.

Per separazioni soddisfacenti  $R_s$  si aggira attorno all'unità come valore ed il valore ottimale è 1,25, quando invece è inferiore a 1 le separazioni non sono buone.

Snyder, assumendo profili di concentrazione gaussiane di due macchie cromatografiche molto vicine, ha elaborato la relazione nel seguente modo:

$$R_s = \frac{1}{4}(\alpha - 1)(R_f N)^{\frac{1}{2}}(1 - R_f)$$

Dove  $R_s$  è la risoluzione,  $\alpha$  è il fattore di selettività,  $N$  è il numero di piatti e  $K$  è il fattore di capacità.

Il primo fattore riportato tra parentesi è legato alla **selettività** del sistema, quindi ai coefficienti di distribuzione di due soluti in esame tra la fase stazionaria e quella mobile.

La distribuzione è un termine usato in senso generale e significa partizione, adsorbimento o qualsiasi altro fenomeno dipendente dal meccanismo di ritenzione, inoltre risulta il termine più facilmente controllabile, in quanto una corretta combinazione delle fasi è responsabile di una buona risoluzione.

Si sfruttano quindi le interazioni selettive che coinvolgono soltanto uno dei due soluti sfruttando le sue caratteristiche chimiche peculiari.

Cambiando la composizione della fase mobile si influenza la selettività del sistema, oppure usando una diversa fase stazionaria si passa ad un differente principio di separazione.

Il secondo fattore, in cui compare  $N$ , è il termine legato all'**efficienza** che quindi dipenderà dalla distanza di migrazione del fronte del solvente e dall'altezza del piatto teorico (qualità dell'impaccamento dello strato sottile e distribuzione della dimensione delle particelle stesse).

Ma dipende anche dalla velocità della fase mobile, cosa che in cromatografia planare tradizionale non è possibile gestire, quindi si è passati all'utilizzo di particelle della fase fissa più piccole e meno porose e questo contribuisce a diminuire sia  $A$  che  $C$  e rendere l'impaccamento uniforme e regolare per diminuire  $A$ .

In TLC, la distanza di migrazione di ogni composto è associata ad un differente numero di piatti teorici  $N$

L'ultimo termine tra parentesi, in cui si riporta il coefficiente di partizione, dipende dalla forza del solvente della fase mobile.

Solventi "deboli" producono coefficienti di partizione più grandi, ed al suo aumentare si migliora la risoluzione, esiste però un limite, in quanto K maggiori di 5 migliorano solo marginalmente la risoluzione in quanto predomina l'allargamento della banda.

La migrazione del soluto si ottiene utilizzando un solvente nel quale le caratteristiche chimiche e fisiche del soluto siano intermedie tra quelle del solvente e quelle della fase fissa.

In quest'ottica esistono due possibilità:

- fase fissa polare, fase mobile apolare, soluto con proprietà intermedie.
- Fase fissa apolare, fase mobile polare, soluto con proprietà intermedie.

#### 4.10. LA FASE STAZIONARIA

Un sistema relativamente razionale di classificazione delle fasi stazionarie viene riportato nella tabella 3:

CLASSIFICAZIONE	CLASSE GENERALE	TIPO
1	polare inorganico (idrofilico)	silice, allumina, magnesio
2	non-polare inorganico	grafite, carbone

3	fasi legate polari	amminopropile (C <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> ), cianopropile (C <sub>3</sub> CN), fase diolo (OCH <sub>2</sub> CHOHCH <sub>2</sub> OH)
4	fasi non-polari legate	C <sub>8</sub> , C <sub>18</sub> fasi legate
5	organico polare	cellulosa, chitina, poliammide

Tabella 3. Classificazione fasi stazionarie

Oggi, il gel di silice è la fase più ampiamente utilizzata e risulta anche impiegata come base per le fasi legate.

Ma prima di procedere ad una veloce descrizione delle caratteristiche salienti dei costituenti della fase stazionaria desidero soffermarmi sul concetto di **adsorbente**.

L'adsorbente innanzitutto deve avere un'ampia superficie, se ad esempio consideriamo un grammo di silice questo può essere posto in un cubo poco più grande di un centimetro.

Questo ha una superficie di sei centimetri quadrati e se lo smembramo in 1000 cubi di lato un millimetro, la risultante superficie sarà di 6000 millimetri quadrati, pari a 60 centimetri cubici.

Procedendo in questo senso, lo smembramento in cubetti di 5 micrometri di lato (che indicativamente è la dimensione media particellare della fase stazionaria) si arriverà ad avere una superficie complessiva di 1,5 metri quadrati, dimensione che se vogliamo rendere tangibile è pari ad un tavolo da cucina.

Se poi consideriamo anche il fatto che il gel di silice è poroso allora la sua superficie si aggira attorno ai 450 m<sup>2</sup>.

#### 4.10.1. GEL DI SILICE

Il biossido di silicio viene sciolto in silicato con carbonato od idrossido di sodio, se acidifichiamo tale soluzione si idrolizza ad acido silicico  $\text{Si}(\text{OH})_4$  che polimerizza spontaneamente per disidratazione ad un idrosol di piccolissime sfere di acido polisilicico.

Le particelle di questo aggregato colloidale vengono setacciate per raggrupparle in base alla dimensione e per ottenere dimensioni più uniformi l'idrosol che si forma può essere emulsionato in un solvente organico immiscibile.

Il prodotto di questo processo, quindi, è un solido amorfo e poroso la cui area superficiale, può variare da 200 a 1000  $\text{m}^2/\text{g}$ .

Lo strato di un comune piatto TLC è composto da particelle con dimensione attorno ai 15-20  $\mu\text{m}$  mentre nei piatti HPTLC la dimensione si aggira attorno ai 5  $\mu\text{m}$

Il diametro medio delle particelle e la distribuzione del diametro sono parametri importanti per ottenere un buon strato adsorbente, quando troviamo riportato il valore  $\text{Si}_{60}$  si fa riferimento alla dimensione media dei pori dello strato.

La distribuzione della dimensione particellare è preferibile che sia ristretta e solitamente si richiede che vi siano pochi pori più piccoli di 1 nm e più grandi di 25 nm, pori troppo piccoli producono adsorbimenti irreversibili e quelli troppo grandi riducono la superficie specifica.

A livello molecolare, il gel di silice ha una struttura simile al biossido, quindi una rigida rete tridimensionale di silossani  $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$ , in cui ogni atomo di silicio è circondato da quattro atomi di ossigeno.

La superficie molto probabilmente contiene gli stessi gruppi silossanici, i gruppi silanolicci liberi  $-\text{Si}(\text{OH})-\text{Si}(\text{OH})-$  ed i gruppi silossanici legati all'idrogeno dell'acqua.

Questi gruppi permettono al gel di silice di interagire con un'ampia gamma di composti.

La ritenzione è innanzitutto controllata dal numero e dal tipo di gruppi funzionali del campione e nella loro disposizione spaziale e diverse sono le interazioni che possono avvenire:

- interazioni proton donatore-accettore (ammine, acidi, fenoli, alcoli)
- interazioni dipolo-dipolo (carbonili, esteri, composti alogenati)
- interazioni di dipolo indotto dalla fase stazionaria (composti aromatici ed insaturi)
- interazioni basate sulle forze di dispersione (composti nonpolari).

Sulla superficie di 1 m<sup>2</sup> di gel di silice i gruppi silanolicci si aggirano mediamente su di una concentrazione 5-7 μmoli, di cui il 68% libero ed il 32% geminale.

I gruppi silanolicci sono molto acidi ed interagiscono preferibilmente con soluti idrogeno-accettori, mentre soluti con gruppi idrossilici interagiscono con silanoli associati.

A causa della natura del gel di silice c'è una forte affinità verso l'acqua e quindi non ci si sorprende se il vapor d'acqua dell'ambiente viene facilmente adsorbito.

La temperatura ricopre un ruolo importante a livello di attivazione del gel, infatti tra i 100 ed i 200° C viene completamente ma reversibilmente rimossa.

Tra i 200 ed i 400° C si ha la deidrossilazione, un processo che può essere completato tra i 400 ed i 600° C, in questo caso l'intera superficie è ricoperta da gruppi silossanici.

Se non si superano i 400° C la deidrossilazione rimane reversibile ed attuabile attraverso trattamento con acqua bollente, mentre se il riscaldamento è oltre i 1000° C si altera l'intera struttura silanolica a tal punto da rendere impossibile l'interazione con le molecole di acqua.

#### **4.10.2. ALLUMINA**

L'allumina rappresenta un ottimo esempio di adsorbente ionico, idrofilico e polare.

Viene preparata per rimozione termica (circa 500° C) di acqua dall'idrossido alluminio idrato  $\text{Al}(\text{OH})_3$ .

I siti attivi della superficie sono: ioni acidi di alluminio, ossidi ionici basici e gruppi Al-OH polari.

Ritenzione degli analiti può essere motivata considerando un adsorbimento specifico con i siti sopracitati.

Nella sua attività, l'idrossido di alluminio è influenzato dalla quantità di acqua adsorbita sulla superficie, esattamente come il gel di silice

Esiste una varietà di forme cristalline ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  di ossidi che dipendono dal materiale di partenza e dal processo di disidratazione ed ognuno di queste ha comportamento cromatografico differente da imputare all'area superficiale, all'energia di superficie ed alla dimensione dei pori.

In linea di massima si ha che l'energia superficiale dell'allumina è ridotto con l'aumento della temperatura di disidratazione.

L'allumina per TLC viene generalmente prodotta a basse temperature per avere una superficie specifica di 50-250 m<sup>2</sup>/g.

A causa degli ioni ossido che si trovano sulla superficie si ha uno strato piuttosto basico (pH = 12).

#### **4.10.3. FASI LEGATE**

Il gel di silice, come già detto, è l'adsorbente più utilizzato, ma ci sono anche fasi legate che offrono vantaggi di carattere specifico.

Tali fasi possono essere separate in due gruppi: quelle polari NP (normal phase) e quelle nonpolari RP (reversed phase).

La loro preparazione non è particolarmente complicata, il gel di silice viene dapprima attivato di modo che possieda il massimo numero di gruppi idrossilici liberi e tale operazione si compie in acqua bollente leggermente acidificata.

Poi, in un solvente inerte tipo tetraidrofurano o toluene si esegue la derivatizzazione usando silani legati ai sostituenti organici opportuni come può essere, ad esempio, una catena C<sub>18</sub>, mentre le altre tre funzioni sono legate ad uno, due o tre atomi di cloro ed i gruppi rimanenti risultano metilati.

I gruppi alcossi o cloro sono sostituiti dai gruppi silanologici presenti sulla superficie del gel di silice ed in funzione del grado di sostituzione si ottengono fasi che sono tipo "brush" (spazzola), o con catene di tipo organico che risultano isolate l'una dall'altra, oppure tipo cross-link caratterizzato da un "film" uniforme di catene organiche.

Nel caso particolare in cui le catene legate sono piuttosto lunghe, ci potrebbero essere gruppi silanologici residui, difficilmente accessibili e che nel caso di una separazione RP potrebbero dare adsorbimenti indesiderati di piccole molecole.

Per questo motivo questi gruppi silanologici vengono inattivati con silani metilati per un procedimento di end-capping dello strato adsorbente.

Non sono immediate le proprietà connesse al comportamento cromatografico di fasi legate a C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub> o CN, non sono solo i gruppi funzionali o la lunghezza di catena che risultano importanti ma anche le caratteristiche chimico-fisiche del gel di silice di partenza ed il tipo di cross-linking.

Le fasi inverse divengono meno polari all'aumentare della lunghezza della catena e più idrofobiche e la conseguente diminuzione della bagnabilità con la fase mobile acquosa è un serio problema per una buona eluizione.

Per ovviare, si aggiungono piccole quantità di sali inorganici alla fase mobile oppure si limita il grado di modificazione della fase mobile lasciando una elevata percentuale ben definita di gruppi silanolicici residui.

**Fasi polari legate** hanno una funzionalità chimica distinta e sono adatte per una separazione in fase normale.

Il meccanismo di ritenzione è, molto probabilmente, di adsorbimento sulla superficie del film organico ed il numero ed il tipo di gruppi funzionali dell'analita determinano l'ordine di eluizione.

Se lo confrontiamo con il gel di silice, l'attività delle fasi polari legate è significativamente inferiore, il numero di gruppi funzionali silanolicici residui sulla superficie è basso e questo riduce l'affinità per l'acqua.

Questo vuol dire anche che i cambiamenti di umidità relativa dell'ambiente generalmente non hanno influenza.

Queste fasi sono perfettamente compatibili con le fasi mobili acquose e sono adatte alle separazioni RP.

Le fasi ammino sono molto più basiche del gel di silice e perfette a separare miscele di acidi deboli.

In RP la fase ammino agisce come un debole scambiatore di ioni ed è fortemente reattivo con composti carbonilici come possono essere i carboidrati.

## **4.11. IL SOLVENTE**

In HPTLC solo tre parametri possono variare per influenzare profondamente il cromatogramma

### **1. Il solvente**

2. l'adsorbente
3. e nel caso di adsorbenti idrofili, l'attività.

I cambiamenti più drastici sono provocati dal solvente che può essere scelto in base alla "forza" ed alla "selettività".

La sua funzione, sostanzialmente, è quella di trasporto dei componenti e far sì che i corrispondenti  $R_f$  rientrino in un range ottimale.

Da esso dipende la selettività e può anche influenzare la qualità dello strato sottile grazie alla sua viscosità  $\eta$ , parlando in maniera più corretta, grazie al fattore di permeazione  $\frac{\gamma}{\eta}$  (al numeratore troviamo la tensione superficiale e a denominatore la viscosità).

E' importante sottolineare che il solvente in cromatografia, durante la migrazione, rilascia una parte dei suoi componenti allo strato adsorbente, perciò la fase mobile si trova via via impoverita rispetto ai componenti che formavano il solvente originariamente.

Si può comprendere che solvente e fase mobile sono differenti e che quest'ultima varia anche in base alla lunghezza della separazione.

Durante una separazione ci sono quattro processi che si sviluppano in competizione l'uno con l'altro (fig.13 ), la camera di eluizione rappresenta un sistema chiuso in cui i componenti che compongono il solvente stabiliscono un equilibrio con la fase vapore, il nome di questa condizione di equilibrio è **saturatione della camera** (1).

In base alla tensione di vapore dei componenti di interesse, la composizione della fase gas può differire in maniera significativa da quella del solvente.

Il tempo necessario per raggiungere una condizione di saturazione dipende dal rapporto tra il volume del solvente ed il volume e la geometria della camera.

Il processo di saturazione può essere accelerato se all'interno della camera viene posto un foglio di carta imbevuto di solvente.

Il secondo processo che si attiva all'interno della camera è il **precondizionamento** (2) che si manifesta quando la fase stazionaria entra in contatto con le molecole del solvente presenti nella fase gas.

Quando la fase mobile fluisce attraverso lo strato sottile deve spostare le molecole di solvente che sono state precedentemente assorbite nella fase di precondizionamento ed è possibile percepire questo processo in quanto si osserva un fronte che si trova al di sopra del fronte della fase mobile.

Durante la fase di eluizione, la fase mobile che sale attraverso quella stazionaria, a parte quando la camera è completamente saturata, parte del liquido che migra evapora.

Questa **evaporazione** (3) è controllata non solo dalla pressione di vapore ma anche dall'equilibrio di adsorbimento dei componenti della fase mobile.

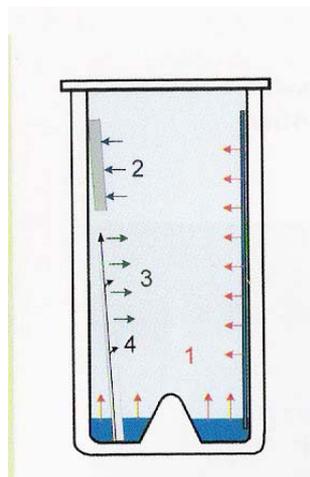


Fig.13 Processi coinvolti durante lo sviluppo in camera cromatografica:

1,

                  saturazione; 2, precondizionamento; 3, evaporazione; 4,

formazione di

                  fronti secondari.

Quando il piatto viene eluito in una camera non saturata, l'evaporazione è tanto maggiore quanto più in alto fluisce la fase mobile.

La differenza della tensione di vapore di ogni componente del solvente permette una differenza nell'interazione di questi con la fase fissa, come risultato si può osservare la formazione di **fronti secondari** (4) ed è un effetto che può essere attenuato tanto meglio è preconditionata la camera.

Per tutte queste cause, risultati riproducibili si possono ottenere se tutti i parametri coinvolti vengono mantenuti costanti, ad esempio, la forma e la saturazione della camera giocano un ruolo fondamentale.

#### 4.12. FLUSSO CAPILLARE

In cromatografia planare il solvente fluisce spontaneamente attraverso lo strato sottile grazie all'effetto della capillarità.

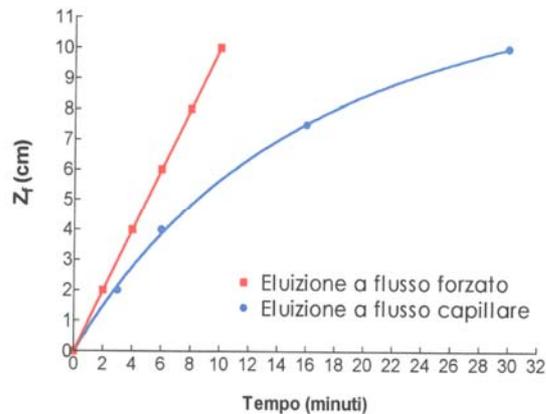
La fase stazionaria è un adsorbente, caratterizzato da piccole particelle con un'alta energia di superficie data dalla presenza di una infinità di micropori.

Dette particelle creano cavità o canali nello strato, quando l'adsorbente viene ricoperto dalle molecole della fase mobile detta energia si abbassa.

Contemporaneamente, entrando nelle cavità capillari dello strato sottile, la fase mobile deve cambiare la sua superficie e quindi la sua energia libera.

La differenza di energia  $\Delta E_m$  è proporzionale alla tensione superficiale  $\gamma$  e al volume molare  $V_m$  del solvente ed inversamente proporzionale al diametro dei pori.

$$\Delta_m = \frac{2\gamma V_m}{D}$$



Durante l'eluizione i pori più piccoli sono i primi a riempirsi mentre gli altri richiedono un tempo maggiore, se si trascura questo evento e si assume che le forze capillari di un determinato adsorbente sono costanti rispetto ad uno specifico solvente, si può dire che la velocità complessiva della fase mobile cala iperbolicamente all'aumentare della distanza di sviluppo in quanto, la resistenza (frizione) se rapportata al flusso, cresce.

In HPTLC il movimento del fronte del solvente  $z_f$  è governato da una legge quadratica rispetto al tempo descritta dall'equazione (figura 14):

$$z_f = \sqrt{kt}$$

Fig.14 Andamenti del fronte del solvente in eluizioni con flusso capillare e flusso forzato

La costante di flusso  $k$  tiene conto della permeabilità  $k_0$  e della dimensione media particellare  $d_p$ , della tensione superficiale  $\gamma$ , della viscosità  $\eta$  e dell'angolo di contatto  $\theta$  della fase mobile.

$$k = 2k_0d_p(\gamma|\eta)$$

Per le fasi inverse la velocità del fronte è generalmente più lento di quello nelle fasi normali, questo è dovuto all'ampio angolo di contatto  $\theta$  dell'acqua sulla superficie apolare delle cavità della fase stazionaria.

Quando aumenta il contenuto dell'acqua nel solvente (circa 40%)  $\theta$  si avvicina a  $90^\circ$  e la costante di velocità del flusso diviene molto piccola in modo da impedire qualsiasi movimento.

Per concludere, dall'equazione si deduce che la velocità della fase mobile cade drasticamente con l'aumentare della distanza di sviluppo sino a fermarsi.

Se riprendiamo in considerazione l'equazione di Van Deemter quando la velocità della fase mobile è al di sotto del valore ottimale calcolato, l'altezza del piatto teorico ha un aumento drammatico e questo effetto è particolarmente marcato per i piatti HPTLC in cui l'alta densità di impaccamento dello strato genera un forte aumento della resistività al flusso capillare.

Alla luce di tutto questo ci si chiede quale sia lo sviluppo necessario per ottenere i migliori risultati e in questo contesto torna comodo valutare la risoluzione tra due picchi.

Per la formula della risoluzione si possono scegliere un valore di selettività  $\alpha=1,5$  e valori incrementali di  $R_f$  di 0,1.

Il numero di piatti è calcolato utilizzando l'equazione  $N=L/H$  e da prove sperimentali si è scoperto che la migliore risoluzione si ottiene a distanze di sviluppo pari a sei centimetri.

Per concludere si osserva che quando l'eluizione dipende dalle forze capillari, ben poco si può fare per migliorare l'efficienza separativa se non lavorare sulla dimensione delle particelle della fase mobile.

Se forziamo opportunamente la fase mobile a fluire con una velocità opportuna si può mantenere l'altezza di piatto teorico a valori costanti anche per eluizioni molto lunghe.

Una delle tecniche più importanti nell'ambito delle tecniche a flusso forzato è la OPLC Overpressure Layer Chromatography.

Sebbene la risoluzione sia un parametro importante della separazione per la cromatografia planare entra in gioco la **separation number** che risulta essere una grandezza più indicata per questa tecnica:

$$SN = \left( \frac{z_f}{W_0 - W_1} \right) - 1$$

detto anche **spot capacity** dove  $z_f$  è la distanza di migrazione del fronte,  $W_0$  è la larghezza del picco a metà altezza per  $R_f = 0$  e  $W_1$  è la larghezza del picco a metà altezza per  $R_f = 1$ .

Il valore calcolato di SN altro non è che il numero massimo di sostanze che è possibile separare.

#### 4.13. LA FASE MOBILE

La fase mobile è il mezzo utilizzato per il trasporto degli analiti e quindi deve poterli sciogliere, inoltre può essere utilizzata per modificare o, per meglio dire, aggiustare la posizione degli analiti (valore degli  $R_f$ ) presenti nel cromatogramma, variando opportunamente la forza del solvente.

Il valore ottimale degli  $R_f$  dovrebbe aggirarsi nell'intervallo 0,2-0,6.

La fase mobile, essendo un componente del sistema cromatografico, è responsabile della selettività della separazione.

Per una determinata fase stazionaria, generalmente si utilizza una variazione nella composizione della fase mobile per migliorare il risultato cromatografico.

Un corretto approccio e strategia per migliorare la selettività agendo sul solvente, è ancora piuttosto generico, ma può essere riassunto in tre punti principali:

1. Approcci empirici (trial and error) guidati dall'esperienza e dall'intuizione
2. Analisi statistica di risultati di pubblicazioni del passato e/o design of experiment DOE che permettono di cambiare in maniera più o meno mirata le condizioni per ottenere un buon sistema cromatografico.
3. Sviluppo di un modello o di una teoria di ritenzione valido per un alto numero di separazioni. Questo potrebbe permettere lo sviluppo di schemi di ottimizzazione basati su un numero ristretto di test della miscela campione con un numero finito di solventi standard preselezionati, con più di una fase stazionaria.

A differenza delle altre tecniche cromatografiche quella planare ha il grosso vantaggio di non aver grossi vincoli sulla scelta del solvente, in HPLC ad esempio è d'obbligo tenere in considerazione l'effetto prodotto nei confronti del rivelatore, in gas- cromatografia invece è pericoloso "l'effetto memoria".

L'ottimizzazione in TLC è importante per la messa a punto di una separazione adeguata ed un accettabile tempo di separazione.

Ragionevoli strategie di separazione possono basarsi sull'equazione della risoluzione.

#### 4.14. FORZA DEL SOLVENTE

Il termine **forza del solvente** è generalmente utilizzata assegnandole un senso qualitativo, che descrive l'effetto della fase mobile sulla ritenzione del campione in quanto aumentando la forza del solvente diminuisce la ritenzione ed aumenta il valore di  $R_f$ .

In dipendenza del meccanismo coinvolto nella separazione, il termine "forza del solvente" assume significati differenti.

Per la cromatografia di adsorbimento la forza del solvente viene espressa in termini di "polarità", mentre per la cromatografia di ripartizione in fase inversa la si può esprimere come lipofila.

Per la cromatografia di scambio ionico la forza del solvente dipende dal pH ed in quella ad interazione idrofobica si parla di forza ionica.

Lo stesso solvente possiede differente forza in base alle diverse fasi stazionarie, ad esempio se prendiamo l'acqua questa è molto forte su gel di silice e debole su fase inversa  $C_{18}$ .

Da un punto di vista empirico si possono ordinare i solventi per la forza crescente basandola sui risultati sperimentali con un campione utilizzato come test, in cui i solventi sono perfettamente puri e c'è un severo controllo sulla fase gas ed i suoi effetti sullo strato preconizionato.

Questo tipo di impostazione dello studio porta alla definizione della cosiddetta **serie eluotropa**.

Il solvente può essere puro od una miscela di sostanze pure generalmente definita come miscela di solventi.

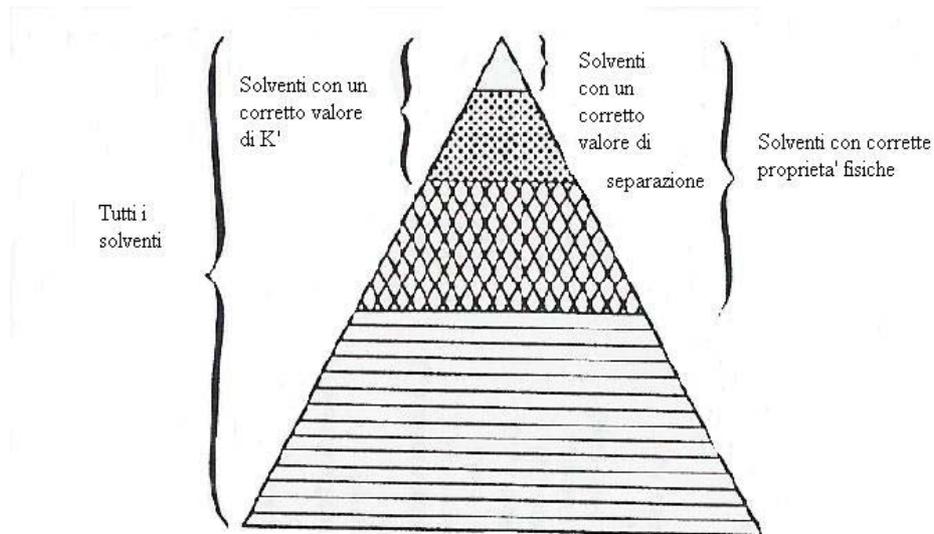


Fig.15 Diagramma dei solventi

La figura 15 illustra l'approccio generale alla scelta della fase mobile, questo triangolo rappresenta tutti i possibili solventi e tra questi quelli che sono da scartare per un impiego in cromatografia sono quelli le cui proprietà fisiche (punto di ebollizione, viscosità,...) non sono adeguate e che troviamo raggruppati nell'area rappresentata da linee orizzontali.

Tra i solventi rimanenti, si devono scegliere quelli dotati di una opportuna forza eluente, di modo che i  $K$  delle sostanze da separare siano compresi tra 2 e 5 per due componenti e tra 0,5 e 20 per un numero superiore a due. Questa necessità permette di eliminare i solventi che rientrano nella zona a tratteggio incrociato.

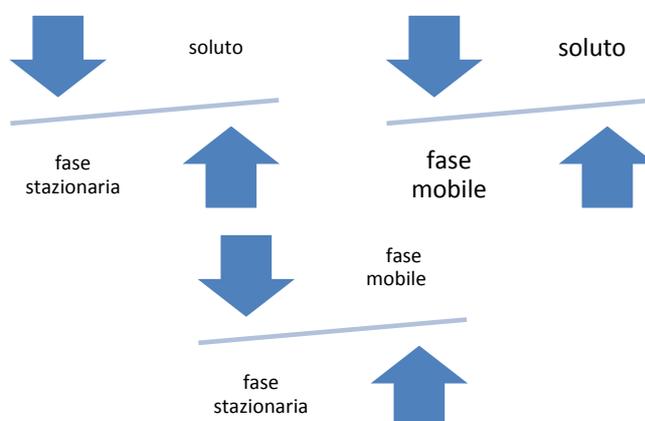
Il secondo criterio importante di scelta, fa riferimento all'ottimizzazione della selettività del sistema, quindi continuando nella ricerca di un buon solvente, l'area che racchiude quelli adatti, si riduce a quella bianca in cima al triangolo.

Questo per dire che in realtà la scelta dell'opportuno solvente ricade su di un numero ristretto di sostanze.

## 4.15. INTERAZIONI INTERMOLECOLARI TRA CAMPIONE E MOLECOLE DELLA FASE MOBILE

La migrazione differenziale dei componenti della miscela in analisi è il risultato di differenti gradi di affinità rispetto alle due fasi: quella fissa e quella mobile.

In tale sistema le interazioni che entrano in gioco sono:



E per queste interazioni, le forze intermolecolari coinvolte possono essere:

- Forze coulombiane tra ioni
- Forze dipolo-dipolo
- Forze dipolo-dipolo indotto
- Forze ione-dipolo indotto
- Forze di dispersione
- Legame idrogeno

Le interazioni di dispersione o di attrazione esistono tra qualsiasi coppia di molecole adiacenti e la loro entità è da imputare al fatto che gli elettroni che appartengono alla molecola possono per un certo istante produrre un momento dipolare.

Tale dipolo polarizza gli elettroni della molecola adiacente creando una forza di attrazione.

La loro entità è maggiore per quelle molecole di solvente e soluto che hanno elettroni più facilmente polarizzabili e con buona approssimazione la polarizzabilità delle molecole è direttamente legata al loro indice di rifrazione e quindi questa informazione può darci una indicazione sommaria della possibile interazione delle molecole.

Quando il solvente ed il soluto possiedono un momento dipolare permanente, si hanno forti interazioni, con allineamento dei due dipoli in una configurazione lineare e spesso questo si verifica tra i gruppi funzionali delle molecole in questione.

In tal modo molecole di solvente e di soluto che possiedono gruppi funzionali polari interagiscono selettivamente ed i gruppi che hanno momenti dipolari più elevati interagiscono più fortemente.

Sono ben note anche le interazioni attraverso la formazione del legame idrogeno in cui gli accettori più acidi ( acidi carbossilici, fenoli, cloroformio) si legano a quelli più basici.

Per avere una linea guida in questa trattazione, possiamo in generale ed anche banalmente affermare che il simile scioglie il simile e che per poter misurare questa interazione definiamo la **polarità** come grandezza che racchiude in sé tutte le interazioni che sono state elencate.

Quindi è giusto affermare che un solvente polare scioglierà di preferenza i soluti polari e che un adsorbente polare interagisce preferibilmente con le molecole polari.

Come parametro, la polarità, ha il grande vantaggio di essere semplice ed intuitiva e la forza solvente aumenta all'aumentare della sua polarità in

cromatografia liquida sia in fase normale di ripartizione che di adsorbimento, mentre in fase inversa si verifica la situazione opposta, cioè all'aumentare della polarità diminuisce la forza solvente.

Volendo partire un poco più lontano dalla definizione di polarità si può dire che dal punto di vista empirico si è definita una grandezza  $\epsilon^\circ$  che è un parametro adimensionale associabile alla forza solvente e che altro non è che l'energia libera di adsorbimento delle molecole di solvente per unità di area dell'adsorbente; per definizione al pentano si assegna valore  $\epsilon^\circ = 0,00$ . Già questo, implica che la forza del solvente è relativa all'adsorbente in questione ma non dipende dalla sua attività.

Trappe nel 1940 introduce il termine **serie eluotropa** in cui i solventi sono ordinati in ordine di forza eluente crescente in funzione di una fase adsorbente ben definita.

Produrre un corretto valore di  $R_f$ , durante una separazione, significa variare opportunamente la forza del solvente e questo, può essere fatto considerando una miscela eluente con diverse percentuali dei componenti, il problema è il calcolo di  $\epsilon^\circ$  di miscele in quanto non varia linearmente con la variazione delle percentuali dei componenti.

Per una miscela binaria la forza eluente è calcolata nel seguente modo:

$$\epsilon_{AB}^\circ = \epsilon_A^\circ + \frac{\lg\left(N_B 10^{\alpha/n_b(\epsilon_A^\circ - \epsilon_B^\circ)} + 1 - N_B\right)}{\alpha n_B}$$

dove  $N_B$  è la frazione molare del solvente più forte,  $\epsilon_A^\circ, \epsilon_B^\circ$  sono le rispettive forze dei solventi che compongono la fase mobile ed  $n_b$  l'area richiesta da una molecola di solvente B sulla superficie.

Se invece ci troviamo di fronte ad una miscela ternaria od a più componenti, allora l'equazione che calcola il corretto valore di  $\epsilon^\circ$  è la seguente:

$$\varepsilon_m^\circ = \varepsilon_A^\circ + \frac{\lg\left(\frac{N_A}{\theta_A}\right)}{\alpha n_b}$$

Dove A si riferisce al solvente meno forte,  $N_A$  alla sua frazione molare nella fase mobile,  $\theta_A$  alla sua frazione molare nella fase fissa,  $n_b$  è l'area molecolare media dei componenti ed  $\alpha$  è il coefficiente di attività dell'adsorbente.

Esiste un ausilio grafico che permette di calcolare agevolmente la forza solvente  $\varepsilon^\circ$  di una miscela che viene riportato nella seguente figura 16.

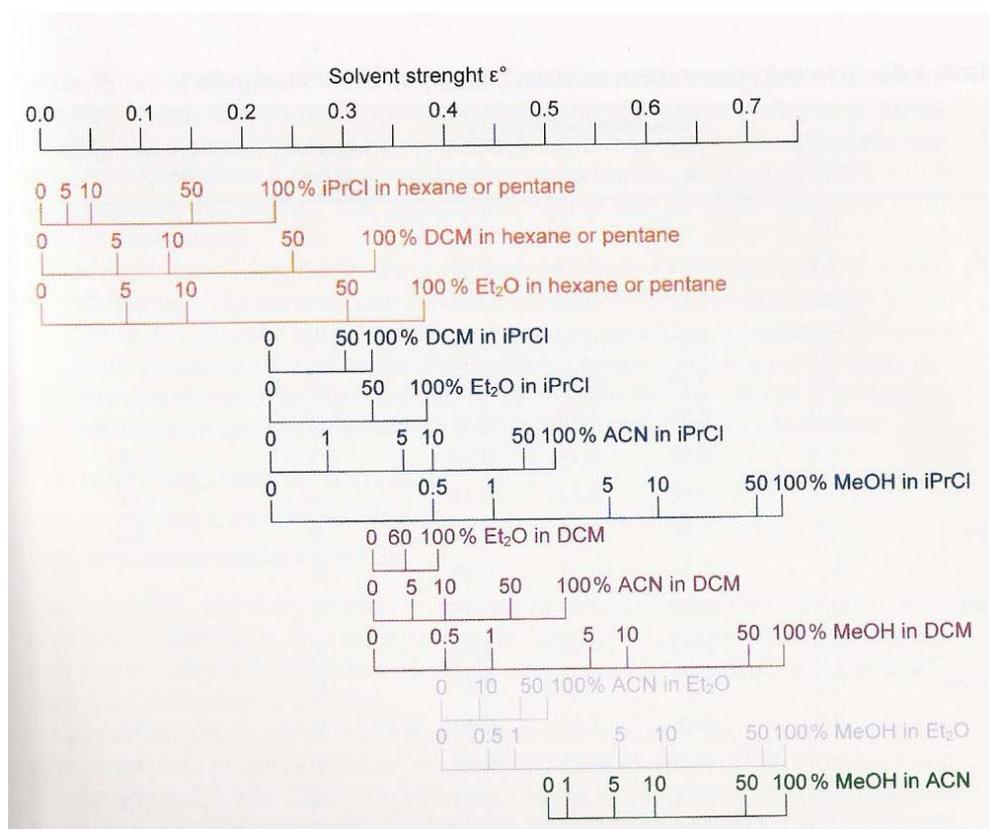


Fig.16 forza solvente di miscele su silice. iPrCl, isopropilcolruo; DCM, diclorometano; Et<sub>2</sub>O, dietilere; ACN, acetonitrile; MeOH,metanolo.

Volendo invece utilizzare la polarità  $P'$  come parametro di misura della forza di un solvente questo varia da -2 per i solventi meno polari a 10,2 per quelli molto polari come può essere l'acqua.

Un cambiamento di 2 unità in  $P'$  causa approssimativamente un incremento di dieci volte nel valore del fattore di capacità  $k$ .

Per la cromatografia liquida in fase normale vale la seguente equazione:

$$\frac{k_2}{k_1} = 10^{\frac{(P_1 - P_2)}{2}}$$

Mentre per la cromatografia in fase inversa si ha:

$$\frac{k'_2}{k'_1} = 10^{\frac{(P_2 - P_1)}{2}}$$

La polarità di una miscela è la media aritmetica delle individuali polarità dei solventi puri pesati rispetto alle frazioni in volume  $f_a$  ed  $f_b$  di ognuno:

$$P' = f_a P'_a + f_b P'_b$$

Un cambiamento nella composizione del solvente produce un cambiamento di 0,1 nel valore finale della polarità.

Se poi abbiamo trovato una miscela che permette valori accettabili di  $k'$  può comunque succedere che due o più bande restano sovrapposte e quindi è necessario ricorrere ad una ottimizzazione della selettività del solvente.

Per fare questo è necessario cambiare uno dei due solventi, che ad esempio indichiamo con B, con un terzo C e per mantenere inalterata la

forza solvente è necessario aggiustare le frazioni in volume in funzione della polarità di B e C.

Per fare questo è sufficiente utilizzare la seguente formula

$$\theta_c = \theta_b \frac{P_b}{P_a}$$

#### **4.16. SELETTIVITA'**

Per i discorsi fatti sino ad ora sembra che solventi o miscele di essi che hanno la stessa forza possono produrre gli stessi  $R_f$ .

Un'analisi accurata invece, dimostra che esistono differenze sostanziali nelle posizioni relative dei componenti del campione, in una separazione attuata con solventi che hanno la stessa forza.

Questo effetto è da imputare alla differenza di selettività dovuta ai cambiamenti delle percentuali dei componenti del solvente e la selettività come tale, è un termine utilizzato per indicare come lo stesso solvente può interagire con le diverse molecole che compongono il campione od in altre parole come lo stesso solvente è in grado di riconoscere differenze strutturali nei componenti del campione.

Uno dei modelli più ampiamente applicati che descrivono la selettività dal punto di vista quantitativo sono stati sviluppati da Snyder.

Egli utilizzò etanolo, diossano e nitrometano come tre soluti-test, per determinare tre parametri fondamentali per caratterizzare la selettività:

$x_e$  misura la capacità di accettare un protone = solubilità del solvente in etanolo/P'

$x_d$  misura la capacità di donare un protone = solubilità del solvente in diossano/P'

$x_n$  misura la capacità di attrarre un dipolo = solubilità del solvente in nitro metano/P'

Per poter considerare ogni solvente in maniera univoca senza dover analizzare le singole interazioni molecolari è possibile ricorrere ad una classificazione per gruppi in cui ogni solvente può essere classificato in base alle tre capacità riportate sopra.

La somma di questi parametri dà sempre 1 e se riportiamo i tre parametri in un diagramma triangolare (figura 17) ogni solvente troverà una sua collocazione all'interno di questo grafico,

E' inoltre possibile raggrupparli anche in classi di selettività simile.

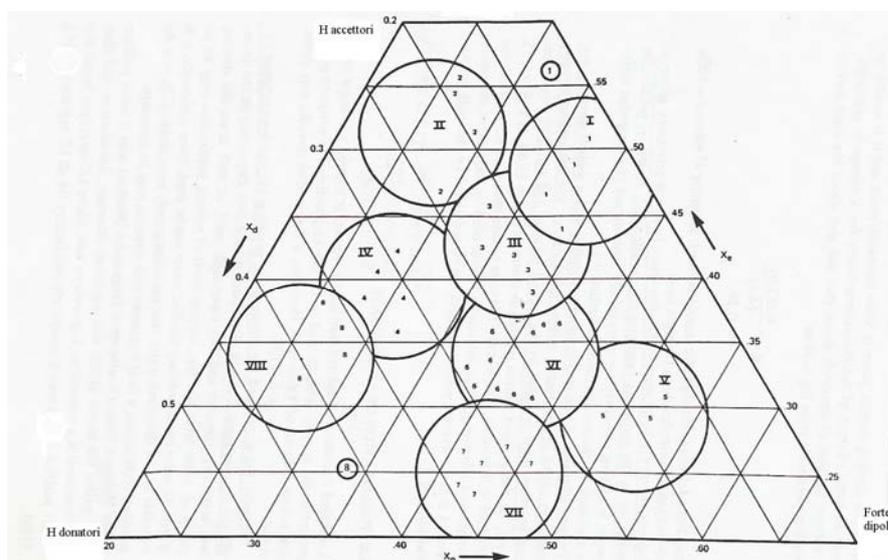


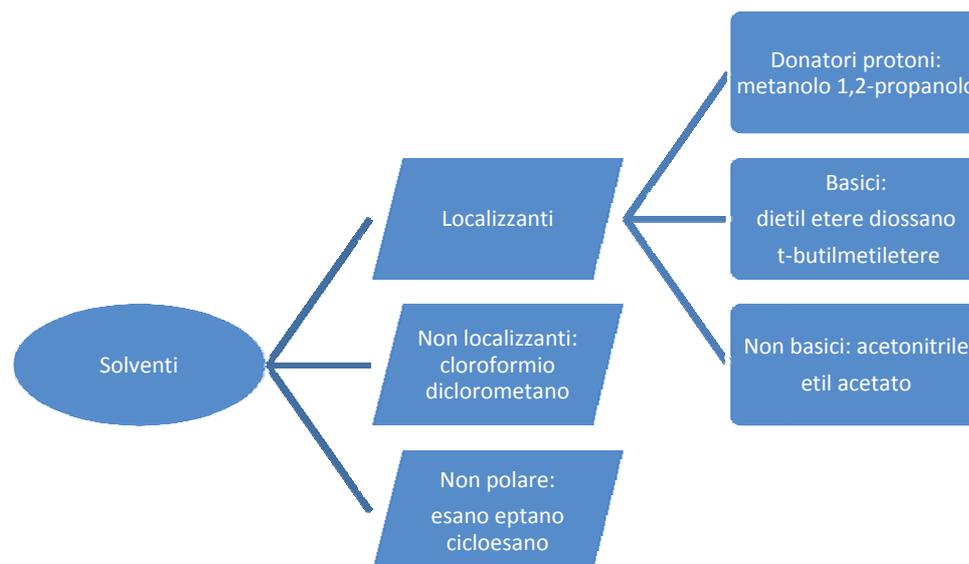
Fig. 17 Diagramma triangolare di selettività dei solventi

Le classi sono riportate nella tabella 4

Gruppi di selettività	Solventi
<b>I</b>	Eteri alifatici
<b>II</b>	Alcol alifatici
<b>III</b>	Tetraidrofurano
<b>IV</b>	Glicoli, acido acetico
<b>V</b>	Diclorometano
<b>VI</b>	Chetoni alifatici ed esteri nitrili
<b>VII</b>	Idrocarburi aromatici
<b>VIII</b>	Cloroformio acqua

Tabella 4. Elenco gruppi selettività dei solventi

Se i solventi vengono considerati rispetto all'utilizzo in cromatografia di adsorbimento, li possiamo classificare come localizzanti e non localizzanti; i primi sono suddivisi in donatori di protoni, basici e non, poi esistono a sè i solventi non polari che vengono adsorbiti solo debolmente.



Come tipo di interazione rispetto sulla superficie, i solventi localizzanti tendono ad ingabbiare il soluto in interazioni specifiche.

Esistono altri parametri che sono importanti per la TLC, uno banale è ad esempio la purezza, infatti impurezze polari possono influenzare significativamente la forza del solvente.

Proprietà fisiche importanti sono il punto di ebollizione, la volatilità e la viscosità in quanto influenzano la saturazione della camera, l'efficienza separativa ed il grado di essiccamento del piatto.

#### 4.17. IL MODELLO “PRISMA”

Il modello del PRISMA, sviluppato da Nyiredy e collaboratori, nasce dal triangolo di selettività di Snyder.

Si tratta di una rappresentazione spaziale delle forze dei componenti di un solvente, in base alle frazioni in volume in esso presenti.

Come primo approccio, vengono selezionati circa otto-dieci solventi per la fase mobile che devono rappresentare tutti i gruppi di Snyder, tra tutti, i tre che rappresentano la migliore selettività vanno a comporre gli angoli del triangolo alla base del prisma (punti 1,2,3), mentre l'altezza ad ogni angolo, altro non è che il loro valore  $P'$  (punti 4,5,6).

Il prisma così ottenuto, viene tagliato all'altezza del lato corrispondente al solvente meno forte (punto 6) ed in questo modo ottengo due parti in cui, la parte più bassa del prisma è regolare mentre, la parte alta risulta irregolare.

In qualsiasi triangolo congruente alla base tutte le miscele solventi sono ugualmente eluotropiche, cioè i valori di  $R_f$  di una stessa separazione saranno circa gli stessi (fig. 18).

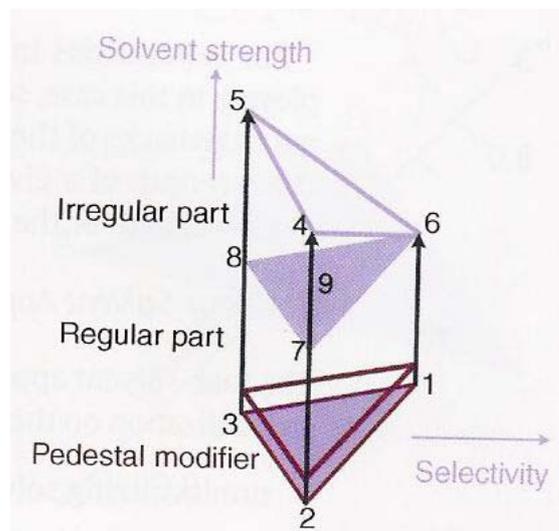


Fig.18 Modello del PRISMA

Miscelando questi solventi con una certa quantità di esano ( $P'=0$ ), si ottengono miscele caratterizzate dalla stessa selettività ma che hanno forza eluente inferiore.

Tutto questo procede sino a quando i solventi più forti (punti 4 e 5) sono ridotti a raggiungere la forza del solvente più debole (punto 6) ed in questo modo si taglia in due parti il prisma: una regolare e l'altra irregolare.

La superficie del triangolo dai vertici 6,7,8 altro non è che l'insieme dei punti di identica forza solvente ma di diversa selettività ottenibile cambiando le proporzioni in volume della miscela ternaria.

Solitamente si procede dal punto centrale di detta superficie  $P_{333}$  in cui i solventi si trovano in identica concentrazione per poi avvicinarsi ai vertici del triangolo per ottenere la separazione ottimale in funzione della selettività.

Nella parte irregolare del prisma bastano piccoli cambiamenti nella composizione della fase mobile per influenzare fortemente gli  $R_f$ .

Se di partenza i solventi selezionati non sono in grado di produrre valori di  $R_f$  compresi tra 0,2 e 0,8 si possono utilizzare piccole quantità di **modificatori** (acidi, basi od acqua) che disattivano la fase stazionaria.

Se questo capillare processo di ottimizzazione non è sufficiente ad ottenere risultati soddisfacenti, allora il sistema è inadatto allo scopo e si devono scegliere un'altra fase stazionaria o differenti solventi.

Il modello del prisma può essere utilizzato anche per il sistema in fase inversa ed in questo caso la forza solvente può essere aggiustata utilizzando l'acqua ( $S_1=0$ ).

#### **4.18. STRATEGIA DI OTTIMIZZAZIONE**

Per una descrizione puntuale del metodo del Prisma diciamo che le prove con i solventi che rappresentano le classi di Snyder si effettuano in fase normale, con solventi puri tutti miscibili con l'acqua ed in camere non saturate lasciandoli correre nove centimetri.

Quando si ottiene un valore di  $R_f$  superiore a 0,8 allora il solvente viene diluito con esano sino ad ottenere un valore compreso tra 0,2 e 0,8.

Se il criterio 0,2-0,8 viene rispettato da molti componenti della miscela in esame allora questi, vengono trattati come non polari e nella fase di ottimizzazione viene usata la sola parte regolare del prisma, se invece hanno valori inferiori a 0,2 si aumenta la forza del solvente aggiungendo acqua, oppure un altro modificatore a concentrazioni basse e costanti e si utilizza la parte irregolare del prisma.

Se per i solventi la miscibilità con l'acqua è bassa allora si può pensare di usarne altri che però appartengono alla stessa classe di selettività.

Se si ottengono buone separazioni già nel primo step di ottimizzazione con un solo solvente o con un solo solvente in presenza di esano, può valere la pena di osservare la separazione con solventi dello stesso gruppo di selettività.

Se invece si selezionano tre solventi che compongono l'eluente si può costruire il prisma, mentre se sono quattro è necessario costruire quattro prismi per esaminare tutte le possibili combinazioni.

#### **4.18.1. OTTIMIZZAZIONE PER SOSTANZE NON POLARI**

Si utilizza il **prisma regolare** composto dai tre solventi scelti con o senza l'ausilio del modificatore (esano).

Come primo approccio si deve trovare la forza del solvente appropriata per l'analisi e si testa la miscela avente  $P_s=333$ , in seguito l'eluente viene diluito con esano fino a che tutti i componenti hanno  $R_f$  compresi tra 0,2 e 0,8.

Utilizzando poi il triangolo equilatero si testano le selettività dei seguenti punti  $P_s=811$ ,  $P_s=181$  e  $P_s=118$  i quali sono punti prossimi ad un angolo del triangolo costruito ed in seguito, grazie ai quattro densitogrammi si testano altri  $P_s$  sino ad ottenere una buona selettività.

In conclusione se si ottiene una miscela con buona selettività ma forza inadeguata, l'ultimo step è l'aggiustamento fine della forza eluente.

Se gli esperimenti preliminari richiedono l'impiego di modificatori è consigliabile mantenere la loro concentrazione costante durante la seconda parte dell'ottimizzazione, mentre può essere variata nell'aggiustamento fine e finale della forza del solvente, senza scordare che i contributi del o dei modificatori nella forza del solvente sono trascurabili.

#### **4.18.2. OTTIMIZZAZIONE PER SOSTANZE POLARI**

In questo caso viene usata la **parte irregolare** del prisma, dove come già descritto, tutti i punti della superficie del triangolo superiore sono caratterizzati sia da una diversa selettività che da una diversa forza correlata ai solventi scelti per la miscela.

Solventi con forze eluenti molto diverse, generano un prisma irregolare in cui i punti adiacenti di selettività mostrano grandi differenze.

In questi casi è opportuno considerare punti intermedi definiti utilizzando due dei tre numeri interi.

Quindi come nel caso precedente si fanno le prove con i punti  $P_s=333, 811, 181, 118$  e, valutati i risultati, si va oltre sino agli aggiustamenti fini.

Nel caso in cui la forza dell'eluente sia eccessiva si diluisce con esano.

Se invece, è stata usata l'acqua negli esperimenti preliminari come di solito è necessario per composti polari allora si presentano due possibilità.

L'acqua può essere considerata come un modificatore oppure se la miscela è composta da solo due componenti, la si può considerare come un componente utile alla costruzione del prisma.

Se l'acqua la si considera come un modificatore si devono utilizzare la base e la parte irregolare del prisma ed in questo caso solo le concentrazioni dei tre solventi scelti variano.

Le prove di selettività per le sostanze non polari andranno intensificandosi nella zona del triangolo in cui si ottengono i risultati migliori e se la selettività

è adeguata si può fare una ulteriore separazione modificando la forza del solvente o la concentrazione del modificatore oppure aggiungendo esano (l'utilizzo dell'esano è concessa in caso di solubilità con il sistema).

Se invece l'acqua è considerata come solvente allora si deve ricordare che piccolissimi spostamenti sulla superficie del triangolo produce grandi variazioni di selettività.

#### **4.19. METODO DEI “QUATTRO SOLVENTI”**

Tale approccio è basato sulla forza solvente  $\epsilon^\circ$  e la selettività.

Tre tipi di solventi sono usati per l'ottimizzazione:

1. Solventi non localizzanti (es. 1,2 dicloroetano)
2. Solventi basici localizzanti (es. t-butilmetiletere)
3. Solventi localizzanti non-basici (acetonitrile)

Mentre il quarto solvente è di sola diluizione (eptano od ottano) ed ha la funzione di ridurre la forza dell'eluente.

Inversamente all'approccio del metodo del prisma, in cui si valuta prima la selettività, con questo metodo si cerca innanzitutto l'adatta forza solvente e quindi si preparano diverse miscele di solventi a diversa forza, con valori che spaziano tra 0,00 e 0,80, con valori incrementali di 0,05-0,10.

Sperimentalmente quindi è possibile arrivare a selezionare l'eluente alla corretta forza in funzione degli  $R_f$  ottenuti.

Il metodo dei quattro solventi risulta di facile approccio e può essere applicato a strati di gel di silice e fasi legate polari.

## CAPITOLO 5

# ASPETTI PRATICI DELLA MODERNA CROMATOGRAFIA PLANARE

### 5.1. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Per la TLC, un campione solido o liquido è sciolto in un adatto solvente oppure estratto con questo. Il punto cruciale per un campione è la matrice che in TLC si può tollerare a livelli più elevati di quanto non succeda per tutti gli altri metodi cromatografici.

Se vogliamo affrontare le questioni che riguardano la metodica analitica, è noto che la preparazione del campione è una procedura che deve essere validata e per quel che riguarda l'analisi qualitativa è sufficiente che il composto di interesse sia applicabile al piatto di TLC, mentre per la determinazione di carattere quantitativo diventano step fondamentali la precisione e l'accuratezza per la preparazione del campione.

#### **Dissoluzione**

Fondamentale è trovare un solvente "adatto" in cui il campione in esame sia completamente solubile, ma senza trascurare il fatto che deve avere una volatilità ottimale, il che significa essere abbastanza volatile per andarsene una volta che si deposita il campione sul piatto cromatografico, ma non troppo così da indurre errori sulla valutazione di concentrazione dell'analita nella soluzione.

Dovrebbe avere una forza solvente bassa tale da evitare che spanda attraverso lo strato sottile durante la fase di deposizione e che inoltre produca una banda il più sottile possibile.

Per finire banale ma non trascurabile, il solvente deve essere stabile, puro e non reagire con il campione.

La purezza è fondamentale in quanto, se si devono depositare alti volumi di campione, tutte le impurezze si accumulano sullo strato sottile e possono interferire con i risultati cromatografici.

Come regola generale, i campioni con una singola sostanza dovrebbero essere preparate ad una concentrazione di 0,1 mg/ml.

Il toluene è un buon solvente per campioni non polari, campioni di media polarità invece possono essere sciolti in metanolo-diclorometano e per finire i campioni polari si sciolgono in metanolo con diverse percentuali di acqua.

Solventi polari come possono essere l'acqua, il dimetilsolfossido, gli acidi e le basi sarebbe meglio evitarli in quanto esiste una certa difficoltà a rimuoverli dal piatto e quindi possono influenzare negativamente i densitogrammi.

Anche l'acetone, nonostante il corretto valore di volatilità, dovrebbe essere evitato o per lo meno testato, in quanto a volte forma prodotti di condensazione, come può essere l'acetilacetone, che può reagire con il derivatizzante e produrre un picco come fosse un analita.

Idealmente, sia i campioni che gli standard dovrebbero essere sciolti nello stesso solvente di modo che la dimensione della macchia depositata e la velocità di deposizione siano identiche, se però il campione possiede una bassa solubilità si possono utilizzare gli ultrasuoni come mezzo per sveltire la dissoluzione.

Un eventuale riscaldamento della soluzione può essere applicato se la stabilità dell'analita è provata e se il campione non precipita quando la soluzione viene raffreddata.

## **Estrazione**

Ogni volta che una parte del campione risulta insolubile nel solvente, oppure si desidera eliminare parte del campione, si utilizza l'estrazione.

Prima di estrarre, però, è importante rompere, tagliare, macinare e setacciare il campione di modo che le particelle che lo compongono risultino più piccole e quindi presentino una maggiore superficie di contatto.

E' possibile operare attraverso l'estrazione utilizzando il processo di macerazione, dove il campione viene ricoperto completamente dal solvente estraente ed agitato.

Se poi oltre a questo si scalda la soluzione allora si parla di digestione.

L'estrazione può essere anche accelerata e/o migliorata utilizzando alte temperature, pressione, ultrasuoni e microonde.

Una estrazione continua con solvente fresco è ottenuta attraverso un estrattore Soxhlet, in cui il solvente è in condizioni di riflusso .

Nel caso di percolamento, sono utilizzati volumi più elevati di solvente e questo viene fatto perché l'estrazione sia il più completa possibile.

E' possibile eseguire anche una estrazione liquido-liquido oppure una estrazione in fase solida.

Entrambe le tecniche possono essere utilizzate per rimuovere in maniera selettiva la matrice dal campione (clean-up) o per concentrare il campione in esame.

Per lavori di carattere quantitativo, estrazioni multiple possono essere eseguite per verificare la completezza del metodo estrattivo.

Importante è la scelta del solvente di estrazione, infatti ognuno di questi ha una differente selettività, inoltre per completare la fase estrattiva bisogna non dimenticare che è importante separare l'estratto dalla componente insolubile e che si può fare per decantazione, filtrazione o centrifugazione.

## 5.2. DERIVATIZZAZIONE PRE-CROMATOGRAFICA

Risulta essere un modo facile di cambiare le proprietà dell'intero campione o di una porzione di esso.

In TLC, la derivatizzazione può essere eseguita sul piatto subito dopo che è stato depositato il campione.

Il piatto può essere immerso nel reagente oppure il reagente può essere spruzzato sul campione, ad esempio lo scopo può essere l'introduzione di un gruppo cromoforo o fluoroforo nella molecola.

Composti molto polari, come possono essere gli acidi, li si può convertire in sostanze meno polari come ad esempio possono essere gli esteri, tutto questo al solo scopo di migliorare il loro comportamento cromatografico.

## 5.3. PRELAVAGGIO, ATTIVAZIONE E MANIPOLAZIONE

Gli strati sottili interagiscono con l'ambiente circostante e possono assorbire vapor d'acqua, fumi e polvere.

Tutto questo ha due conseguenze:

- ➡ L'attività del piatto dipende dall'umidità relativa dell'atmosfera circostante
- ➡ Se lo sviluppo è ad opera di un solvente polare, si possono osservare "zone sporche" in corrispondenza del fronte del solvente ed a volte anche nei fronti secondari.

L'attività del piatto è inversamente proporzionale all'umidità relativa ed influenza il valore di  $R_f$  dell'analita ( ad attività dello strato maggiori gli  $R_f$  si abbassano ).

Per la rimozione delle eventuali impurezze un prelavaggio od una eluizione sono consigliati.

Per il prelavaggio, il piatto è immerso in una grande quantità di isopropanolo e può rimanere immerso per diverse ore; le impurezze diffondono nel liquido di lavaggio, lo strato viene asciugato e si ripete la procedura.

Per la eluizione invece, si usa un solvente forte che si fa correre sino al margine superiore tipo metanolo, anche se non è sufficientemente forte per spostare impurezze poco polari.

E' buona norma ricordare che l'eluizione deve essere condotta nello stesso verso del prelavaggio ed il piatto lavato deve essere asciugato in stufa a 120°C per 20-30 minuti.

Per concludere questa procedura si ricorda che il piatto deve essere portato a temperatura ambiente, portato in equilibrio con l'umidità dell'ambiente e conservato avvolto in un foglio di alluminio.

#### **5.4. APPLICAZIONE DEL CAMPIONE**

La qualità del risultato cromatografico dipende fortemente dalla modalità di applicazione del campione.

Principalmente si tratta di due condizioni importanti:

- Tutti i campioni devono essere depositati in maniera precisa

Questo perché l'identificazione di un analita si rifà al valore di  $R_f$  cioè alla sua distanza di migrazione.

Quindi lo sviluppo cromatografico deve iniziare contemporaneamente per tutti i campioni depositati e questo è possibile grazie ad una deposizione ben controllata.

➤ Il volume di deposizione del campione deve essere preciso

Si tratta di una condizione fondamentale sia per l'analisi qualitativa che per quella quantitativa e se lo strato risulta sovraccaricato dal campione lo si può osservare dalla codatura dei picchi dopo l'eluizione.

Le bande di deposizione devono essere il più possibile sottili per assicurare il più alto livello di risoluzione.

Per quanto riguarda l'applicazione per contatto si può dire che il vantaggio è dovuto alla sua estrema semplicità operativa.

Con un capillare od una siringa di volume fissato, il campione viene posto sullo strato cromatografico attraverso l'azione del capillare o per pressione sullo stantuffo della siringa.

Il volume di deposizione impiegato è responsabile della dimensione dello spot che si produce sullo strato ed attraverso la siringa si può controllare la velocità di deposizione per cui si controlla la dimensione dello spot stesso.

La volatilità del solvente impiegato non può essere un fattore trascurabile, solventi viscosi e quelli con scarsa volatilità non dovrebbero essere impiegati ed anche quelli eccessivamente volatili possono causare errori sulla precisa concentrazione dell'analita.

Gli spot prodotti vengono lasciati asciugare per esposizione all'aria per un periodo di tempo definito.

Quindi, il primo punto critico per la cromatografia planare è la forma della macchia della miscela da separare, che influenza fortemente la capacità di risolvere tutti i componenti.

E' necessario depositare piccoli volumi (evitare un sovraccarico) per realizzare una elevata efficienza della lastra, infatti bande sovraccaricate di campione danno picchi codati e poco separati.

Esiste una vastissima varietà di strumenti per depositare, partendo dal più semplice bastoncino di legno ad estremità piatta, al capillare di vetro, alla siringa con ago a 90° ed a micro pipette.

Tutti questi strumenti richiedono però una applicazione manuale.

Esistono, invece, anche apparecchi meccanici che permettono di depositare macchie con le migliori caratteristiche: con forma di banda o di punto, di dimensioni e volume desiderati.

La risoluzione migliora quando la deposizione del campione è attraverso una banda piuttosto che uno spot.

L'impiego di un sistema completamente automatizzato ha reso questo passaggio non critico, permettendo alla tecnica analitica di eseguire correttamente calibrazioni di routine.

Il depositore Camag Linomat V (figura 19), è dotato di un software che gestisce la modalità di deposizione in termini di spazio sulla lastra, volume depositato e forma della traccia.

Per creare una banda sottile, il Linomat muove meccanicamente la lastra, posta su di una slitta mobile, al di sotto di una siringa fissa, la quale spruzza il campione grazie ad un atomizzatore a flusso di azoto.



Fig.19 Depositore Camag Linomat 5

Una volta depositato, il campione si concentra sullo strato cromatografico in quanto il solvente evapora e per agevolare questa importante fase il Linomat 5 consente di regolare la velocità di deposizione in funzione della volatilità del solvente.

Nella cromatografia planare di tipo quantitativo, questo tipo di deposizione porta ai seguenti risultati:

- Il campione è distribuito uniformemente sull'intera lunghezza della banda depositata.

Grazie a ciò è possibile fare scansioni di aliquote del campione come ad

esempio misurando la densità della sola parte centrale della banda.

Questo fatto assicura una migliore accuratezza al metodo.

- ✦ Per calibrazioni "multilevel" è possibile applicare diversi volumi dello stesso campione in modo da generare standard a concentrazione diversa. Il tempo utilizzato per preparare standard a differenti concentrazioni viene così risparmiato.

Inoltre il metodo delle aggiunte che viene utilizzato piuttosto di frequente si

Può utilizzare semplicemente depositando in successione le due diverse

soluzioni (campione e standard) sulla stessa banda.

Il Linomat 5 è controllato dal programma winCATS quindi, la dimensione del piatto cromatografico, il numero e la distanza fra le tracce, il numero ed i volumi dei campioni vengono tutti programmati e salvati in questo programma di modo che tutte le informazioni possano poi essere utilizzate per la successiva analisi densitometrica.

L'unica operazione manuale si riduce alla pulizia della siringa ed al successivo riempimento ed inserimento nel depositore.

In seguito, è possibile localizzare facilmente le bande per la determinazione densitometrica scansionandone un'aliquota, scegliendo un'ampiezza di fenditura che sia inferiore alla lunghezza della banda.

Le siringhe si possono avere a volumi differenti e sono tutte in vetro, in modo che l'operatore abbia la capacità di vedere se il campione prima di essere depositato non presenti bolle d'aria.

Il Linomat 5 è in grado di memorizzare dieci metodi di deposizione i quali possono essere immessi direttamente dall'apposita tastiera che si trova sul pannello oppure possono essere scaricati da un computer in cui si trovi il winCATS.

Quando il depositore sta lavorando, il display mostra le operazioni che sta svolgendo.

## 5.5. SVILUPPO CROMATOGRAFICO

Si tratta dell'elemento centrale della tecnica in quanto l'eluizione nelle camere cromatografiche è critica in quanto è fondamentale scegliere la camera più appropriata e maneggiarla in maniera corretta.

Inoltre esistono molti equilibri e molte interazioni chimico-fisici che influenzano la buona riuscita di una separazione.

Sul mercato esiste una vasta gamma di camere cromatografiche e non esiste un criterio per definire quali sono le migliori e quali le peggiori ma semplicemente ognuna di esse risulta possedere caratteristiche differenti.

In una camera saturata le pareti interne possono essere dotate di carta in cui si trova imbevuto il solvente di sviluppo.

Prima di introdurre la lastra cromatografica la camera deve essere coperta per un tempo ben definito affinché si raggiunga al suo interno uno stato di equilibrio liquido-vapore.

Generalmente la saturazione si verifica in 20-30 minuti ed importante è introdurre la lastra cercando di alterare tale stato il meno possibile, spostando leggermente il coperchio e riportandolo nella sua sede il prima possibile.

L'apertura delle camere ha un effetto più piccolo per quelle di grande dimensione.

E' importante che il piatto sia posto in posizione verticale con lo strato attivo rivolto all'interno della camera per una maggiore interazione con il solvente.

In una camera non saturata, la quantità di solvente da utilizzare deve essere la più piccola possibile, non deve essere presente carta al suo interno ed il piatto cromatografico deve essere introdotto immediatamente dopo il solvente.

L'equilibrio solvente-eluyente, durante l'eluizione, si stabilisce solo in maniera parziale.

Esiste anche l'opzione di camera parzialmente saturata in cui il solvente, prima di introdurre la lastra; viene lasciato per un certo periodo nella camera chiusa ma senza la carta, la separazione però risulta meno riproducibile.

E' possibile eseguire uno sviluppo a sandwich in cui la lastra è posta a breve distanza, 1-2 mm, da una seconda lastra.

Un'altra possibilità è quella di utilizzare le camere orizzontali.

Si tratta di camere presaturate, in cui la fase gas ha a disposizione un piccolo volume ed esiste un contro-piatto che ha la funzione di permettere una separazione a "sandwich" fornito di un sottile strato di carta imbevuta di solvente.

Durante la separazione, la parte asciutta dello strato è preconditionata in maniera efficiente, grazie alla tipologia di camera.

In definitiva esistono importanti regole che per una buona riuscita di analisi è importante rispettare sempre:

- Tutte le camere devono essere accuratamente chiuse altrimenti il processo di separazione risulta disturbato.
- La modalità di separazione a sandwich dà bande strette e separazioni riproducibili ma ha l'inconveniente dei fronti secondari.
- Le camere non sature invece danno bande strette ma risultati non propriamente riproducibili con un fronte del solvente non sempre lineare soprattutto quando la fase mobile contiene componenti volatili. I valori di  $R_f$  sono superiori rispetto ad una separazione in camera saturata.
- Le camere sature, invece, sono sistemi molto stabili che forniscono risultati riproducibili, anche se in generale le bande risultano più allargate e la saturazione allunga i tempi di analisi.

### **Camere a fondo piatto**

I principali vantaggi di queste camere sono quelli di essere poco costose, di saturarsi rapidamente e di risultare sistemi stabili che danno risultati decisamente riproducibili.

Per contro, richiedono un elevato consumo di solvente.

### **Camere "TWIN-TROUGH"**

Questo tipo di camere permettono un minor consumo di solvente che raggiunge un livello di circa 5-10 mm nei canali del fondo.

Risultano essere un poco più costose e possono comodamente funzionare anche in saturazione immergendo un foglio di carta in uno dei due canali.

Se teniamo conto di tutti i fattori importanti per una separazione tra cui costi, applicabilità, flessibilità e riproducibilità, questo tipo di camere risulta essere una buona scelta.

### **Camere a sviluppo orizzontale**

Sono un'ottima scelta in termini di flessibilità e costi operativi.

Danno buona riproducibilità, ma certamente non risultati confrontabili con una identica separazione condotta nelle camere citate sopra.

La ragione principale è dovuta al fatto che l'eluizione procede in senso orizzontale piuttosto che verticale ma il loro contributo lo danno anche la geometria della camera e il ridottissimo volume della fase gas (fig.20).

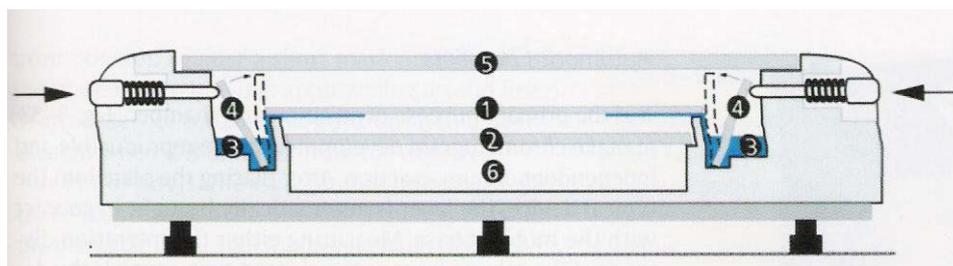


Fig.20 Camera a sviluppo orizzontale

La lastra da sviluppare è posta a faccia in giù e la riserva di solvente (3) viene trasferita alla lastra stessa attraverso un sottile film capillare.

Nella modalità di separazione con camera non satura il contro piatto (2) viene rimosso e la riserva di solvente (6) deve rimanere vuota, mentre per separazioni con camera satura la riserva centrale (6) deve essere riempita con solvente e la separazione parte senza tempi di attesa.

La riserva centrale può essere utilizzata anche come sede di solvente che ha lo scopo di condizionare la lastra.

I vantaggi di queste camere sono dovuti ad un bassissimo consumo di eluente e soprattutto alla possibilità di eseguire eluizioni simultanee su entrambi i lati della lastra.

### **Camere automatiche**

Lo scopo primario delle camere automatiche è di rendere le separazioni assolutamente riproducibili ed indipendenti dal fattore umano.

Dopo aver posto la lastra nel suo alloggiamento, questa entra automaticamente in contatto con l'eluente ed è possibile misurare la distanza del fronte del solvente od il tempo di eluizione.

Naturalmente si tratta di un mezzo decisamente più costoso delle camere tradizionali ma è anche vero che tutte le operazioni sono standardizzate a partire dal tempo di saturazione, il condizionamento, la fase dello sviluppo cromatografico, l'asciugatura del piatto ed il controllo dell'umidità relativa.

## **5.6. AMD-SVILUPPO MULTIPLO AUTOMATIZZATO**

In letteratura la tecnica di sviluppo multiplo automatizzato è spesso descritta per sottolineare il fatto che migliora la risoluzione.

Migliorare la risoluzione è principalmente dovuto ad un effetto di focalizzazione delle bande e ad una estensione del tempo di migrazione.

Si tratta di una tecnica separativa in gradiente che utilizza sviluppi ripetuti con solventi a diversa forza sullo stesso strato cromatografico.

Solitamente la forza solvente cala all'aumentare del numero di eluizioni e questo calo di forza è combinato con un aumento della distanza di sviluppo.

La capacità separativa di questa tecnica è molto elevata ed in molti casi confrontabile con quella dell'HPLC e la forza di questa tecnica è che la separazione può essere affinata per ogni singolo segmento del cromatogramma.

In cromatografia planare sono possibili separazioni unidimensionali o bidimensionali.

Nel caso dello sviluppo multiplo unidimensionale, il piatto TLC viene sviluppato per una certa distanza e tempi prescelti, quindi lo sviluppo viene arrestato ed il solvente viene allontanato dal piatto per evaporazione: il processo di eluizione viene ripetuto varie volte.

Questa strategia, usata per separare miscele complesse, permette variazioni dei parametri sperimentali primari, quali la lunghezza della lastra cromatografica, la composizione della fase mobile in ciascuno sviluppo ed il numero degli sviluppi.

Eluenti deboli sono necessari per separare le sostanze meno trattenuate, mentre i componenti più fortemente trattenuati possono essere separati da eluenti forti.

Una caratteristica particolare del processo di sviluppo è il meccanismo di riconcentrazione della banda (fig.21), che aumenta l'efficienza dello strato contrastando il processo di diffusione della zona.

Ogni volta che il solvente attraversa la fase stazionaria, comprime la macchia nella direzione dello sviluppo: questa ha inizialmente forma rotonda, poi gradualmente diventa ovale finché, se si utilizza un numero sufficientemente elevato di sviluppi, si comprime in una banda sottile.

La compressione avviene perché la fase mobile viene in contatto dapprima con la parte inferiore della macchia, dove le molecole del campione cominciano a muoversi prima di quelle molecole che si trovano sopra il fronte del solvente; quando il fronte del solvente ha superato la macchia riconcentrata, questa migra e si allarga per diffusione secondo il meccanismo usuale.

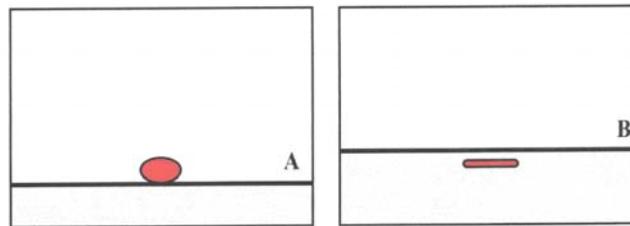


Fig.21 Meccanismo di riconcentrazione della zona. A) La fase mobile viene in contatto dapprima con la parte inferiore della banda dove le molecole del campione cominciano a muoversi prima delle molecole

che si trovano nella parte superiore della macchia ancora non raggiunta dal fronte del solvente. B) Quando il fronte del solvente ha superato la banda riconcentrata, questa migra e si allarga per diffusione secondo il meccanismo usuale.

Come si vede dalla figura 22, è possibile far migrare una macchia per distanze considerevoli senza variarne in modo significativo le dimensioni nella direzione di migrazione.

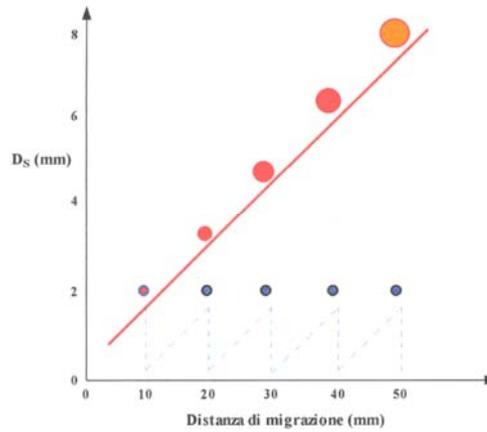


fig. 23 Variazione del diametro della macchia ( $D_s$ ) in funzione della distanza

percorsa: ● Nello sviluppo multiplo unidimensionale; ● Nello sviluppo multiplo tradizionale.

Affinché l'effetto della concentrazione della banda sia apprezzabile è necessario che il numero degli stadi sia sufficientemente elevato (minimo 10), per questo motivo si è automatizzato completamente il processo.

Il processo di sviluppo multiplo è stato introdotto da Burger (K. Burger, 1984K. Burger, 1986 ) e posto in commercio dalla Camag, lo schema dell'apparecchio è mostrato nella figura seguente.

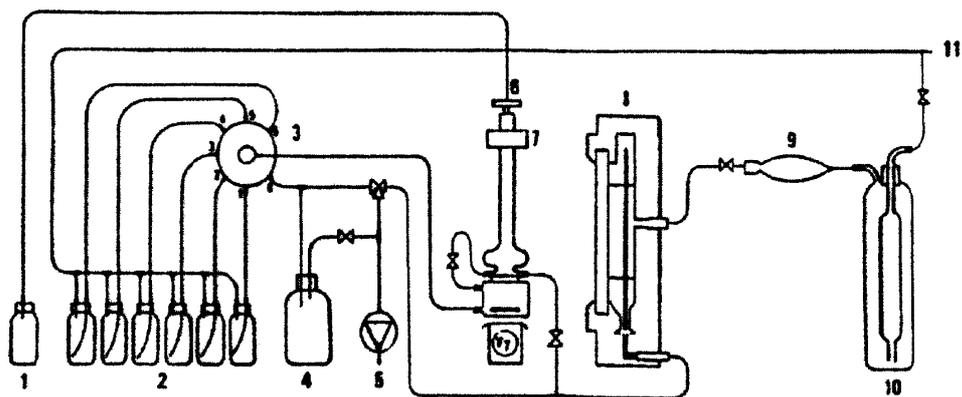


fig.23 Schema dello strumento per lo sviluppo multiple automatizzato: 1 Bottiglia di miscelazione 2 Contenitori di riserva dei solventi 3 Valvola ad 8 vie 4 Bottiglia di scarico dei solventi 5 Pompa da vuoto 6 Miscelatore 7 Barriera di protezione per la luce 8 Camera di sviluppo 9 Serbatoio per il gas 10 Bottiglia di lavaggio del gas 11 Rifornimento di gas

La lastra HPTLC su cui sono stati depositati i campioni in esame viene posta nella camera di sviluppo (8).

Le sequenze operative iniziano con uno stadio di essiccazione, ottenuto sotto vuoto nella camera cromatografica (chiusa ermeticamente), seguito da uno o più stadi di condizionamento dello strato: tali stadi utilizzano un flusso d'azoto secco oppure umidificato in seguito al passaggio in una bottiglia di lavaggio (10).

Il gas di condizionamento viene immagazzinato in un contenitore di plastica (9), prima di essere immesso nella camera cromatografica ; si possono utilizzare atmosfere con diversa umidità relativa o con sostanze volatili come ammoniacca, oppure sostanze acide come acido acetico, però la scelta della sostanza da usare nel condizionamento deve tenere conto del fatto che essa deve poi essere allontanata sotto vuoto.

La composizione dell'eluente viene controllata da una valvola ad otto vie (3) collegata a diverse bottiglie contenenti una riserva dei vari solventi (2), l'eluizione avviene per spinta dell'eluente sotto pressione di N<sub>2</sub> nella camera di sviluppo e la lastra viene eluita per una distanza predeterminata, regolata attraverso il tempo in accordo con la seguente relazione:

$$Z_f = \sqrt{kt}$$

E' quindi possibile, impostando un tempo finito, far percorrere al fronte del solvente una determinata distanza, una volta calcolata sperimentalmente la sua costante di velocità.

Al termine del tempo di sviluppo, il solvente viene rapidamente allontanato dalla camera di sviluppo ed inviato ad una bottiglia di scarico (4), il solvente che imbibisce lo strato viene invece eliminato sotto vuoto. Dopo lo stadio di essiccazione, il ciclo successivo inizia nuovamente con il preconditionamento dello strato, l'aggiunta di una nuova fase mobile, l'allontanamento della fase mobile alla fine del tempo di sviluppo selezionato ed infine l'essiccazione sotto vuoto dello strato.

Tutti gli stadi sono automatizzati per cui, una volta che tutto il processo è stato programmato nell'unità di controllo, può essere portato a termine senza l'intervento dell'operatore.

Solitamente nelle separazioni AMD lo strato viene sviluppato ripetutamente nella stessa direzione con sviluppi successivi, incrementando man mano la distanza di migrazione del fronte.

Gli incrementi sono di solito compresi tra 1 e 5 mm ed un programma completo comprende 10-30 step.

La composizione del solvente viene modificata nei vari stadi successivi, in modo tale da ottenere un gradiente di composizione a gradini: il gradiente di solito comincia con l'eluente più forte e continua, negli step successivi, con la diminuzione della sua forza.

Le diverse sostanze migrano sullo strato fino al punto in cui ciascuna di esse trova la sua posizione finale: questa posizione e l'ampiezza della banda finale non sono più sensibilmente influenzate dagli sviluppi negli stadi successivi in cui vengono separate le sostanze che interagiscono meno fortemente con la fase stazionaria e necessitano quindi di solventi meno forti.

Vi sono due tipi di variabili che possono essere ottimizzati nello sviluppo multiplo incrementale automatizzato:

- ➡ il primo riguarda le variabili del processo che controllano le operazioni dell'apparato AMD e comprendono tutte le funzioni temporali che devono venire fissate per eseguire il programma;
- ➡ il secondo riguarda l'ottimizzazione della risoluzione del campione e concerne sia la scelta della fase mobile che della fase stazionaria.

Vi è una certa sovrapposizione tra i due tipi di variabile ma conviene dapprima trattarli separatamente.

Le funzioni temporali, che devono essere stabilite all'inizio del programma, includono il tempo di essiccazione, il tempo di condizionamento dello strato, gli incrementi di tempo necessari per l'incremento della distanza percorsa dall'eluente in ogni ciclo ed il numero totale di cicli da eseguire.

Il tempo di essiccazione tra due sviluppi successivi dipende dalla volatilità dei componenti della fase mobile e può essere determinato per tentativi.

E' conveniente utilizzare un apparato di misurazione del vuoto per eseguire le condizioni di essiccazione.

Lo stadio di preconditionamento si attua di solito evacuando la camera di sviluppo per 30 secondi e riempiendola con gas precedentemente condizionato, tale stadio può essere ripetuto sequenzialmente per garantire un condizionamento riproducibile dello strato in ciascun step.

Un tempo ben definito deve essere prefissato per l'eluizione durante il primo stadio; questo comporta un posizionamento esatto della banda iniziale rispetto al livello del solvente nella camera cromatografica, essendo questa prima eluizione molto breve (di solito pochi millimetri). Il tempo di ciascuna eluizione successiva viene poi programmato al fine di produrre l'incremento desiderato in ciascun ciclo di eluizione successivo.

Come si è visto, l' equazione sopra riportata è una relazione quadratica tra la distanza di migrazione del fronte del solvente ed il prodotto della costante di velocità della fase mobile (ad una data composizione e per un dato strato) per il tempo.

Per un dato strato, la costante di velocità varia con la natura del solvente e con la temperatura, tale costante deve essere determinata sperimentalmente per ciascun sistema cromatografico in studio ed una volta determinata la  $k$  e fissato il programma dei tempi di sviluppo, le distanze di migrazione si riproducono molto bene nel corso di differenti analisi ripetute, essendo il procedimento completamente automatizzato.

Il numero totale di stadi necessari, in un processo di separazione, per una risoluzione ottimale, deve essere valutato per tentativi e normalmente è compreso tra 10 e 30.

## **5.7 Ottimizzazione di una separazione AMD**

Una separazione AMD ottimizzata contiene i componenti del campione adeguatamente separati l'uno dall'altro e distribuiti in modo uniforme sullo spazio cromatografico disponibile.

La posizione delle bande sul cromatogramma finale dipende principalmente dalla scelta dei componenti dell'eluente, dalla pendenza del gradiente e dall'ottimizzazione della forma del gradiente stesso.

La scelta dei solventi adeguati (forza e selettività) per una certa separazione viene effettuata per tentativi.

Due filosofie generali si possono adottare per lo sviluppo multiple AMD.

- Una si basa sull'uso di un gradiente universale che inizia con il solvente più polare, finisce con quello meno polare ed usa diclorometano od isopropil o terz-butil etere come solvente con polarità intermedia, chiamato solvente di base (fig.24).

Metanolo od acetonitrile vengono generalmente usati come componenti polari e la scelta tra i due si fa su considerazioni inerenti la solubilità dei campioni.

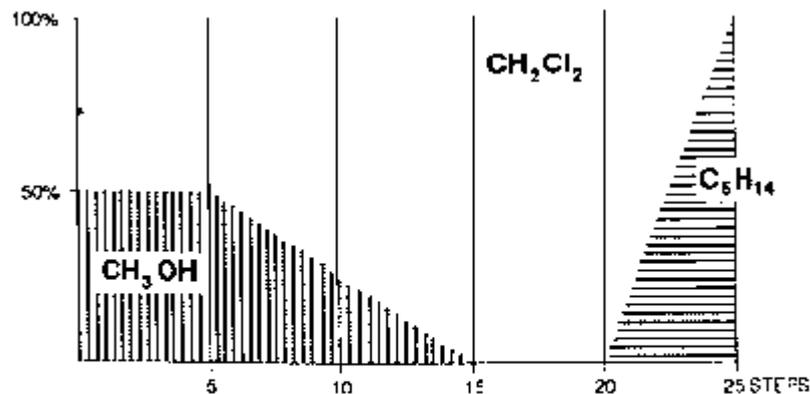


Fig.25 Tipico gradiente universale in AMD a 25 step.

Scalando opportunamente il densitogramma ottenuto con questo metodo e sovrapponendolo al gradiente universale si possono identificare le porzioni di tale gradiente che interessano la separazione del campione in esame.

Prendiamo come esempio i corticosteroidi, è possibile individuare la composizione iniziale e finale del solvente, in quanto solo la porzione di diclorometano e metanolo è interessata dalla presenza di picchi.

Vengono così valutati i limiti della forza del solvente e da qui si può quindi procedere all'ottimizzazione della forma del gradiente cercando di diminuirne la pendenza, il che significa cambiare più lentamente i rapporti delle due concentrazioni dei solventi e quindi permettere una migliore separazione delle sostanze individuate.

Quindi in generale per qualsiasi miscela da separare, il programma AMD può essere modificato per generare gradienti con bassa pendenza, per parti del cromatogramma in cui i picchi non sono ben separati e gradienti con maggior pendenza in regioni in cui le bande sono molto separate fra di loro.

- L'altro modo per mettere a punto una separazione AMD è quello di usare standard rappresentativi del campione in esame ed effettuare prove in isocratica; molte prove isocratiche possono essere effettuate in parallelo, cosicché si può ottenere un gran numero di informazioni in breve tempo.

Per comprendere l'utilità dell'uso di dati isocratici è conveniente considerare il caso più generale, quello del gradiente universale.

Esso prevede una parte iniziale formata da miscele binarie del solvente più forte e del solvente base, una parte intermedia costituita dal solvente puro una parte finale costituita da miscele binarie di solvente base e solvente più debole.

Si comincia con lo studio degli standard più polari, utilizzando miscele binarie di differente selettività formate da vari solventi forti più il solvente base, mentre la ritenzione degli standard medio polari ed apolari viene

studiata rispettivamente con il solvente base puro e con miscele formate dal solvente base e con solventi apolari.

I dati isocratici ottenuti con le varie miscele binarie vengono posti in grafico, espressi come  $R_m$  in funzione della composizione del solvente.

L'espressione matematica che definisce  $R_m$  è la seguente:

$$R_m = \log k' = \log \frac{1 - R_f}{R_f}$$

ed indica che  $R_m$  è direttamente legato al fattore di capacità  $k'$  (ricordiamo che  $k'$  è per definizione il rapporto tra i tempi che rispettivamente la sostanza passa nelle due fasi)

Un esame della relazione esistente tra  $R_m$  e la composizione del solvente può dare utili informazioni sui seguenti punti:

1. sui limiti estremi di polarità del gradiente, come solvente iniziale (per i primi stadi AMD) viene scelto un solvente che possieda una forza sufficiente per far migrare le sostanze più trattenuate, mentre come solvente finale viene scelto quello che permette una separazione accettabile dei componenti meno trattenuati senza farli migrare troppo vicino al fronte del solvente
2. sui solventi aventi la migliore selettività, ossia quelli che causano la spaziatura ottimale delle bande
3. sulla migrazione totale dei componenti al termine dello sviluppo multiplo: dalle relazioni di  $R_m$  in funzione della composizione del solvente è possibile prevedere la migrazione parziale dei soluti per ciascuno step isocratico per ogni stadio del processo AMD.

## 5.8 OverPressured Thin Layer Chromatography (OPLC)

### 5.8.1 Caratteristiche della strumentazione OPLC

Il termine **OPLC**, acronimo di **OverPressure Layer Chromatography** (o anche Optimum Performance Laminar Chromatography), come già accennato in precedenza, si riferisce ad un sistema di eluizione che utilizza una pompa per forzare la fase mobile attraverso quella stazionaria su cui è esercitata una pressione elevata ( 40-50 bar ) per mezzo di un cuscino gonfiato.

La ragione per cui questa tecnica ha avuto un forte sviluppo a partire dagli anni '70 risiede nel fatto che ottimizza l'omogeneità del flusso laminare e laterale attraverso lo strato adsorbente: i fattori che determinano questo risultato sono fondamentalmente tre:

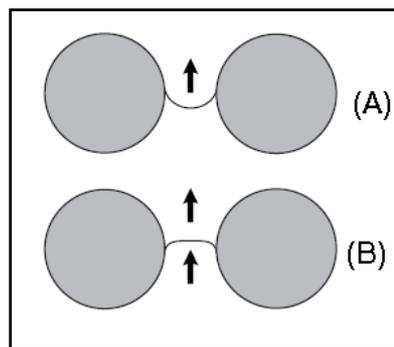


Fig. 26 Profilo del fronte del solvente tra le particelle della fase stazionaria in TLC tradizionale (A) e in HPTLC a flusso forzato (B).

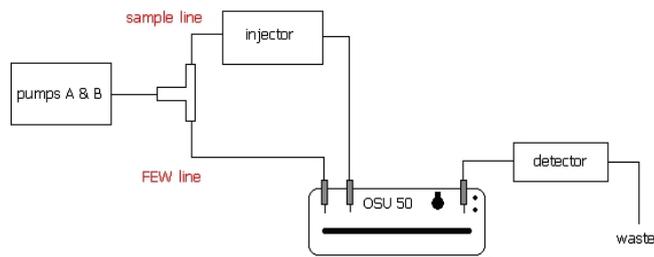
- ➡ la gestione elettronica della procedura permette di controllare meglio le condizioni cromatografiche e la qualità delle separazioni;
- ➡ l'utilizzo delle cosiddette "colonne piatte" preconfezionate e pronte all'uso che permettono un posizionamento molto preciso ed hanno una sigillatura dei margini molto regolare;

- l'applicazione della tecnologia FEW ( Flowing Eluent Wall ) che riduce drasticamente i disturbi ai bordi della lastra e nel sito di introduzione del campione.

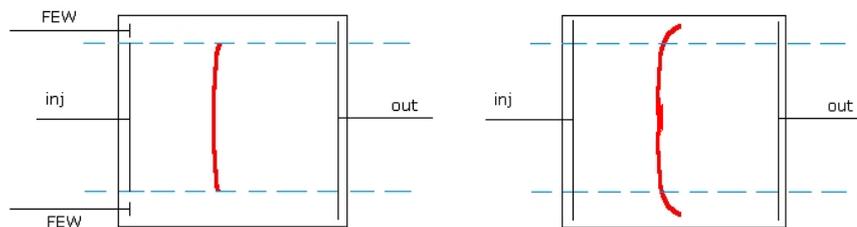
La tecnica FEW, consiste semplicemente in un dispositivo che divide il flusso del solvente a monte dell'iniettore, indirizzandone una parte a quest' ultimo ed una ai margini del piatto.

Viene così pompato, vicino al margine creato dall'elastomero, un flusso di eluente senza campione che procede alla stessa velocità di quello che sviluppa la lastra. Questo flusso permette al campione di rimanere confinato al centro del piatto migliorando la forma degli spots dei campioni depositati alle estremità della lastra che altrimenti subiscono un effetto di dispersione verso l'esterno (Fig. 27 ) .

## Flowing Eluent Wall (FEW) Technology



(A) Schema OPLC dotato del sistema FEW



(B) Sviluppo di un piatto con il sistema FEW e senza

Fig.27 Tecnologia della FEW

L'unicità del sistema OPLC rispetto alle altre tecnologie di eluizione a flusso forzato risiede nella struttura che ospita la lastra cromatografica perché permette di utilizzarla nello stesso modo delle colonne per HPLC: per questo motivo si parla di "colonna piatta".

Una camera di sviluppo OPLC si compone di tre parti:

1. il piatto di separazione;
2. la cassetta costituita da un supporto in alluminio ed un foglio di PTFE;
3. la pressione idraulica controllata elettronicamente.

La fase stazionaria è uniformemente distribuita su di un foglio di alluminio i cui contorni vengono sigillati con un elastomero per evitare di perdere fase mobile e quindi campione durante l'eluizione.

Il piatto viene posizionato con lo strato sottile, rivolto verso l'alto nell'apposita cassetta a diretto contatto con il foglio di PTFE.

Le cassette ( e quindi anche i piatti ), hanno dimensioni che variano da 5×20 a 10×20 sino a 20×20 cm, e permettono separazioni unidimensionali od anche bidimensionali a seconda delle esigenze.

La cassetta viene poi inserita nella camera di sviluppo dotata di un sistema idraulico di pressione dato da un cuscinio che una volta gonfio preme sul foglio di PTFE e quindi sullo strato sottile.

Prima che l'eluizione abbia inizio viene impostato il cosiddetto "volume rapido" o "volume di R" che costituisce il volume di eluente necessario a far sì che il fronte del solvente parta uniformemente lungo tutta la larghezza del piatto.

Fondamentalmente la tecnica permette di lavorare on-line, come si procede solitamente in HPLC, oppure off-line, cioè trattando ulteriormente lo strato sottile fuori dalla camera di sviluppo.

Questa seconda modalità operativa è quella che rende la tecnica particolarmente indicata quando il campione da depositare è sciolto in un solvente non miscibile con la miscela eluente oppure quando è necessario depositare grandi volumi di campione (dato che non vi è il vincolo dell'iniettore loop), situazioni che invece possono essere problematiche in HPLC (N. Bryson, D. Papillard, 2004).

Lo strumento presente nei nostri laboratori è l'**OPLC 50** della **BIONISIS**: è dotato di quattro bottiglie direttamente collegate alla pompa di iniezione dell'eluente. La pompa è in grado di lavorare in regime isocratico oppure in regime di gradiente superiore ai tre step.

## Specifiche BIONISIS OPLC 50

<b>Velocità di flusso</b>	10 -10000 µl/min.
<b>Riproducibilità di flusso</b>	0.1%
<b>Massima pressione su HTSorb</b>	50 bar (727 psi)
<b>Massima pressione dell'eluente</b>	45 bar (655 psi)
<b>N.ro max di campioni per eluizione</b>	40 in off-line mode
<b>Massima deposizione</b>	100 mg, solo in preparativa con un campione alla volta
<b>Potenza richiesta</b>	230/110 V 50-60 Hz
<b>Dimensioni</b>	40 x 29.6 x 33.5 (L x W x H) cm
<b>Peso</b>	30 kg



### 5.8.2 Ottimizzazione del sistema eluente per separazioni OPLC

L'ottimizzazione del sistema eluente, oltre alle normali considerazioni per la scelta della miscela di sviluppo, deve tener conto di due problemi che si manifestano in TLC generalmente e in OPLC in particolar modo: la formazione della “**disturbing zone**” e l'**effetto multifronti**.

La “**disturbing zone**” consiste in un ristretto intervallo di  $R_f$  nel quale si può osservare una distorsione delle bande delle sostanze risolte, a volte abbastanza pronunciata da rendere difficile la valutazione della separazione.

La causa di questo fenomeno risiede nel fatto che sulle particelle di fase stazionaria sono adsorbite molecole gassose dell'atmosfera circostante.

Durante il processo di sviluppo, esse vengono desadsorbite dal solvente: se la velocità di desadsorbimento è inferiore alla velocità di avanzamento del fronte allora le molecole gassose non sono in grado di sfuggire e si

sciolgono nel solvente, formando, al momento della saturazione, microbolle che migrano con esso.

La disturbing zone si osserva al confine tra la zona in cui si formano le microbolle e quella in cui il solvente non è saturato.

La sua formazione dipende dunque dalla quantità di gas fisicamente legato sulla superficie della fase stazionaria  $m_a$  e dalla quantità di gas sciolto nell'eluente  $m_s$  e per la precisione si verifica quando  **$m_a > m_s$** .

La quantità di gas fisicamente adsorbito sulla fase stazionaria è funzione dei seguenti parametri:

- caratteristiche del gas (peso molecolare, affinità per l'adsorbente);
- caratteristiche dell'adsorbente (tipo, area superficiale, presenza di modificatori di superficie);
- temperatura (più è alta minore è  $m_a$ );
- pressione ( $m_a$  aumenta all'aumentare della pressione).

Invece la quantità di gas disciolto  $m_s$  dipende da:

- quantità e composizione dell'eluente;
- temperatura (la solubilità dei gas diminuisce con l'aumentare della temperatura);
- pressione (solubilità aumenta con l'aumentare della pressione).

Esistono tre modi per eliminare la "disturbing zone".

Il primo consiste nell' influenzare la posizione della "zona".

In OPLC il mantenimento di una velocità di flusso costante è realizzato applicando un gradiente di pressione.

Maggiore è la velocità di flusso più questo gradiente è ripido e il valore di  $R_f$  della "disturbing zone" è alto.

Nella pratica si comincia sempre operando ad alte velocità per determinare l'esatta posizione della disturbing zone.

Se questa appare ad alti valori di  $Rf$  (  $> 0.7$  ), la zona può essere shiftata fuori dal cromatogramma utilizzando una velocità di eluizione superiore.

Se invece  $Rf < 0.3$ , utilizzando velocità di eluizione inferiori, si potrebbe abbassare così tanto la zona di disturbo da non dare sovrapposizione con le sostanze separate. Nell'ipotesi peggiore in cui  $0.3 < Rf < 0.7$ , l'eliminazione della "zona" non è contemplata e si può solo tentare di farla cadere tra due sostanze ben separate.

Il secondo metodo consiste nell'assicurandosi che il gas desadsorbito venga completamente disciolto nel solvente:  $m_s < m_a$ .

Dal momento che la solubilità del gas aumenta all'aumentare della pressione, tutto il gas è disciolto nel solvente quando questa supera un certo valore "critico".

Infine, la terza strategia è quella di rimuovere completamente il gas adsorbito prima dell'eluizione.

Si effettua una precorsa con un solvente inerte come l'esano o meglio ancora con un solvente miscibile con l'eluente da utilizzare per la separazione, ma in cui i soluti non siano solubili.

L'**effetto multifronti** si verifica quando si utilizzano eluenti multicomponenti: in seguito alle diverse interazioni con la fase stazionaria, i componenti possono venire separati e si osserva la formazione di fronti secondari che dividono lo strato adsorbente in zone con differente forza eluente.

Le sostanze da separare che migrano assieme ai fronti dei solventi hanno una buona forma del picco mentre quelle che migrano prima o dopo questi fronti presentano codature.

Per tentare di risolvere questo inconveniente si può pensare di depositare le miscele da separare a differenti distanze dal punto di immissione della fase mobile di modo che una di queste soluzioni renda il cromatogramma libero dall'effetto dei multifronti (SZ. NYIREDY, 1987).

## **5.9. DERIVATIZZAZIONE**

### **Aspetti generali**

Da un punto di vista tecnico, derivatizzare significa trasferire sullo strato cromatografico un reagente che ci permette di discriminare le sostanze di interesse da eventuali altre sostanze presenti nella miscela separata.

La derivatizzazione si può fare utilizzando una soluzione in cui il piatto può essere immerso o spruzzato, od una fase gas.

La buona riuscita di una derivatizzazione chimica dipende dal tempo operativo, dalla temperatura di riscaldamento del piatto dopo trattamento con agente derivatizzante e dalla sua concentrazione, tutti fattori che devono assolutamente essere standardizzati.

Le zone derivatizzate spesso risultano non stabili, quindi anche il successivo step di valutazione deve seguire un protocollo standard definito.

### **Derivatizzazione in fase gas**

E' vantaggiosa perché si tratta di una procedura rapida e che agisce in maniera uniforme.

Sfortunatamente sono pochi i reagenti che hanno idonee caratteristiche per essere utilizzabili in fase gas (iodio, bromo, cloro, acidi e basi volatili e qualche altro gas come l'acido solfidrico).

Operativamente si utilizzano camere Twin-Trough , in cui il reagente è posto in uno dei due canali mentre la lastra è appoggiata nel canale vuoto.

### **Derivatizzazione SPRAY-IN**

E' una tecnica che offre diversi vantaggi: è semplice e rapida, non richiede un equipaggiamento costoso ed utilizza piccoli volumi di reagente.

Grazie alla rapidità di esecuzione è una tecnica utilizzata anche quando si è nella fase di messa a punto del metodo, in cui è necessario testare diversi reagenti.

E' importante ricordare che, per determinazioni quantitative, fattori fondamentali sono la copertura uniforme della lastra e la finezza della soluzione quando deve essere nebulizzata, la quale è legata alla pressione del gas nebulizzatore ed alla forma dell'ugello del sistema.

Esistono strumenti automatizzati che permettono di eseguire in maniera ripetibile questo tipo di derivatizzazione.

### **Derivatizzazione per immersione**

La derivatizzazione per immersione è un modo di trasferire il reagente in modo decisamente omogeneo.

Anche in questo caso esistono apparecchiature apposite in grado di eseguire l'immersione della lastra in maniera riproducibile in termini di tempo di permanenza nella soluzione e velocità di immersione, fattore che permettere il più possibile di limitare la formazione di linee di reagente.

A differenza della tecnica spray qui non c'è formazione di fumi nocivi ed il rischio chimico di esposizione è decisamente limitato.

La tecnica di immersione può richiedere una ridotta concentrazione del reagente ed un utilizzo di un solvente che non abbia la capacità di "wash off" dei componenti separati.

Dopo l'immersione il piatto è ricoperto da un eccesso di liquido e quindi dovrebbe rimanere in posizione verticale per evitare un eccessivo allargamento dei picchi.

Prima di porre la lastra in stufa è buona norma pulire il retro della lastra.

## 5.10. VISUALIZZAZIONE DEI CROMATOGRAMMI

A differenza delle altre tecniche cromatografiche le TLC offrono l'opportunità unica di visualizzare i risultati direttamente ad "occhio nudo" senza l'ausilio di particolare strumentazione.

Infatti le sostanze colorate si vedono direttamente sul piatto ed anche quelle che assorbono alla luce UV a 254 nm è possibile vederle grazie all'ausilio di un indicatore fluorescente che imbibisce la fase stazionaria ( $F_{254}$ ) e che può essere eccitato a fluorescere con una lampada UV.

Esistono anche piatti con indicatori a 366 nm e sostanze che non necessitano di derivatizzazione in quanto emettono a 366 nm se eccitate con una lampada UV.

In definitiva i cromatogrammi si possono valutare:

- All'interno del visibile
- Alla luce UV 366 nm
- Alla luce UV 254 nm

## 5.11. DENSITOMETRIA

Il principale vantaggio di usare un apparecchio in grado di valutare la densità di una massa è dato dalla possibilità di poter quantificare le sostanze separate.

Questa è infatti la richiesta primaria per il salto di qualità che la cromatografia planare doveva fare per poter essere definita anche "moderna" e quindi uno strumento affidabile e confrontabile con altre tecniche maggiori come l'HPLC e la GC.

## Principi fisici di misura

Quando la luce colpisce la superficie di uno strato sottile, costituito da piccole, sferiche ed irregolari particelle di gel di silice può essere

- ➔ Assorbita
- ➔ Riflessa
- ➔ Dispersa

Nel densitometro, un fascio di luce di forma e dimensione ben definite, colpisce lo strato sottile verticalmente.

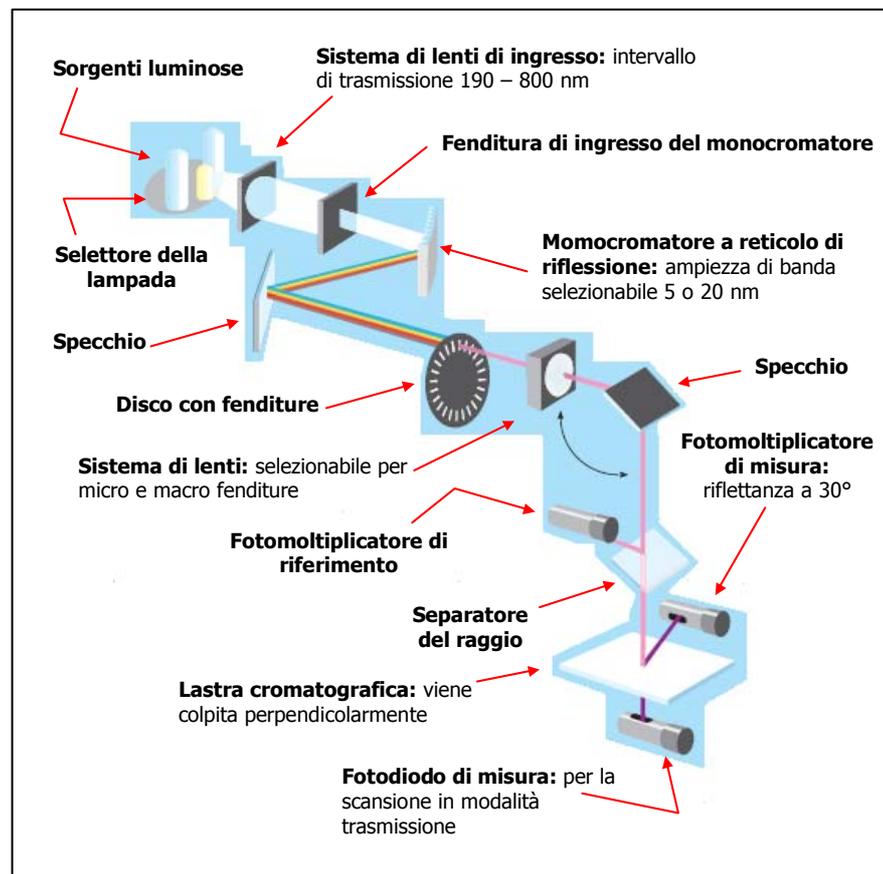


Fig.27 Schema del sistema ottico del CAMAG TLC Scanner 3

Il detector è disposto a 45° rispetto al fascio incidente e di tutta la luce che raggiunge il piatto solo una piccola ma costante porzione può essere misurata ed è quella che raggiunge il detector.

Questa modalità di misura è nota come remissione (riflessione).

Quando il piatto si muove, la porzione di luce che raggiunge il detector permette la registrazione di una linea di base in funzione della posizione; tale valore corrisponde al 100% di riflessione che per essere riportato su di un grafico bidimensionale come sono i cromatogrammi è convertito a zero. Se c'è una sostanza in grado di assorbire la luce incidente il segnale che si genera al detector è più basso e dopo inversione sul grafico si genera un picco con una altezza corrispondente al segnale ed il cui massimo corrisponde al massimo valore di assorbimento; questa modalità è definita absorption measurement.

L'assorbimento può essere misurato in riflettanza oppure in trasmissione, solo la prima modalità risulta utilizzabile in quanto la trasmittanza risente molto della irregolarità dello strato sottile e del supporto di vetro che non permette il passaggio della luce UV.

Se invece le sostanze da analizzare sono eccitabili alla fluorescenza con luce ultravioletta si passa alla modalità fluorescence measurement.

In questo caso, un filtro (passband o cut-off) è posto tra lo strato ed il detector.

La luce monocromatica che proviene dalla sorgente (in genere si tratta di lampade al mercurio o deuterio) raggiunge lo strato ma la porzione che viene riflessa in direzione del detector viene bloccata ad opera del filtro.

Con questa modalità la linea di base ha un segnale pari a zero e nel momento in cui c'è emissione in fluorescenza il fascio luminoso, che possiede una lunghezza d'onda maggiore, passa attraverso il filtro e raggiunge il detector.

Esiste anche la modalità transmission measurement che è utilizzata più di rado, in cui il detector è posto sotto il piatto e misura la luce non assorbita dalla sostanza e dal supporto.

### **Misure quantitative**

Per poter correlare il segnale elettrico prodotto dal detector alla quantità di sostanza separata sullo strato sottile, si deve riuscire a trovare una relazione funzionale tra le due grandezze.

Diversamente dalle misure che si fanno per analiti contenuti in una soluzione, in cui il campione è omogeneamente distribuito in una cuvetta, in TLC il campione si trova legato allo strato sottile e non è omogeneamente distribuito.

In soluzione vale la famosa legge di Lambert-Beer

$$E = \varepsilon \cdot C \cdot d$$

In cui  $\varepsilon$  è il coefficiente di estinzione, C la concentrazione della soluzione e D la lunghezza della cuvetta.

In TLC, le misure di adsorbimento sono più complicate, in quanto la luce riflessa non è solo quella che proviene dallo strato superficiale del supporto, ma esiste anche la componente generata dagli strati più profondi.

La relazione di Kulbeka-Munk di seguito riportata dimostra l'assenza di linearità tra la luce riflessa R e la concentrazione C

$$(1 - R)^2 / 2 \cdot R = 2.303\varepsilon \cdot C / S$$

In cui R è la luce riflessa,  $\varepsilon$  è il coefficiente di estinzione, C è la concentrazione della sostanza ed S è il coefficiente di scattering.

Nonostante ciò, si osserva un aumento del segnale all'aumentare della quantità della sostanza, quindi se un set di sostanze standard è presente

sullo stesso strato sottile dei campioni, è possibile costruire una funzione che permette una calibrazione e quindi un'analisi di tipo quantitativo.

In absorption measurement i dati sono preferibilmente fittati da una funzione polinomiale, mentre una linearizzazione della funzione di Kulbeka-Munk generalmente non produce una accuratezza migliore nei risultati; in fluorescence measurement è applicabile una funzione lineare in quanto in fluorescenza il segnale è proporzionale alla intensità della luce usata per l'eccitazione e tale proporzionalità è riportata nella seguente relazione:

$$F = k \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot C$$

Dove F è la fluorescenza,  $I_0$  l'intensità della radiazione,  $\varepsilon$  il coefficiente di estinzione, C la concentrazione della sostanza e k è una costante.

Normalmente per la fluorescenza si utilizza una lampada al mercurio in quanto le sue linee spettrali di emissione risultano molto intense.

### **Densitometro**

Questa apparecchiatura offre la modalità più accurata per eseguire una quantitativa in HPTLC grazie alla possibilità di selezionare luce monocromatica nell'intervallo 190-800 nm, che può essere regolata al massimo valore di assorbimento o fluorescenza delle sostanze di interesse, di modo che la determinazione risulti la più sensibile possibile.

I limiti di rivelabilità sono, per l'assorbimento, al livello dei nanogrammi mentre per la fluorescenza si può arrivare sino ai picogrammi.

## SCOPO DELLA TESI

I bifidobatteri sono batteri saccaroliti anaerobi obbligati, che costituiscono uno di più importanti gruppi microbici intestinali dell'uomo.

La presenza e l'attività dei bifidobatteri nel colon è associata ad effetti benefici sulla salute dell'ospite, tanto da essere comunemente considerati probiotici e da trovare un impiego crescente come supplementi di prodotti alimentari e farmaceutici.

Sebbene siano stati abbondantemente studiati a livello fisiologico e biochimico, la loro affinità per le diverse fonti di carbonio non è stata sufficientemente approfondita.

A causa dell'assorbimento lungo il tratto gastrointestinale, il colon è un ambiente povero in mono e disaccaridi; la microflora intestinale è quindi adattata per utilizzare i carboidrati complessi resistenti all'idrolisi da parte degli enzimi digestivi.

La degradazione dei carboidrati non digeriti è frutto delle attività metaboliche esercitate dalla microflora commensale nel suo insieme: nel colon gli zuccheri non digeriti vanno incontro ad idrolisi, up-take e fermentazione da parte della complessa popolazione batterica.

Sebbene non rappresentino il gruppo batterico preponderante i bifidobatteri possono utilizzare come fonte di carbonio una vasta varietà di oligo e polisaccaridi di origine vegetale, glicoproteine e glico-coniugati prodotti dall'ospite.

Inoltre nel genere *Bifidobacterium* sono state identificate molte glicosil-idrolasi che forniscono ai bifidobatteri flessibilità nell'utilizzo delle fonti di carbonio e, quindi, un vantaggio selettivo all'interno dell'ecosistema intestinale.

Vista la crescente importanza dei bifidobatteri come probiotici, sono stati svolti numerosi studi per approfondire le capacità fermentative, in

particolare nei confronti di quei carboidrati non digeribili per i quali è stato dimostrato l'effetto bifidogenico e che trovano applicazione come prebiotici.

Tuttavia, nonostante l'ecosistema intestinale e la fonte di carbonio per i bifidobatteri sia costituita fundamentalmente da miscele di carboidrati complessi a bassa concentrazione, le conoscenze circa il comportamento fermentativo e le preferenze di *Bifidobacterium* in presenza di tali miscele, sono limitate.

Lo scopo di questo lavoro è la caratterizzazione del ceppo *Bifidobacterium adolescentis* MB239.

Verrà studiato lo sviluppo del ceppo in termini cinetici su tre grandi famiglie di oligosaccaridi: frutto-oligosaccaridi, galatto-oligosaccaridi e xilo-oligosaccaridi, partendo dallo studio dello sviluppo sui costituenti cardine di queste famiglie: fruttosio, galattosio e xilosio, per poi studiare le crescite su miscele di mono ed oligosaccaridi sempre della stessa famiglia (es. galattosio, lattosio), al fine di individuare un'eventuale gerarchia di tipo poliauxico nell'ordine di consumo degli zuccheri.

## CAPITOLO 6

### MATERIALI E METODI

#### 6.1. MICROBIOTA

Il ceppo di *Bifidobacterium* MB239, utilizzato in questo studio proviene dalla collezione dell'Istituto di Microbiologia Agraria dell'Università di Bologna (collezione del Prof. V. Scardovi).

La tassonomia è stata inizialmente attribuita tramite tecniche di ibridizzazione DNA/DNA con ceppi della collezione.

Recentemente l'attribuzione tassonomica è stata confermata a livello di specie mediante la tecnica del riboprinter automatizzato, utilizzando come enzima di restrizione EcoRI, e come marcatore l'operone ribosomiale di *E. coli*.

#### 6.2. TERRENI E CONDIZIONI DI COLTURA

*Bifidobacterium adolescentis* MB239, è mantenuto e coltivato in MRS (Difco) contenente 0,5 g/L di L-cisteina·HCl (MRS\*Cys) a 37°C per 48h in anaerobiosi.

Le prove finalizzate allo studio del comportamento fermentativo del microrganismo suddetto sono state condotte usando il terreno minimo semisintetico SM (Rossi et al., 2005), la cui composizione è riportata in tabella 5.

Casaminoacids	5.0 g /l
Acido ascorbico	10 g /l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 g /l
urea	2 g /l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g /l
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.7 g /l
L-cisteina · HCl	0.5 g /l
NaCl	0.2 g /l
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.01 mg /l
MnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.4 mg /l
acido borico	0.5 mg /l
KI	0.1mg /l
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.4 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.2 mg/l
FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0.2 mg/l
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0.4 mg/l
Acido nicotinico	2 mg/l
Acido p-aminobenzoico	1 mg/l
calcio pantotenato	1 mg/l
riboflavina	1 mg/l
Tween 80	1 g/l

Tabella 5 Composizione del brodo di coltura

I carboidrati in oggetto di analisi sono aggiunti in concentrazione tale da garantire che la crescita sia limitata dalla fonte carboniosa e non da altri componenti del terreno.

La composizione dell' SM è tale per cui, in assenza di carboidrati, MB 239 non è in grado di svilupparsi.

Per le fermentazioni condotte in presenza della miscela di frutto-oligosaccaridi le miscele degli zuccheri sono di tre tipologie, con le relative concentrazioni riportate nella tabella 6:

- Brodo con tre zuccheri (glucosio, fruttosio, galattosio)
- Brodo con sei zuccheri (fruttosilnistosio, nistosio, kestosio, raffinosisio, lattosio, saccarosio)
- Brodo con otto zuccheri (fruttosilnistosio, nistosio, kestosio, raffinosisio, lattosio, saccarosio, fruttosio, glucosio)

<b>Carboidrati</b>	<b>Ferm.1</b>		<b>Ferm.2</b>		<b>Ferm.3</b>	
	<b>mM</b>	<b>g/L</b>	<b>mM</b>	<b>g/L</b>	<b>mM</b>	<b>g/L</b>
<b>Glucosio</b>	40	7.20			24	4.32
<b>Fruttosio</b>	40	7.20			24	4.32
<b>Galattosio</b>	40	7.20				
<b>Lattosio</b>			40	6.84	24	4.10
<b>Raffinosio</b>			40	6.73	24	4.04
<b>Actilight:</b>				7.60		4.56
<b>Saccarosio</b>			0.52	0.18	0.32	0.11
<b>Fruttosilnistosio</b>			1.04	0.86	0.76	0.51
<b>Nistosio</b>			4.84	3.23	2.91	1.94
<b>1-Kestosio</b>			5.00	2.52	3.00	1.51

f-nistoso	11.3% ± 1.9%
nistoso	42.5% ± 0.3%
l-kestoso	33.1% ± 0.6%
saccarosio	2.4% ± 0.1%

Composizione actilight

Tabella 6 Composizione della miscela di mono di- ed oligosaccaridi per i brodi delle

tre tipologie di fermentazione (il peso molecolare dei FOS è stato ottenuto

facendo una media ponderata dei componenti della miscela).

Per le fermentazioni condotte in presenza della miscela di galatto-oligosaccaridi le miscele degli zuccheri sono di tre tipologie, con le relative concentrazioni riportate nella tabella

- ➔ Brodo con un monosaccaride (glucosio, galattosio)
- ➔ Brodo con un disaccaride (lattosio)
- ➔ Brodo con dieci zuccheri (glucosio, galattosio, lattosio, miscela GOS)

<b>Carboidrati</b>	<b>Ferm.1</b>		<b>Ferm.2</b>		<b>Ferm.3</b>		<b>Ferm.4</b>	
	<b>mM</b>	<b>g/L</b>	<b>mM</b>	<b>g/L</b>	<b>mM</b>	<b>g/L</b>	<b>mM</b>	<b>g/L</b>
<b>Glucosio</b>	100	18						
<b>Galattosio</b>			100	18				
<b>Lattosio</b>					100	34		
<b>GOS</b>							100	

Tabella 7 Composizione della miscela di mono di- ed oligosaccaridi per i

brodi delle tre tipologie di fermentazione (il peso molecolare dei GOS è stato ottenuto facendo una media ponderata dei

componenti della miscela).

Per le fermentazioni condotte in presenza della miscela di xilo-oligosaccaridi le miscele degli zuccheri sono di tre tipologie, con le relative concentrazioni riportate nella tabella

- ➔ Brodo con un monosaccaride (xilosio)
- ➔ Brodo con sei zuccheri (xilosio, xilobiosio, xilotriosio, xilotetrosio, xilopentosio, xiloesosio)

<b>Carboidrati</b>	<b>Ferm.1</b>		<b>Ferm.2</b>	
	<b>mM</b>	<b>g/L</b>	<b>mM</b>	<b>g/L</b>
<b>Xilosio</b>	<b>120</b>	<b>18.0</b>		
<b>XOS</b>			<b>120</b>	<b>18.0</b>

Tabella 8 Composizione della miscela di mono ed oligosaccaridi per i brodi

delle due tipologie di fermentazione (il peso molecolare degli XOS è stato ottenuto facendo una media ponderata dei componenti della miscela).

Le condizioni di anaerobiosi necessarie allo sviluppo di MB239 sono state ottenute incubando le colture (dall'infezione fino alla beuta con 200 ml di coltura) in camera anaerobica (Anaerobic System, Mod. 2028, Forma Scientific Co., Marietta, OH; ad atmosfera controllata N<sub>2</sub> 85%, CO<sub>2</sub> 10%, H<sub>2</sub> 5%). In fermentatore l'anaerobiosi è garantita da periodiche insuflazioni di azoto nel terreno di coltura e con periodiche insuflazioni di CO<sub>2</sub> nel contenitore del terreno affluente.

I reagenti chimici utilizzati, se non diversamente espresso, sono stati forniti dalla ditta Sigma (Steinheim, Germany), mentre quelli microbiologici da Difco laboratories (Detroit, USA).

## CAPITOLO 7

# CRESCITA DI *Bifidobacterium* MB 239 SU FOS

## 7.1. CONDIZIONI DI FERMENTAZIONE

### 7.1.1. BIOREATTORE

Le fermentazioni in modalità batch e continua sono state condotte in un bioreattore BM-PPS3 (Bioindustrie Mantovane, Italia) della capacità massima di 3 litri.

Il fermentatore PPS3 (Fig. 28), è dotato di un vessel cilindrico del diametro di 115 mm e di 290 mm di altezza, per un volume complessivo di 3033 cm<sup>3</sup> (= 3.033L).

Il vessel è una struttura di vetro e metallo composta da tre elementi principali: la base, il cilindro di vetro e la piastra di testa.

La base di acciaio inox contribuisce per circa un terzo al volume disponibile nel vessel; è circondata dall'intercapedine all'interno della quale sono immerse le resistenze per il riscaldamento e circola l'acqua di raffreddamento.

Nella base sono presenti tre bocchelli, due dei quali sono occupati dalla valvola di fondo (o di scarico) e dalla sonda del controllo della

temperatura. Il cilindro di vetro borosilicato contribuisce per la parte restante al volume disponibile.

La piastra di testa in acciaio inox chiude il fermentatore nella parte superiore; vi sono presenti bocchelli filettati in cui sono inseriti il condensatore dei gas di scarico, l'elettrodo di misura del pH, il sensore dell'ossigeno disciolto, l'ingresso dell'azoto, la valvola di sicurezza (per lo scarico all'aria di sovrappressioni interne superiori ad 1,44 bar) ed eventuali altri sensori, non utilizzati nel presente lavoro sperimentale.

I bocchelli restanti sono tappati con membrane in gomma e sono disponibili per connessioni sterili mediante aghi.

Nella faccia inferiore della piastra sono innestati tre frangionde.

Il gruppo di agitazione è costituito da un albero che attraversa la base del reattore, attraverso un tenuta meccanica, e su cui sono montate due turbine Rushton.

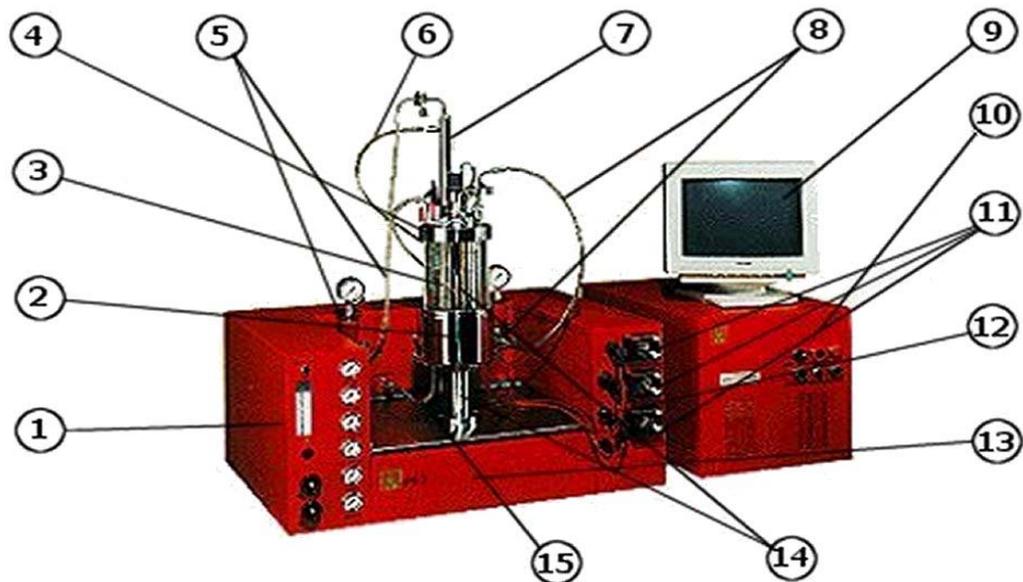


Figura 28 Il fermentatore BM-PPS3 3000: 1) Modulo di controllo fluidi; 2) Base del vessel; 3) Vessel in vetro; 4) Piastra di testa; 5) Gas di scarico: condotto, filtro e manometro; 6) Acqua di raffreddamento; 7) Condensatore; 8) Alimentazione aria: condotto, filtro e

manometro; 9) Touch-screen; 10) Modulo di misura, controllo e potenza; 11) Pompe peristaltiche per acidi, basi e antischiuma; 12) Cavi delle resistenze riscaldanti; 13) Modulo di supporto; 14) Gruppo di agitazione; 15) Acqua di raffreddamento.

Nel bioreattore PPS3 il processo fermentativo è controllato dal software BCS (Bioreactor Control System), che gestisce l'acquisizione, la gestione e l'archiviazione dei dati in tempo reale, la regolazione automatica di tutti i parametri di processo, secondo set-point fissi, a gradini o a rampa, e funge da interfaccia con l'operatore per la gestione "manuale" di tutte le regolazioni.

In figura 29 sono rappresentati in maniera sinottica tutti i componenti dell'impianto del PPS3, così come sono presentati dal software di gestione del fermentatore.

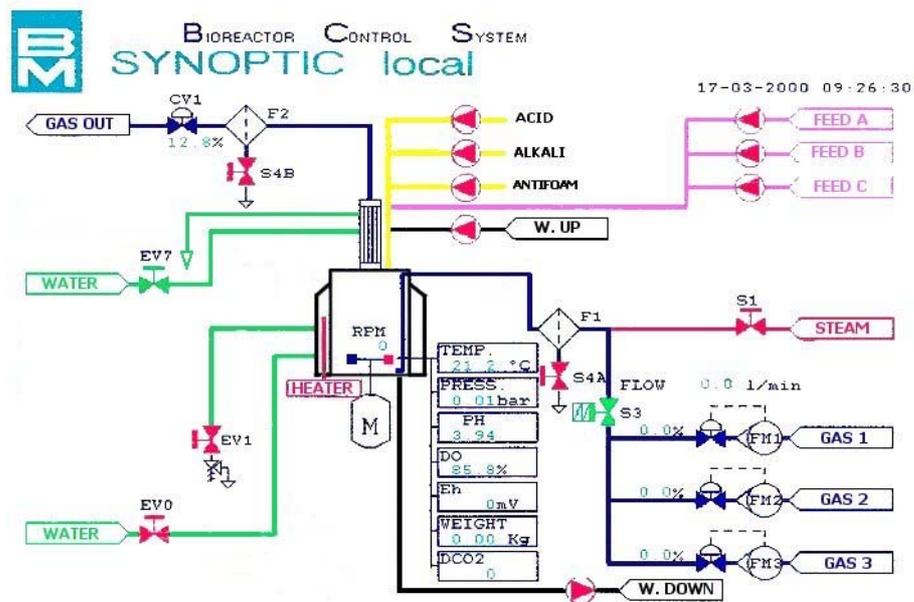


Fig.29 Schema "sinottico" dell'impianto pilota PPS3.

Le variabili di processo da noi controllate sono la temperatura, il pH, l'ossigeno disciolto e l'agitazione.

La temperatura viene rilevata da una sonda Pt-100 immersa nel brodo di coltura; i meccanismi attuatori sono le resistenze elettriche immerse nell'intercapedine e le elettrovalvole che vi regolano l'accesso dell'acqua di raffreddamento.

Il pH ha come sensore un elettrodo di tipo combinato pre-pressurizzato a gel monotubolare Mettler Toledo InPro3030/325: l'elettrodo viene tarato prima della sterilizzazione utilizzando soluzioni tampone a pH 4 e pH 7.

La sonda per l'ossigeno disciolto è un elettrodo di tipo polarografico Ingold, contenente al suo interno un sensore di temperatura il cui segnale è utilizzato per la correzione del valore della pO<sub>2</sub>.

L'elettrodo viene tarato durante la sterilizzazione, attribuendo al segnale il valore 0, e a sterilizzazione terminata, applicando le condizioni di marcia, lasciando saturare di ossigeno il terreno in queste condizioni e attribuendo al segnale il valore 100.

La pO<sub>2</sub> sarà sempre espressa come una percentuale rispetto alla saturazione. La pressione interna al fermentatore, letta su un manometro, viene regolata manualmente.

### **7.1.2. FERMENTAZIONI BATCH**

In modalità batch si sono studiate le caratteristiche cinetiche e metaboliche di crescita di MB239 su singoli zuccheri e miscele.

Gli studi sulle fonti carboniose, sono stati effettuati con glucosio, fruttosio, lattosio, raffiniosio e FOS a concentrazioni monomeriche di 40mM.

Facendo riferimento alle unità monomeriche contenute nei vari zuccheri, si sono calcolate le quantità, in modo da avere una concentrazione finale di 120 mM di unità monomeriche divise equamente tra gli zuccheri componenti la miscela.

Tutti gli studi fatti in batch sono stati condotti secondo le seguenti condizioni operative:

- ➔ Il fermentatore, contenente 2L di SM con la fonte di carbonio oggetto di studio, è stato inoculato al 10% v/v con una coltura in fase esponenziale cresciuta overnight in anaerobiosi, avente la stessa composizione in terreno;
- ➔ Temperatura di esercizio 37°C;
- ➔ Agitazione a 300 rpm;
- ➔ DOT libera, ma mantenendo l'anaerobiosi del sistema con insufflazioni periodiche di azoto;
- ➔ pH controllato a 6.5 attraverso l'aggiunta di NaOH 4M, in modo da poter valutare il metabolismo e lo sviluppo anche attraverso la quantità di correttore di pH utilizzato dal sistema per mantenere il pH costante.

Periodicamente, ogni 2-3 h, sono stati effettuati dei prelievi per condurre le analisi riguardanti la concentrazione di biomassa, le determinazioni enzimatiche e l'analisi degli zuccheri.

Il calcolo della velocità di crescita specifica di MB239 in funzione della tipologia di fonte di carbonio è stato fatto in fase esponenziale.

Dal bilancio di materia per la batch,  $dX/dt = \mu X$ , si ricava che  $\ln X = \ln X_0 + \mu t$ , ma all'inizio della fase esponenziale, quando  $S \gg K_s$ , l'equazione di Monod diventa  $\mu = \mu_{max}$ , per cui la  $\mu_{max}$  si può calcolare come  $\mu_{max} = \ln(X/X_0)/t$ .

La velocità massima di consumo di substrato  $dS/dt$  è la pendenza della retta tangente alla curva del substrato in un grafico S vs. t.

### 7.1.3. CHEMOSTATO

Il chemostato è stato avviato da una fermentazione batch in tarda fase esponenziale.

La cella di carico, che pesa la massa del vessel e della coltura, è stata tarata nelle condizioni di volume di lavoro desiderato.

La massa della coltura è stata controllata e mantenuta costante con due pompe peristaltiche: una che alimenta terreno fresco a velocità di diluizione  $D$  costante ( $D = 0.075 \text{ h}^{-1}$ ), l'altra che rimuove brodo esausto in risposta alle variazioni di peso.

La fermentazione batch precedente all'avvio del chemostato, è stata condotta in condizioni operative analoghe alle fermentazioni batch con miscele di zuccheri in terreno SM con 40mM di monomero dello zucchero di interesse.

La concentrazione degli zuccheri, degli enzimi e della biomassa, è stata misurata su campioni prelevati nel corso della fermentazione.

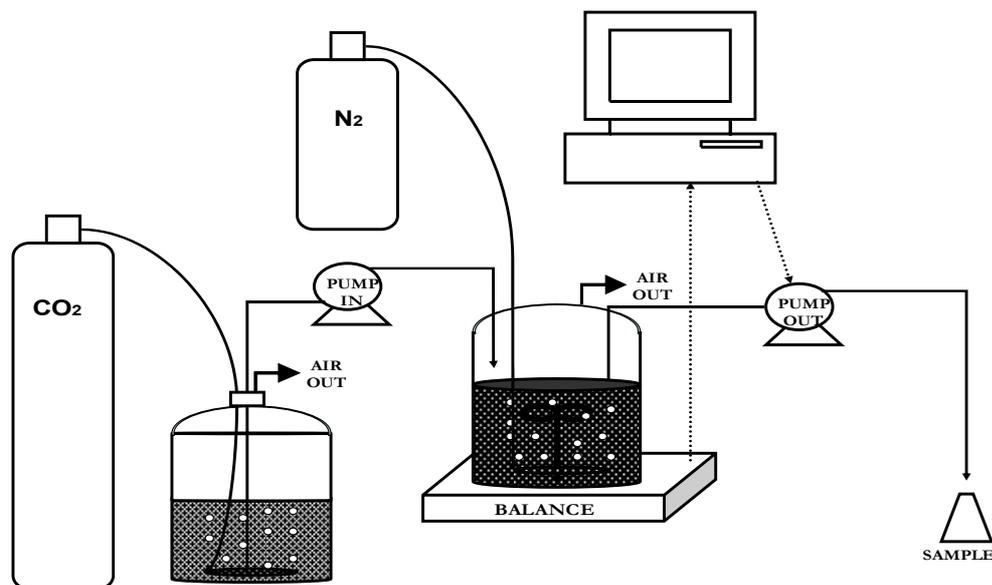


Fig.30 Schema sperimentale del sistema utilizzato per le fermentazioni in chemostato.

Il chemostato è stato effettuato mantenendo invariati i valori di temperatura, agitazione e DOT, utilizzati per il batch, senza il controllo di pH. Lo studio della  $\mu_{max}$  è stato effettuato con il metodo del wash-out, che consiste nel portare il sistema in una condizione in cui  $D > \mu_{max}$ ; in queste condizioni  $\ln X = \ln X_0 + (\mu_{max} - D)t$ .

Dall'equazione di Monod,  $\mu = \mu_{max} \cdot S / (K_s + S)$ , noti  $\mu = D$ ,  $S$  si ricava dall'analisi dei carboidrati e  $\mu_{max}$ , si ottiene il coefficiente di affinità del microrganismo per il substrato.

Dal bilancio di materia, lavorando in condizioni in cui non è presente la biomassa nel terreno in entrata e assumendo che il mantenimento sia trascurabile, si ottiene che  $X = Y_{X/S} \cdot (S_0 - S)$ ; noto  $\mu = D$  e  $S$ , in termini molari, si ottiene la resa di biomassa definita come grammi di biomassa generata su moli di substrato utilizzato.

Analogamente alla resa in biomassa, tramite l'equazione  $(P - P_0) = Y_{P/S}(S_0 - S)$  si può calcolare la resa in prodotto  $Y_{P/S}$  degli acidi organici prodotti durante la fermentazione in termini di moli di prodotto generato per moli di substrato utilizzato.

## 7.2. METODI PER LA QUANTIFICAZIONE DELLA BIOMASSA

### 7.2.1. OD<sub>600</sub>

Questo è il metodo più veloce per la determinazione della quantità relativa di biomassa e si basa sulla torbidità della coltura dovuta alla presenza di cellule in sospensione.

La torbidità delle colture microbiche si rileva a  $\lambda = 600$  nm misurando lo scattering della luce, dovuto alla presenza di cellule in sospensione.

Lo svantaggio di questo metodo è quello di non essere una misura assoluta della concentrazione di biomassa.

### **7.2.2. PESO SECCO**

Questo metodo, nonostante abbia una procedura molto più laboriosa e lunga, serve per la determinazione della concentrazione assoluta di biomassa nella coltura.

I filtri di acetato di cellulosa (0.2  $\mu\text{m}$ ) vengono messi a seccare overnight in stufa a 105°C.

Questi, dopo essere stati pesati, si utilizzano per filtrare un volume noto di coltura.

Le cellule depositatesi sul filtro vengono lavate più volte con acqua distillata, essiccate overnight a 105°C e pesate.

Il peso secco netto della biomassa si ottiene sottraendo quello del filtro vuoto.

### **7.3. DETERMINAZIONE DEGLI ACIDI ORGANICI**

La tecnica cromatografica HPLC è utilizzata per dosare gli acidi organici prodotti nelle colture di *B. adolescentis* MB 239.

A tal fine è stata utilizzata una colonna Aminex HPX-87H ad esclusione di ioni a temperatura ambiente.

L'analisi avviene per eluizione isocratica con velocità di flusso 0.6 ml/min, utilizzando come eluente acido solforico 0.01 M, preparato con acqua deionizzata e filtrata con filtri da 0.45  $\mu\text{m}$ .

L'iniezione dei campioni è stata effettuata mediante un sampling loop che permette un volume di iniezione di 20  $\mu\text{l}$  ed un'alta riproducibilità dei volumi

iniettati, i campioni sono analizzati tal quali od eventualmente diluiti e per ognuno di essi sono state eseguite iniezioni in triplo.

L'identificazione è attraverso un rivelatore ad indice di rifrazione.

## **7.4. DETERMINAZIONE DELLE ATTIVITA' GLICOSIL-IDROLASICHE**

Le attività di  $\alpha$ -galattosidasi,  $\beta$ -galattosidasi,  $\beta$ -fruttofuranosidasi si determinano sui seguenti campioni:

- Surnatante della coltura, al fine di quantificare la quantità di enzima secreto;
- Cellule intere, per quantificare l'attività enzimatica localizzata sulla superficie cellulare;
- Cellule lisate con Triton, per quantificare, contro le cellule intere, la quantità di enzima localizzato all'interno della cellula.

### **7.4.1. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI**

Si prelevano sterilmente dal fermentatore 50 ml di coltura e se ne misura l' $OD_{600}$ .

Si centrifugano 45 ml di coltura a 4°C per 15 min a 4500 rpm.

Il surnatante è filtrato con filtro Millex®-MP da 0.22  $\mu$ m (Millipore) per essere sicuri che il campione non contenga assolutamente cellule che potrebbero interferire con le analisi.

Il pellet è lavato con Buffer Z (0.1 M tampone fosfato pH 7, 10 mM KCl, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 50mM mercaptoetanol) e risospeso in 4.5 ml di Buffer Z, concentrando 10 volte la sospensione iniziale.

Per la preparazione del campione contenente cellule intere si sono diluiti 2 ml della sospensione 10x in 2 ml di Buffer Z, ottenendo il campione ad una concentrazione 5 volte quella iniziale.

Per la preparazione del campione contenente le cellule lisate si sono diluiti 2 ml di sospensione 10x in 2 ml di (Buffer Z + Triton al 5%), incubati a 37°C per 10 min, ottenendo il campione ad una concentrazione 5 volte quella iniziale.

Nel periodo di tempo che intercorre dal prelievo alle reazioni enzimatiche, i campioni vengono mantenuti a 4°C.

#### **7.4.2. DETERMINAZIONI DI $\alpha$ E $\beta$ -GALATTOSIDASI**

Le attività di  $\alpha$ -galattosidasi e  $\beta$ -galattosidasi sono valutate mediante dosaggio spettrofotometrico del nitrofenolo, liberato dall'idrolisi rispettivamente di un  $\alpha$  e di un  $\beta$ -galattoside di sintesi chimica. Il p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galattopiranoside (PNPG) è il galattoside idrolizzato specificamente dall' $\alpha$ -galattosidasi, e l'o-nitrofenil- $\beta$ -D-galattopiranoside (ONPG) (fig 31) dalla  $\beta$ -galattosidasi.

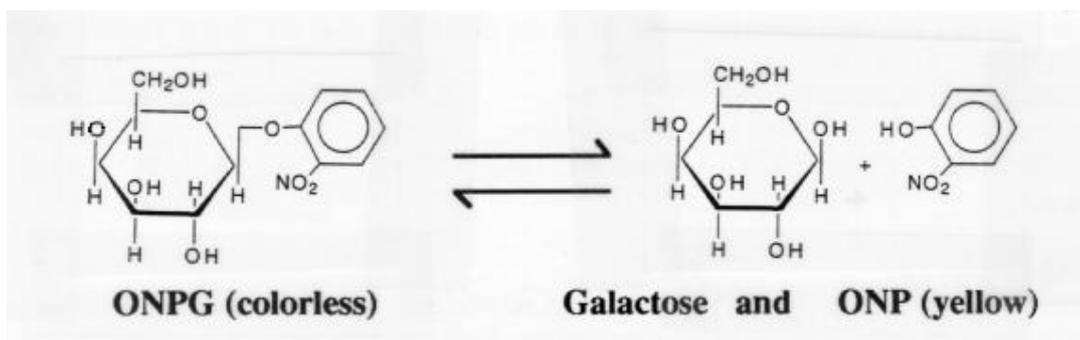


Fig.31 Struttura dell'ONPG e prodotti del taglio enzimatico ad opera della  $\beta$ -galattosidasi.

In provette eppendorf da 2 ml, 1 ml di campione è addizionato da 200  $\mu$ l di soluzione di PNPG (4 mg/ml H<sub>2</sub>O) od ONPG (4 mg/ml H<sub>2</sub>O).

Dopo aver incubato a 37°C in un bagno termostato per 3'00", si blocca la reazione aggiungendo 0.5 ml di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M.

Si centrifugano a 13000g per 5 min e poi si leggono le assorbanze a 420 nm.

Dalla legge di Lambert-Beer  $A = \epsilon l c$ , dove  $\epsilon$  per il nitrofenolo è 0.52 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> e  $l = 1$  cm, si è ricavato  $c$ , ovvero la concentrazione di nitrofenolo liberato durante il tempo di reazione.

Da questa concentrazione si sono calcolate le unità enzimatiche definite come "quantità di enzima che idrolizza 1 mmol di PNPG o ONPG in 1'00".

Le attività specifiche sono state calcolate rapportando le attività enzimatiche per il contenuto proteico calcolato moltiplicando per 0.5 il peso secco (Rossi *et al* 2005).

### 7.4.3. DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' DELLA $\beta$ -FRUTTOFURANOSIDASI

Il test per la determinazione della  $\beta$ -fruttofuranosidasi si basa sull'idrolisi del legame  $\beta$ -(1,2), tra il glucosio e il fruttosio, presente nel saccarosio.

L'entità dell'efficienza di taglio avviene attraverso la determinazione della quantità di estremità degli zuccheri riducenti, ridotte tramite l'acido 3,5-dinitrosalicilico.

0.3 ml di campione da analizzare sono addizionati con 0.3 ml di Buffer Z e 0.4 ml di soluzione contenente saccarosio al 20%. Si incubano i tubi a 40°C in un bagnetto termostato.

Dopo 25'00" si aggiunge 1 ml di soluzione Rochelle (10g/L acido 3,5-dinitrosalicilico, 300g/L Na,K tartrato-4H<sub>2</sub>O, 0.4M NaOH) e si fanno bollire i campioni, con il duplice scopo di disattivare l'enzima e favorire la reazione tra l'acido dinitrosalicilico e le estremità riducenti dei monosaccaridi generati dal taglio dell'enzima.

Si aggiungono 10 ml di acqua distillata e si leggono i campioni a 540 nm. L'attività specifica è stata espressa in unità enzimatiche definite come quantità di enzima necessaria per rilasciare dal saccarosio una  $\mu$ mole di zucchero riducente in 1'00".

I valori delle unità enzimatiche sono stati ottenuti per interpolazione con una retta di calibrazione con glucosio e fruttosio in rapporto 1 : 1 e a concentrazioni crescenti da 0 a 100 mM totali, dalla quale si è estrapolato che  $A = (c \cdot 0.0286M^{-1}) - 0.0019$  con coefficiente di correlazione  $R^2 = 0.99$ .

## **7.5. MESSA A PUNTO DEL METODO DI ANALISI DEI CARBOIDRATI**

Le analisi sui carboidrati presenti nel terreno di coltura sono state effettuate utilizzando la tecnica analitica HPTLC (Cromatografia su strato sottile ad alte prestazioni).

La tecnica analitica AMD (Automated Multiple Development), utilizzata in questo lavoro, è stata sviluppata per riuscire ad avere un controllo dei fattori

ambientali ed un guadagno dell' efficienza della separazione rispetto alla TLC capillare.

1. La messa a punto del metodo di analisi di una miscela complessa di carboidrati come i FOS è passata attraverso il noto sistema di studio ed ottimizzazione della separazione, citato in precedenza, detto PRISMA (Sz. Nyiredy, *Application of the "PRISMA" model for the selection of eluent-system in OverPressure Layer Chromatography (OPLC)*).

Il sistema è un insieme successivo di prove, che si articola in tre parti.

- ➔ nella prima parte abbiamo cercato la corretta fase stazionaria ed individuato i solventi per l'ottimizzazione del processo.  
Abbiamo eseguito una serie di prove isocratiche utilizzando la fase stazionaria prescelta ed i solventi in cui le sostanze da separare sono solubili.
- ➔ nella seconda abbiamo focalizzato l'attenzione sull'ottimizzazione della composizione della fase mobile usando i solventi che danno una migliore separazione nella prima fase, tale selezione è in funzione del fattore di ritenzione prodotto da ogni prova isocratica (le sostanze devono separarsi con  $R_f$  compreso tra 0,2 e 0,8).

I solventi selezionati sono stati opportunamente miscelati (miscele binarie, ternarie...) in base alla migliore separazione dal punto di vista della selettività che si riesce ad ottenere (per selettività si intende la capacità del sistema fase mobile/fase fissa di separare due o più sostanze).

Ed inoltre abbiamo sperimentalmente misurato le costanti di velocità

$$K = \frac{Z^2}{t}$$

Z = distanza, espressa in centimetri, raggiunta dall'eluente rispetto al punto di deposizione.

T = tempo, espresso in minuti, impiegato dal fronte dell'eluente a percorrere il tratto Z dello strato sottile.

date dal tempo che l'eluente impiega a percorrere distanze definite di strato sottile.

I dati isocratici ottenuti con le varie miscele binarie posti in grafico sono espressi come  $R_m$  in funzione della composizione del solvente.

L'espressione matematica che definisce  $R_m$  è la seguente:

$$R_m = \log k' = \log \frac{1 - R_f}{R_f}$$

ed indica che  $R_m$  è direttamente legato al fattore di capacità  $k'$  (ricordiamo che  $k'$  è per definizione il rapporto tra i tempi che rispettivamente la sostanza trascorre nelle due fasi).

Un esame della relazione esistente tra  $R_m$  e la composizione del solvente ci ha fornito utili informazioni sui seguenti punti:

- ➔ sui limiti estremi di polarità del gradiente; come solvente iniziale (per i primi stadi AMD) abbiamo scelto la miscela solvente con una forza sufficiente per far migrare le sostanze più trattenuate, mentre come solvente finale abbiamo considerato quello che permette una

separazione accettabile dei componenti meno trattenuti senza farli migrare troppo vicino al fronte del solvente

- ➔ sui solventi aventi la migliore selettività, ossia quelli che causano la spaziatura ottimale delle bande
- ➔ sulla migrazione totale dei componenti al termine dello sviluppo multiplo: dalle relazioni di  $R_m$  in funzione della composizione del solvente è possibile prevedere la migrazione parziale dei soluti per ciascuno step isocratico per ogni stadio del processo AMD.

In figura 32 si riportano i risultati ottenuti per la separazione di una miscela di actilight con un solvente dato da acqua ed acetone/acetonitrile (1/1).

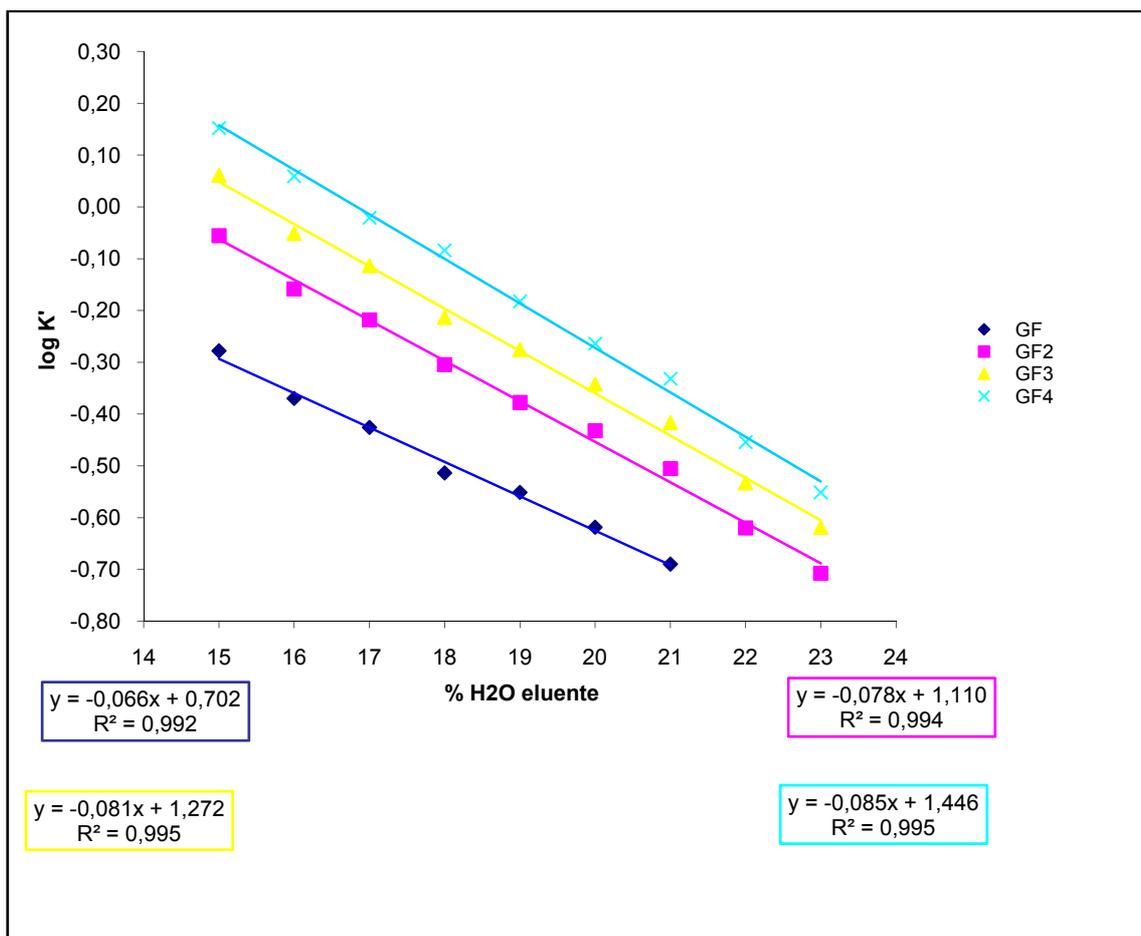


Fig.32 Ritenzione in funzione della frazione di acqua (V/V) in miscele con acetone ed acetonitrile 1/1 su diolo HPTLC Merck.

Distanza (cm <sup>2</sup> )	Tempo medio (sec)
1	70
4	205
9	405
16	670
25	960
36	1350
49	1845

I tempi osservati per percorrere la lastra in corrispondenza di ogni composizione di eluente li abbiamo riportati in un grafico in funzione del corrispondente quadrato della distanza, in modo da ottenere la relazione lineare  $Z^2 = K t$  (figura 33).

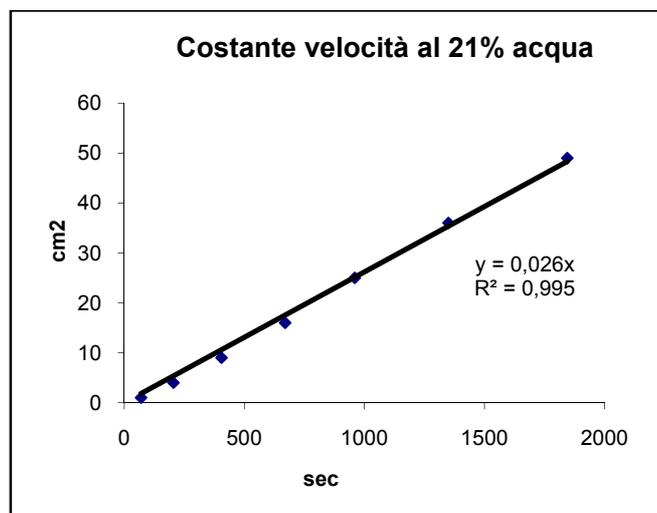


Fig.33 Relazione lineare tra tempo di eluizione ed il quadrato della distanza

percorsa dall'eluente al 21% H<sub>2</sub>O

Le costanti di velocità ottenute in questo modo le abbiamo raccolte in un unico grafico, riportandole in funzione della percentuale di eluente a cui sono state ricavate (figura 34)

La relazione lineare che si ottiene ci serve per ricavare i tempi di eluizione per qualsiasi valore percentuale di eluente, compreso nell'intervallo in cui ci interessa impostare l'AMD e quindi anche per valori non interi.

<b>% eluente</b>	<b>K</b>
<b>25</b>	<b>0,0232</b>
<b>24</b>	<b>0,0240</b>
<b>23</b>	<b>0,0243</b>
<b>22</b>	<b>0,0254</b>
<b>21</b>	<b>0,0262</b>
<b>20</b>	<b>0,0267</b>
<b>19</b>	<b>0,0271</b>
<b>18</b>	<b>0,0273</b>
<b>17</b>	<b>0,0280</b>
<b>16</b>	<b>0,0287</b>
<b>15</b>	<b>0,0294</b>

## Costanti di velocità

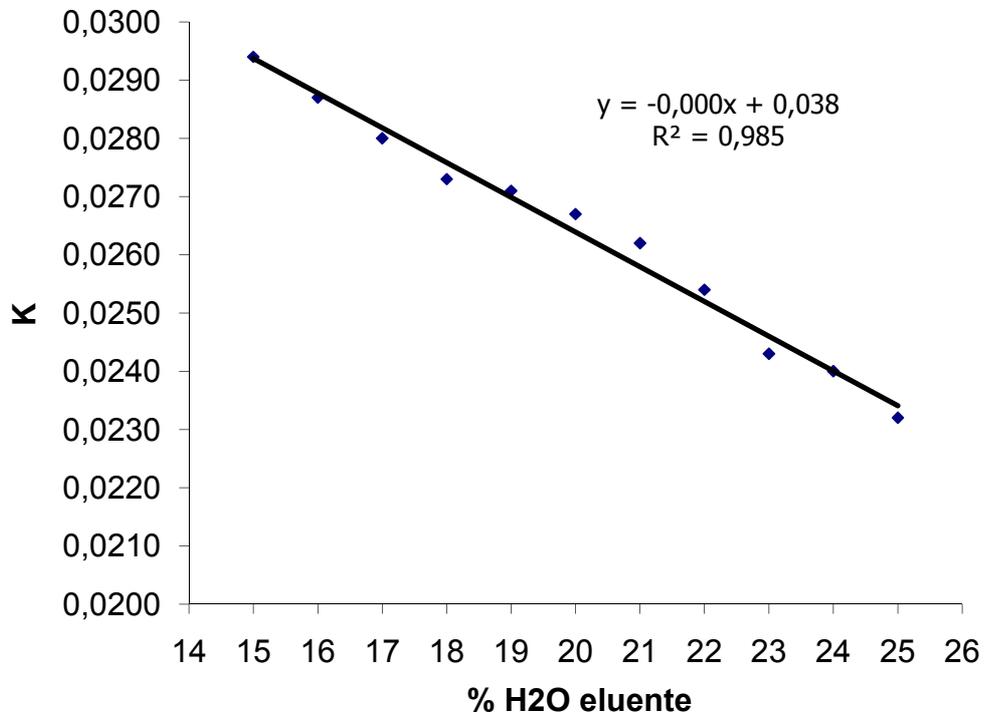
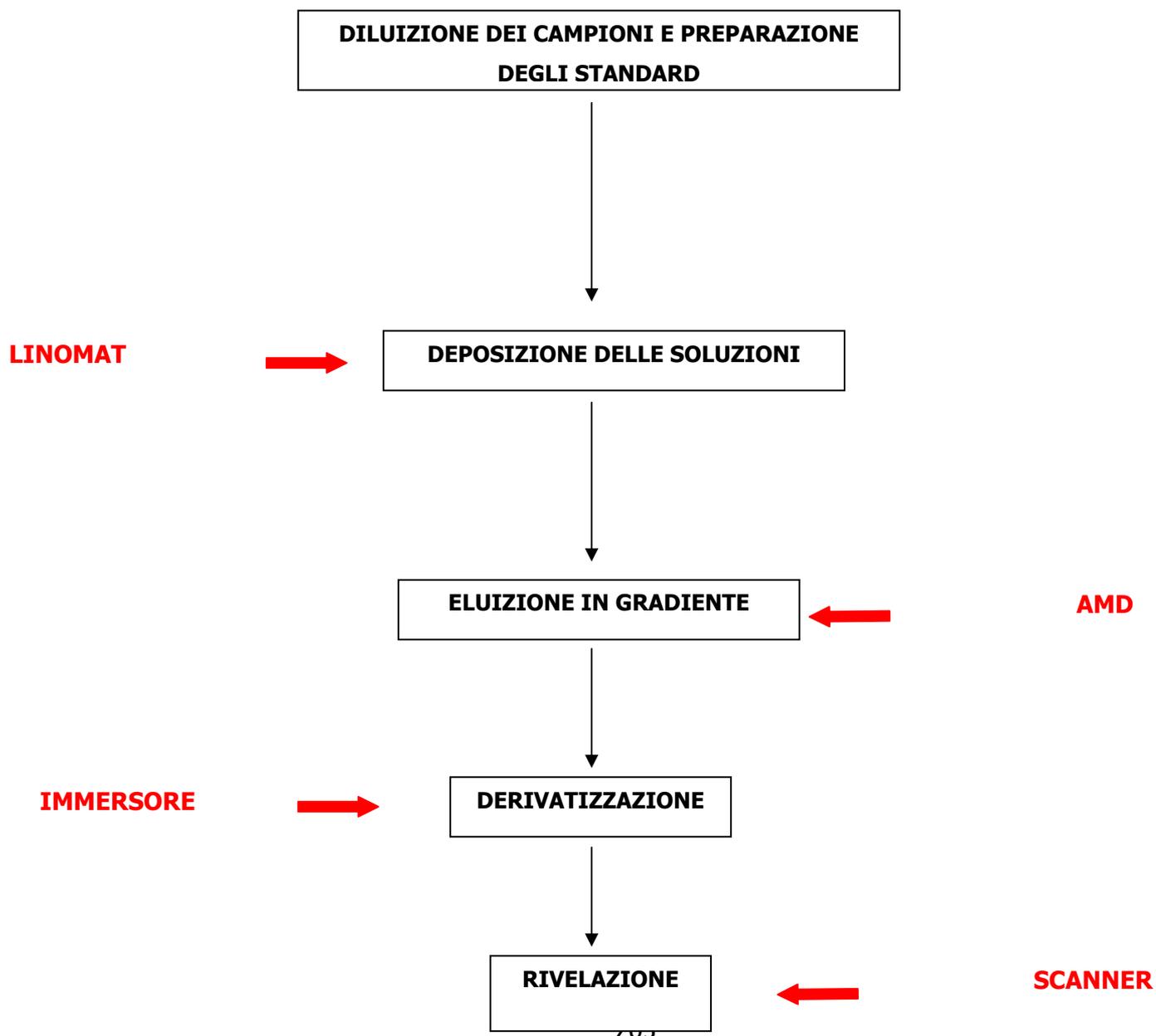


Fig.34 Costanti di velocità ottenute sperimentalmente su lastre diolo con eluente H<sub>2</sub>O (14-25%) ed acetone/acetonitrile 1/1.

- ➔ Per finire nell'ultimo step c'è il trasferimento dell'ottimizzazione fase mobile-fase fissa alla parte strumentale in cui si utilizzano le costanti di velocità K (cm<sup>2</sup>/sec) dell'eluente, alle differenti percentuali dei costituenti, per impostare i tempi di eluizione nella separazione in gradiente.

La messa a punto del metodo è stata sviluppata utilizzando le sostanze standard di oligosaccaridi ed una volta verificata la bontà della separazione si è passati all'analisi dei campioni reali.

Per descrivere le differenti fasi riportiamo, nella figura 35, una schematizzazione del lavoro necessario per l'analisi dei brodi di fermentazione.



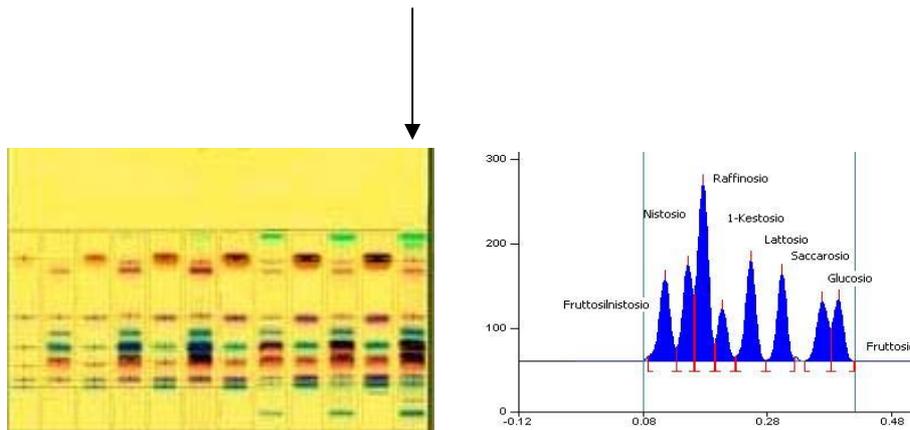


Fig.35 Schema delle diverse fasi di lavoro per l'analisi dei brodi di fermentazione

## 7.6. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI E DEGLI STANDARD

Uno dei punti di forza di questa tecnica cromatografica è il trattamento del campione.

Infatti per l'analisi non è necessario nessun tipo di trattamento se non la semplice diluizione con un solvente opportuno che sciolga completamente gli analiti, che sia volatile e con bassa viscosità per poter bagnare lo strato adsorbente.

La possibilità di non avere step di "clean-up" del campione è una proprietà particolarmente utile quando si operano screening su campioni complessi di varia origine, i cui componenti si trovano in un ampio intervallo di complessità molecolare o di polarità.

Quindi l'attenzione dell'operatore deve essere solo quella di preparare soluzioni standard a concentrazione nota e precisa e soluzioni dei campioni a diluizione nota e precisa.

Gli standard utilizzati sono:

Saccarosio e Glucosio (Carlo Erba RPE)  
Fruttosio (Sigma)  
Galattosio, Lattosio e Raffinosio (Biochemical)  
Fruttoligosaccaridi (Actilight: f-nistosoio  $11.3\% \pm 1.9\%$ , nistosoio  $42.5\% \pm 0.3\%$ ,  
1-kestosoio  $33.1\% \pm 0.6\%$ , saccarosio  $2.4\% \pm 0.1\%$ )

Le soluzioni madre degli standard, preparate a 1000 ppm (2000 ppm per l'actilight) con una miscela acqua milliQ/acetone (Merck Lichrosolv) 3/1 sono state conservate a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Le soluzioni di standard depositate sulla lastra sono state preparate fresche prima di ogni deposizione ad una concentrazione di 10 ppm, ottenute per diluizione delle corrispondenti soluzioni madre.

## **7.7. DEPOSIZIONE DELLE SOLUZIONI DI CAMPIONE E DI STANDARD**

Nei nostri laboratori si è utilizzato un depositore Camag Linomat V (figura 36), in cui un software gestisce la modalità di deposizione in termini di spazio sulla lastra, volume depositato e forma della traccia.



Fig.36 Depositore Camag Linomat 5

La fase stazionaria adottata per questo tipo di analiti è il diolo F254s 20×10 cm (Merck) che da riferimenti bibliografici<sup>4</sup>, assieme alle lastre ammino, sembrano essere le più indicate per l'analisi su miscele complesse di carboidrati.

La lastra diolo da noi utilizzata è stata pre-condizionata prima di ogni step con vapori di ammoniaca con una soluzione 1 M, per due volte consecutive (15 secondi ogni volta).

L'influenza dell'ammoniaca sul meccanismo di separazione è probabilmente complesso ed il meccanismo di reazione non è ancora noto.

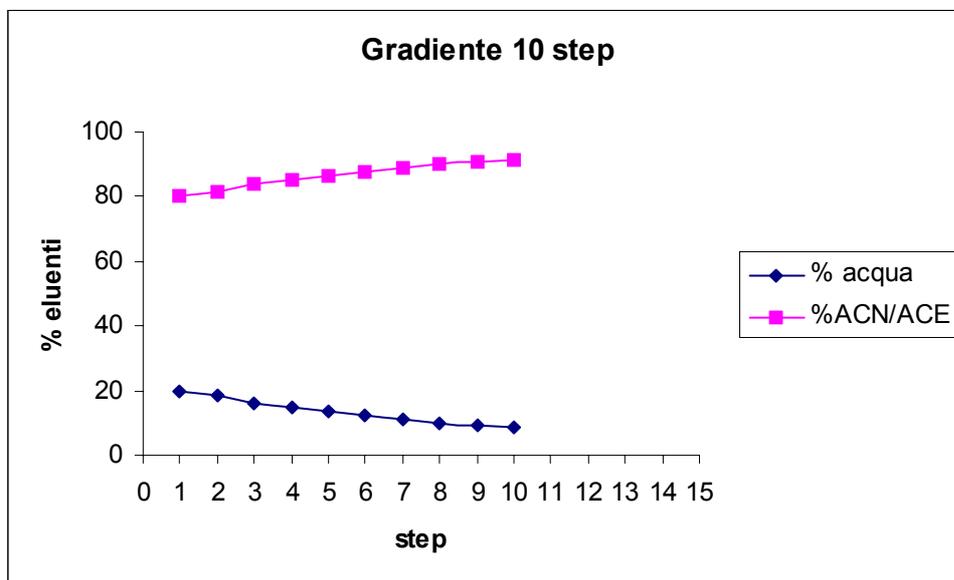
## 7.8. ELUIZIONE IN GRADIENTE DEI CAMPIONI DI FERMENTAZIONE

### 7.8.1. FERMENTAZIONE SU MISCELA MONOSACCARIDICA: GLUCOSIO, FRUTTOSIO, GALATTOSIO

Questa fermentazione vuole porre in evidenza il comportamento del microrganismo di fronte a fonti nutrizionali simili per struttura.

Nella separazione dei tre zuccheri, glucosio, galattosio e fruttosio, è stato necessario utilizzare un gradiente con una forza eluente composta dalla seguente miscela (fig. 37):

➤ (Acetonitrile / Acetone (Merck Lichrosolv) (1:1)) / Acqua (milliQ)



Step	Soluzione 1 <sup>a</sup>	Soluzione 2 <sup>b</sup>	Soluzione 3 <sup>c</sup>	Tempi (min)
1	100			0,7
2	81,38	18,62		1,1
3	52,59	47,41		2,4
4	33,98	66,02		4,1
5	21,96	78,04		5,8
6	14,19	67,19	18,62	8,1
7	9,17	43,42	47,41	10,0
8	5,92	28,06	66,02	12,2
9	3,83	18,13	78,04	14,6
10	2,47	11,71	85,81	16,5

<sup>a</sup> Acetonitrile/acetone (1/1 v/v)/acqua=80/20

<sup>b</sup> Acetonitrile/acetone (1/1 v/v)/acqua=88/12

<sup>c</sup> Acetonitrile/acetone (1/1 v/v)/acqua=93/7

I tempi di asciugatura per ogni step sono stati impostati a venti minuti, in modo da assicurare che la lastrina fosse perfettamente asciutta per le operazioni successive.

Fig. 37 Variazione della percentuale dei solventi che compongono la miscela eluente in funzione del numero di step della eluizione

## 7.8.2. FERMENTAZIONE SU MISCELA DI DI- ED OLIGOSACCARIDI: LATTOSIO, RAFFINOSIO, ACTILIGHT

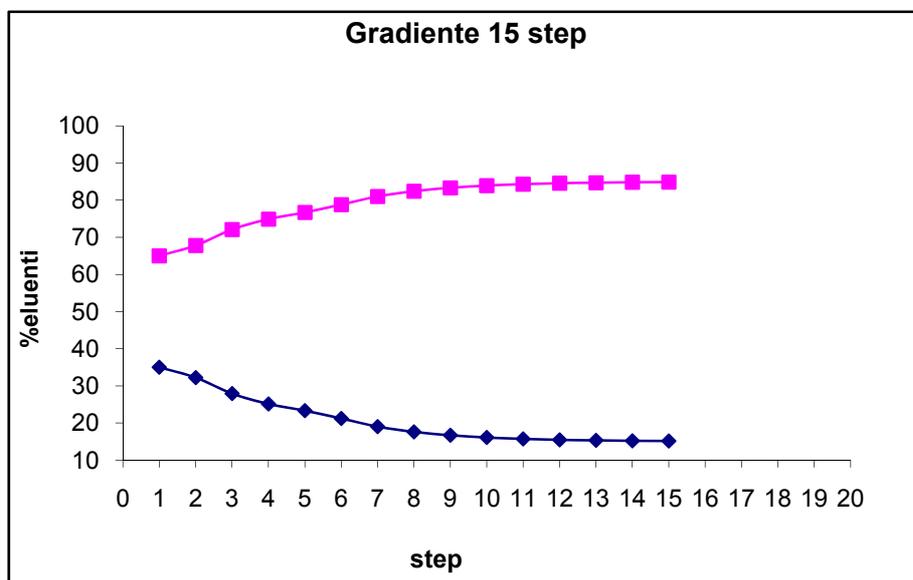
Questa fermentazione utilizza una eluizione un poco più complessa di quella trattata in precedenza, in modo da riuscire a studiare il comportamento del microrganismo in condizioni sempre più simili all'ambiente in cui vive.

Infatti la miscela da separare è più complessa ed è composta da lattosio, raffinosisio e FOS e quindi si richiede una forza eluente maggiore.

Per la separazione è stato necessario utilizzare un gradiente con eluente composto dalla seguente miscela:

➤ Acetonitrile (Merck Lichrosolv) / Acqua (milliQ)

Nella figura 38, riportiamo una rappresentazione grafica di tale gradiente



Step	Soluzione 1 <sup>a</sup>	Soluzione 2 <sup>b</sup>	Soluzione 3 <sup>c</sup>	Soluzione 4 <sup>d</sup>	Tempi (min)
1	100				0,3
2	81,38	18,62			0,6
3	52,59	47,41			1,0
4	33,98	66,02			1,4
5	21,96	78,04			1,9
6	14,19	67,19	18,62		2,5
7	9,17	43,42	47,41		3,2
8	5,92	28,06	66,02		4,0
9	3,83	18,13	78,04		4,9
10	2,47	11,71	85,81		6,0
11	1,6	7,57	72,21	18,62	7,1
12	1,03	4,89	46,66	47,41	8,5
13	0,67	3,16	30,15	66,02	10,2
14	0,43	2,04	19,48	78,04	12,0
15	0,28	1,32	12,59	85,81	14,3

<sup>a</sup> Acetonitrile/acqua=65/35

<sup>b</sup> Acetonitrile/acqua=80/20

<sup>c</sup> Acetonitrile/acqua=85/15

<sup>d</sup> Acetonitrile/acqua=85/15

I tempi di asciugatura per ogni step sono stati impostati a venti minuti, in modo da assicurare che la lastrina fosse perfettamente asciutta per le operazioni successive.

Fig. 38 Variazione delle percentuali dei solventi che compongono la miscela

eluente in funzione del numero di step della eluizione.

### **7.8.3. FERMENTAZIONE SU MISCELA DI MONO, DI- ED OLIGOSACCARIDI: GLUCOSIO, FRUTTOSIO, GALATTOSIO, LATTOSIO, RAFFINOSIO, ACTILIGHT**

Questa fermentazione è il sistema più complesso trattato.

Il gradiente per la separazione cromatografica è identico a quello riportato per la seconda fermentazione in quanto le sostanze da analizzare sono le stesse.

Infatti nella seconda fermentazione non sono stati aggiunti i monosaccaridi ma è stato necessario depositarli comunque nella miscela standard, in quanto si è reso necessario monitorare la loro presenza come prodotti di demolizione di zuccheri più complessi e quindi per monitorare un eventuale loro consumo.

In questa fermentazione invece sin dal terreno avevamo il sistema più complesso, compresi i monosaccaridi.

Per il secondo ed il terzo tipo di fermentazione, dopo eluizione, è necessario trattare la lastra con fumi di HCl al 37% per mezz'ora e prima della derivatizzazione si asciuga la lastra per venti minuti in stufa.

In questo modo riusciamo a vedere il raffiniosio, il quale in origine dimostra scarsa sensibilità alla rivelazione per derivatizzazione con acido 4 ammino-benzoico (vedi fase di derivatizzazione).

In ambiente acido si ha l'idrolisi di questo zucchero e quindi si rende possibile la reazione con il derivatizzante e quindi la rivelazione in fluorescenza.

La figura 39 riporta l'AMD utilizzata nei nostri laboratori.



Fig.39 AMD Camag

## 7.9. DERIVATIZZAZIONE

Anche la fase di derivatizzazione è un passaggio critico per una buona riuscita dell'analisi, infatti dopo l'eluizione multipla c'è l'esigenza di rendere visibili le sostanze separate ad una lunghezza d'onda ben definita, perciò spesso risulta necessario derivatizzarle.

La miscela utilizzata in questo caso è così composta<sup>6</sup>:

2 gr di acido 4 ammino-benzoico Carlo Erba RPE

36 ml di acido acetico 99-100% extra puro (glaciale) Riedel de Haen

40 ml di acqua di milliQ

2 ml acido ortofosforico 85% Carlo Erba RPE

120 ml acetone Merck LiChrosolv per cromatografia liquida

ed affinché la derivatizzazione sia uniforme su tutta la lastra e per un tempo definito, si utilizza un immersore sempre della Camag (Chromatogram Immersion Device III) che procede all'immersione della lastra nella soluzione ad una velocità costante (figura 40).

E' importante mantenere ben definiti sia la velocità verticale, che il tempo di immersione.

Le condizioni di derivatizzazione se sono standardizzate possono aiutare ad evitare che la lastra sia trattata in maniera disomogenea, situazione che può creare interferenze in fase di scansione.



Fig.40 Immersore Camag Chromatogram Immersion Device III

E' evidente come l'ausilio di strumenti possa permettere uno sviluppo concreto in termini di riproducibilità.

La reazione che avviene tra carboidrati ed acido 4 ammino-benzoico coinvolge il gruppo carbonilico degli zuccheri, in forma non emiacetalica ciclica, ed il gruppo amminico del reagente stesso (vedi figura 41).

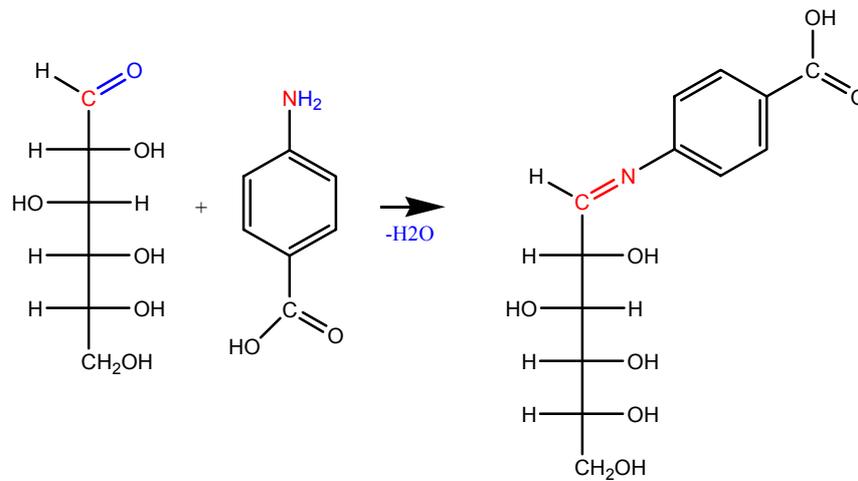


Fig.41 Reazione di formazione della base di Schiff

La lastra rimane immersa per due secondi e successivamente deve essere asciugata in stufa ad una temperatura di 115°C per 12 minuti esatti.

## 7.10. RIVELAZIONE

La scansione utilizzata per i brodi di fermentazione è stata effettuata ad una lunghezza d'onda di 366 nm (con filtro cut-off a 400 nm) utilizzando lo Scanner interfacciato ad un software (winCATS 1.2.6 Camag) in grado di elaborare i densitogrammi risultanti.

Per concludere si fa osservare che questa tecnica non risulta essere distruttiva una volta che si esegue la rivelazione, in quanto le lastre possono essere conservate, al riparo dall'umidità, a -18°C in congelatore, pronte per una nuova eventuale scansione con diversi parametri.

## **RISULTATI**

### **7.11. CRESCITA DI *B. adolescentis* MB239 SU SINGOLE FONTI DI CARBONIO: modalità batch**

Il comportamento fermentativo di *Bifidobacterium adolescentis* MB239 sulle miscele di zuccheri è stato studiato in modalità batch su terreno semisintetico SM contenente miscele di carboidrati, al fine di determinare i profili di degradazione degli zuccheri e di individuare eventuali co-metabolismi o comportamenti di- o poliauxici.

A tal fine sono state utilizzate miscele contenenti solo monosaccaridi, solo oligosaccaridi e mono-, e oligosaccaridi insieme.

Seguendo la fermentazione, con prelievi ogni 2-3h circa, sono state determinati i principali parametri cinetici ( $\mu_{max}$  e  $Y_{x/s}$ ), e la composizione del terreno in termini di zuccheri residui dalla fermentazione di *B. adolescentis* MB239.

Tutte le batch su miscele di carboidrati sono state inoculate con *seed cultured* cresciute su glucosio, al fine di iniziare ogni fermentazione con un analogo pattern di attività glicosil-idrolasiche, indipendenti dalla miscela in esame.

#### **7.11.1. FERMENTAZIONE SU MISCELA MONOSACCARIDICA: GLUCOSIO, FRUTTOSIO, GALATTOSIO**

Si sono depositati 1,3,5,6,8,9  $\mu$ l di una soluzione standard da 10 ppm e nella figura 42 riportiamo un esempio dei densitogrammi ottenuti a 366 nm di lunghezza d'onda con lampada al mercurio.

In relazione all'altezza ed all'area di ogni picco si costruiscono le relative curve di taratura che riportiamo di seguito nella figura 43 con le rispettive equazioni nella tabella 9 :

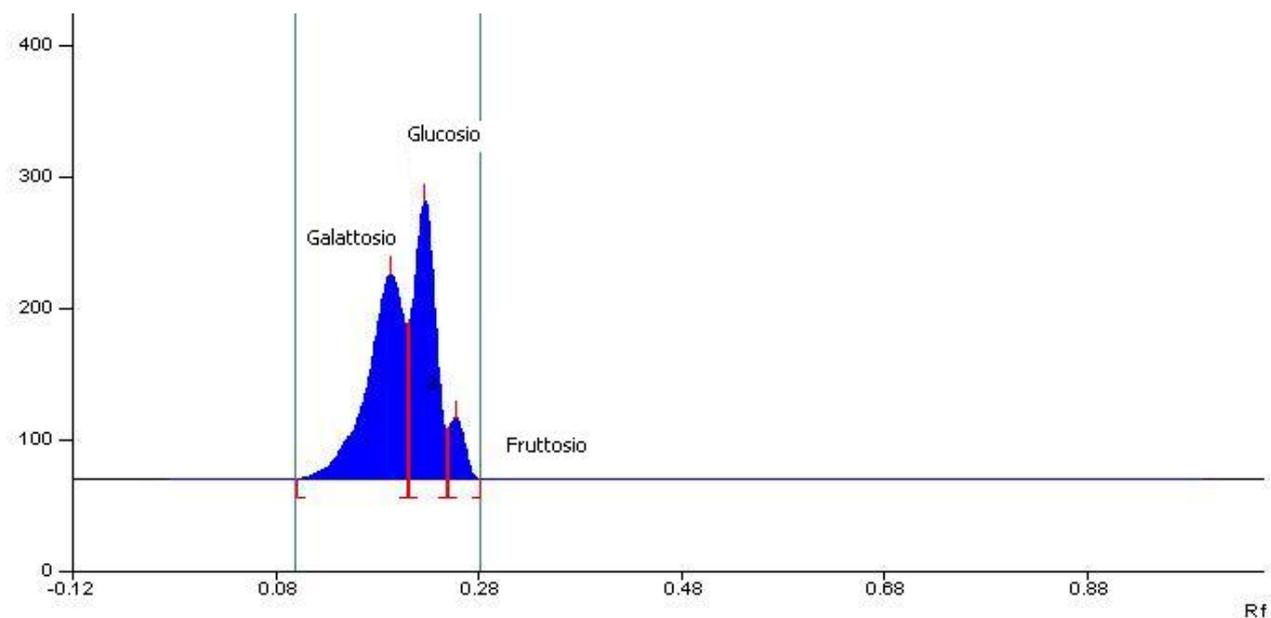
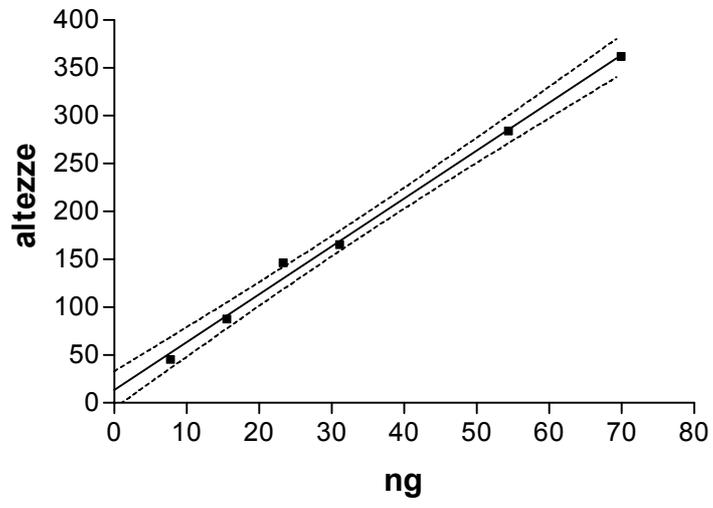
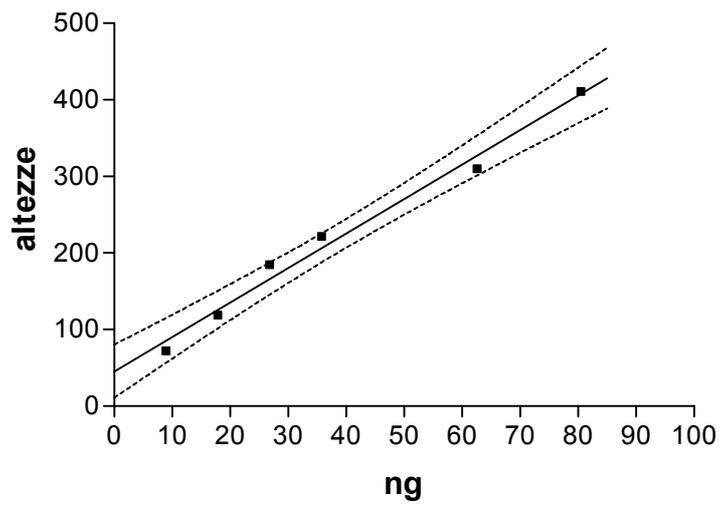


Fig.42 Densitogramma della soluzione standard (10 ppm, 6 µl)

### Galattosio



### Glucosio



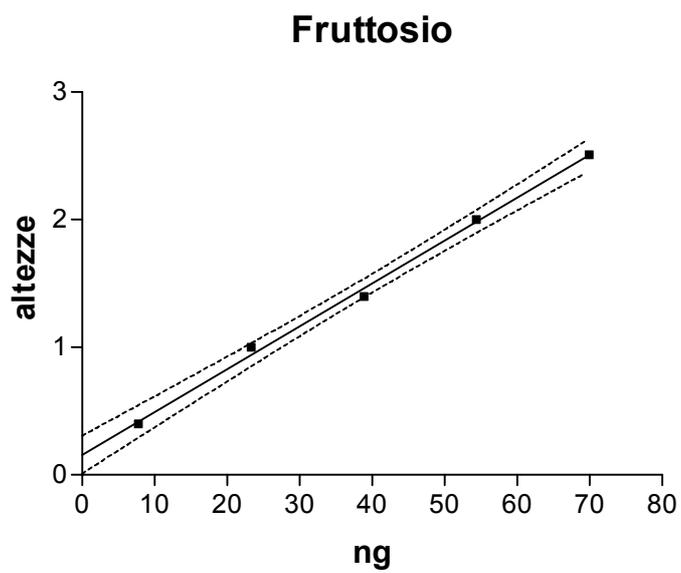


Fig.43 Curva di taratura dei tre monosaccaridi utilizzati nel primo tipo di Fermentazione

Curva di taratura	Galattosio	Glucosio	Fruttosio
Equazione della retta	$y = 5.00 x + 13,49$	$y = 4,50 x + 45,38$	$y = 0,033 x + 0,16$
Coefficiente di correlazione $r^2$	0,9952	0,9857	0,9971
$s_{y/x}$	9,26	16,66	0,05
Deviazione standard intercetta $s_a$	6,95	12,51	0,05
Deviazione standard pendenza $s_b$	0,17	0,27	0,001

Tabella 9 Dati relativi alle curve di taratura degli standard nel primo tipo di fermentazione

Ogni singolo campione è stato depositato con opportuna diluizione perché il valore di concentrazione potesse corrispondere a metà delle curve di taratura, dove l'intervallo di fiducia ha il valore più piccolo.

Nelle figure 44 e 45 si riportano i densitogrammi di due campioni di brodo di fermentazione:

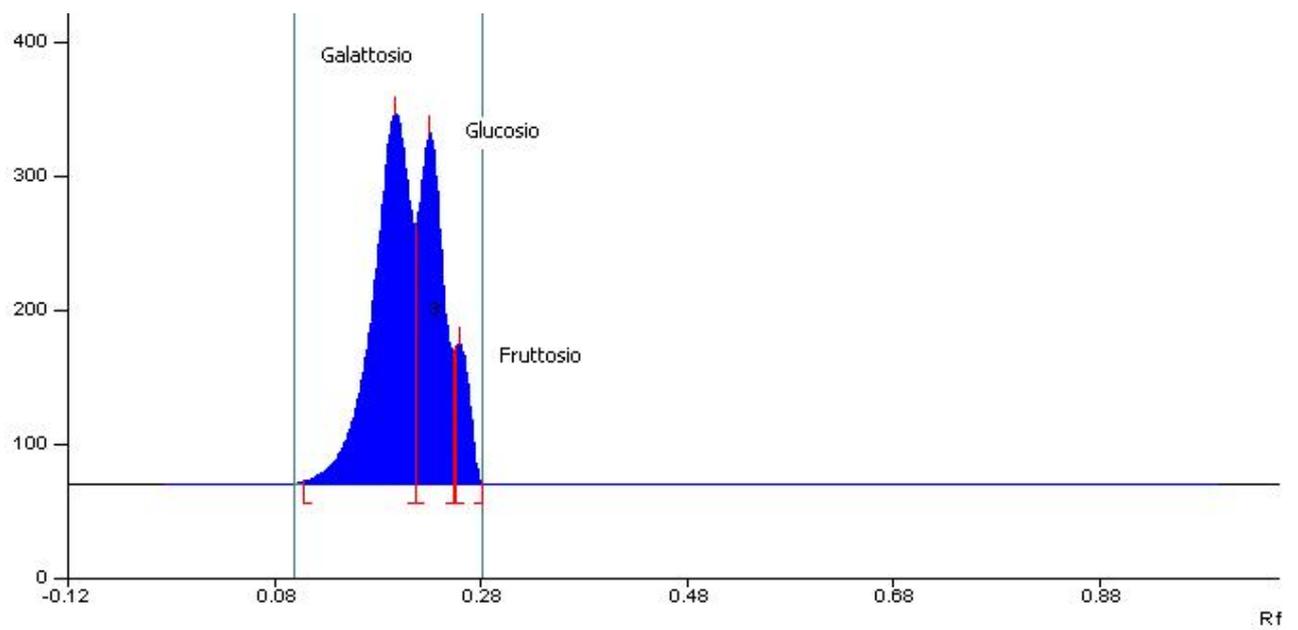


Fig.44 Densitogramma del campione T<sub>3</sub> (dopo 5 ore e 45 min dall'inizio della fermentazione) con diluizione 1/200 e 1  $\mu$ l di volume depositato.

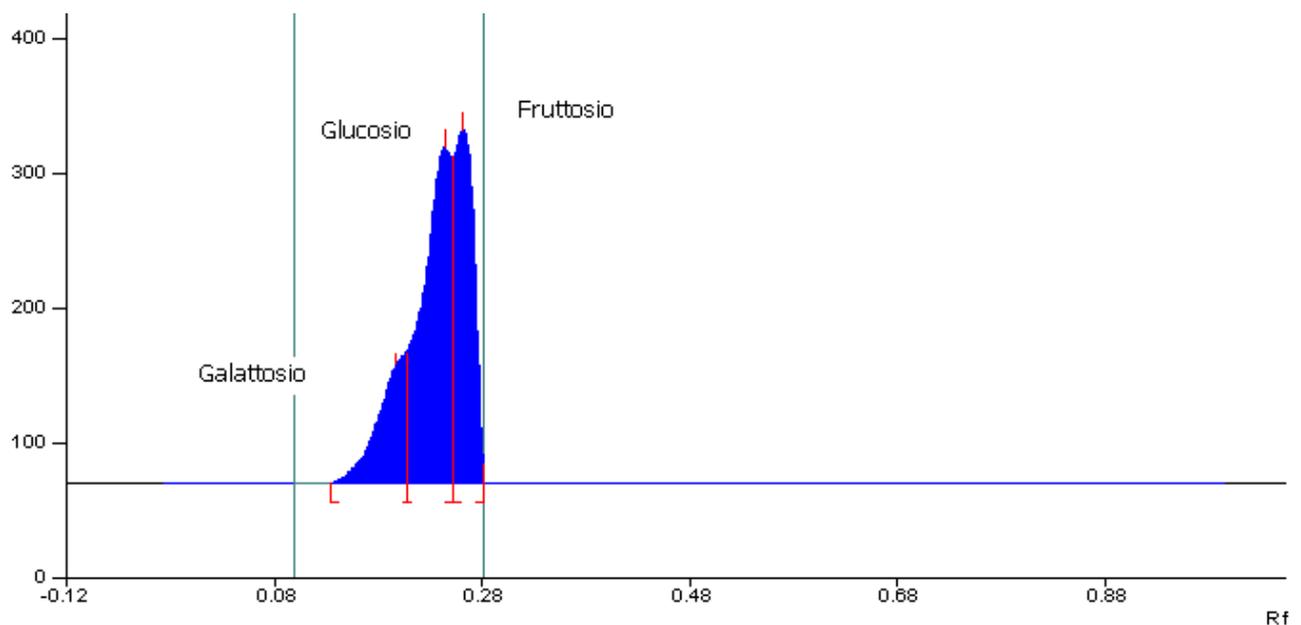


Fig.45 Densitogramma del campione T<sub>11</sub> (dopo 23 ore e 30 min dall'inizio della fermentazione) con diluizione 1/50 e 1  $\mu$ l di volume depositato.

*B. adolescentis* MB239 in crescita su questa miscela di nutrienti, ciascuno di 7 g/L, ha fatto registrare una velocità di crescita specifica di 0,18 h<sup>-1</sup>, paragonabile a quella osservata su singoli monosaccaridi osservate in prove precedenti a questo lavoro.

Dopo 12 h la coltura ha rallentato la crescita (circa 0,05 h<sup>-1</sup>) ed è entrata gradualmente in fase stazionaria.

Dall'analisi dei carboidrati residui, si è osservato che il primo monosaccaride ad essere consumato è stato il glucosio, seguito dal galattosio e successivamente dal fruttosio; infatti le massime velocità di scomparsa dei

monosaccaridi sono state osservate partendo dalle 6, 10 e 14 ore di fermentazione.

Tuttavia glucosio, galattosio e fruttosio non sono consumati una alla volta come nel caso di una crescita poliauxica, bensì con una notevole sovrapposizione temporale delle curve di degradazione.

Va infine sottolineato che la coltura è entrata in fase stazionaria quando vi erano ancora fruttosio (12mM) e glucosio (3 mM) disponibili.

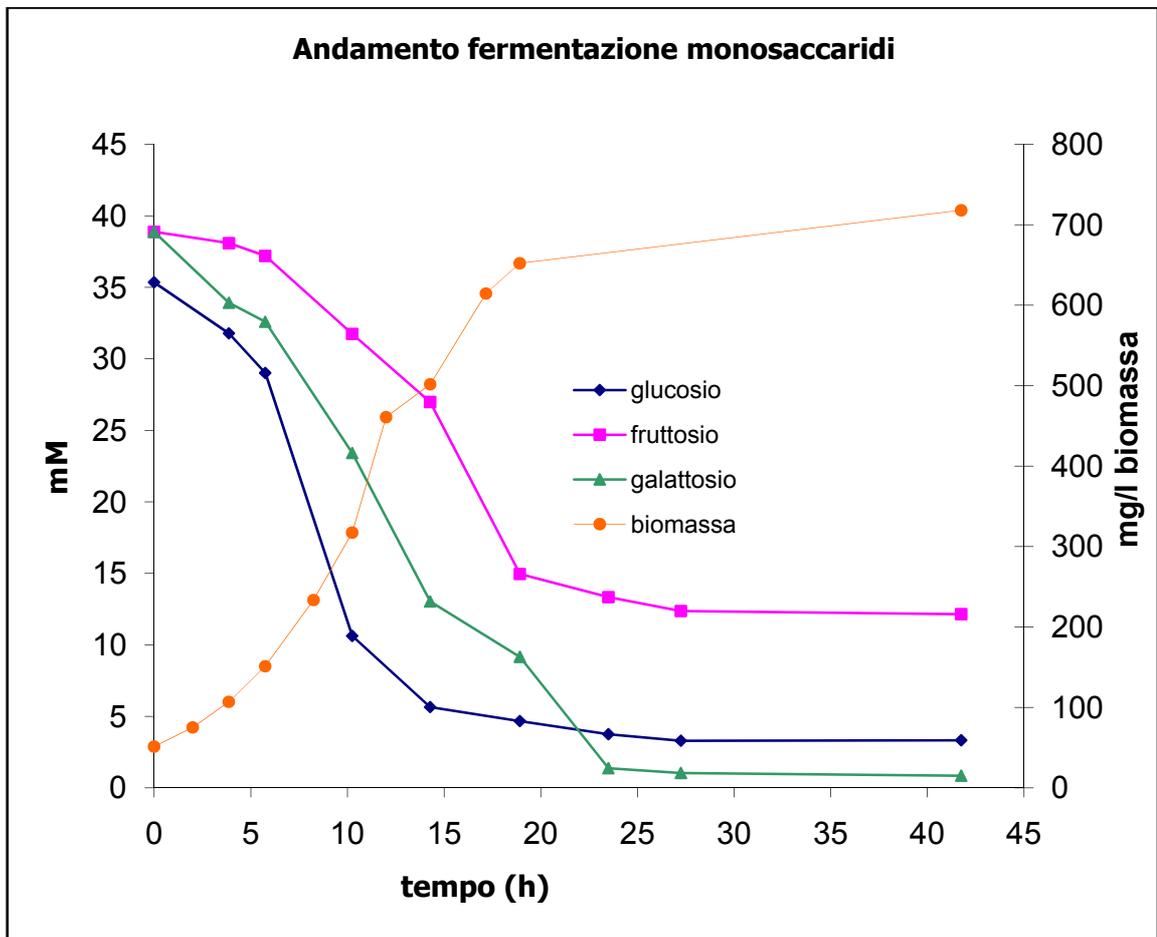


Fig.46 Rappresentazione grafica del consumo di monosaccaridi in relazione con lo sviluppo della biomassa

### 7.11.2. FERMENTAZIONE SU MISCELA DI DI- ED OLIGOSACCARIDI: LATTOSIO, RAFFINOSIO, ACTILIGHT

Si sono depositati 1,3,5,7,9,11  $\mu\text{l}$  di soluzione standard da 10 ppm e nella figura 45 riportiamo un esempio dei densitogrammi ottenuti sempre a 366 nm di lunghezza d'onda.

In relazione all'altezza ed all'area di ogni picco si costruiscono le relative curve di taratura riportate nella figura 47 con i rispettivi valori nella tabella 10:

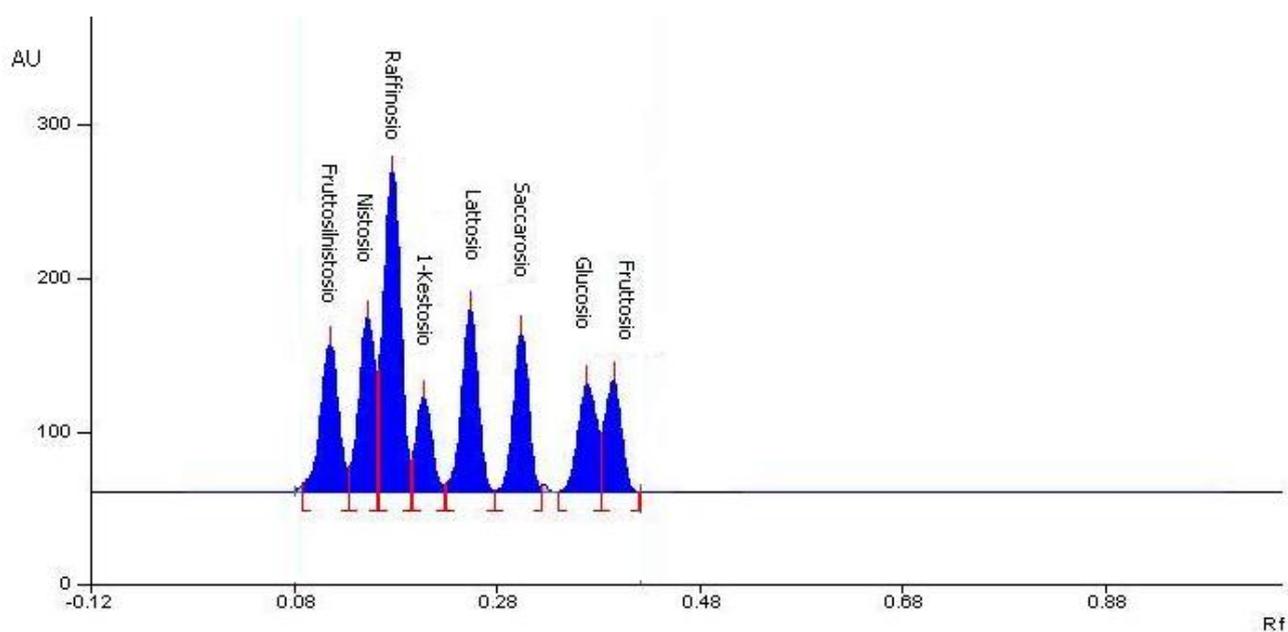


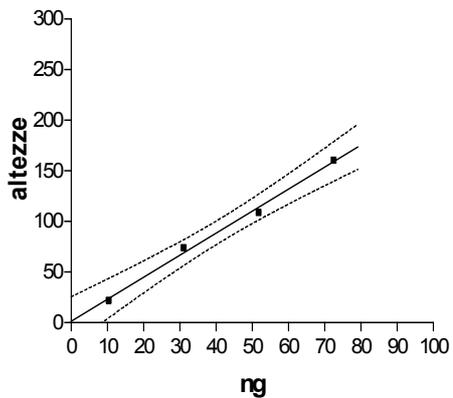
Fig.47 Densitogramma della soluzione standard (10 ppm, 6  $\mu\text{l}$ )

Curva di taratura	Equazione della retta	Coefficiente di correlazione $r^2$	$s_{y/x}$	Deviazione standard intercetta $s_a$	Deviazione standard pendenza $s_b$
Lattosio	$y=4,76x-10,71$	0,9981	5,92	6,07	0,14
1-Kestosio	$y=2,38x-7,52$	0,9989	2,54	2,60	0,06
Glucosio	$y=2,79x-15,26$	0,9964	5,17	5,30	0,12
Fruttosio	$y=2,17x+1,49$	0,9942	5,42	5,56	0,12
Saccarosio	$y=2,49x+9,14$	0,9955	6,38	6,54	0,12
Nistosio	$y=2,29x+14,08$	0,9915	9,49	9,72	0,15
Fruttosilnistosio	$y=2,66x+14,34$	0,9940	6,64	6,80	0,15
Raffinosio	$y=1,56x+36,22$	0,9997	2,45	2,51	0,02

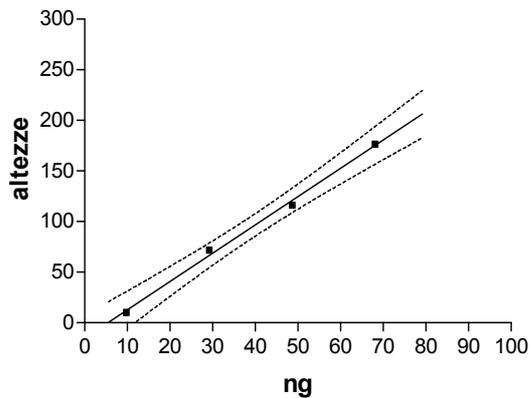
Tabella 10 Dati relativi alle curve di taratura degli standard del secondo tipo

di fermentazione

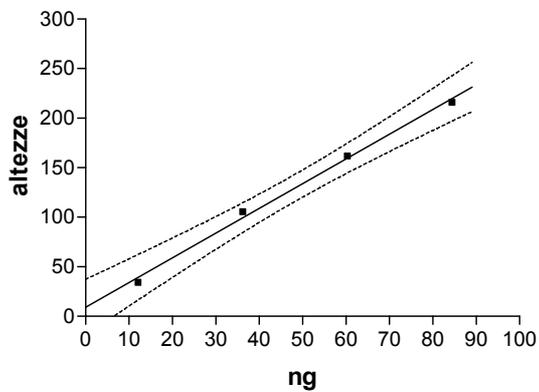
**Fruttosio**



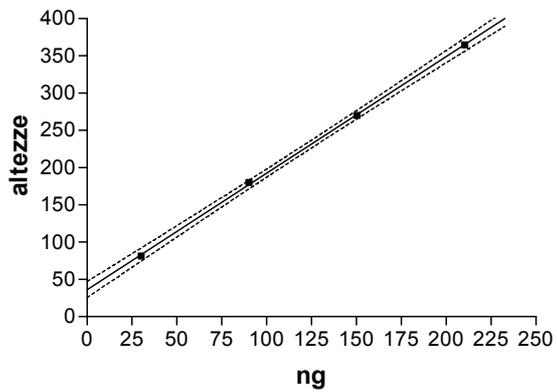
**Glucosio**



**Saccarosio**



**Raffinosio**



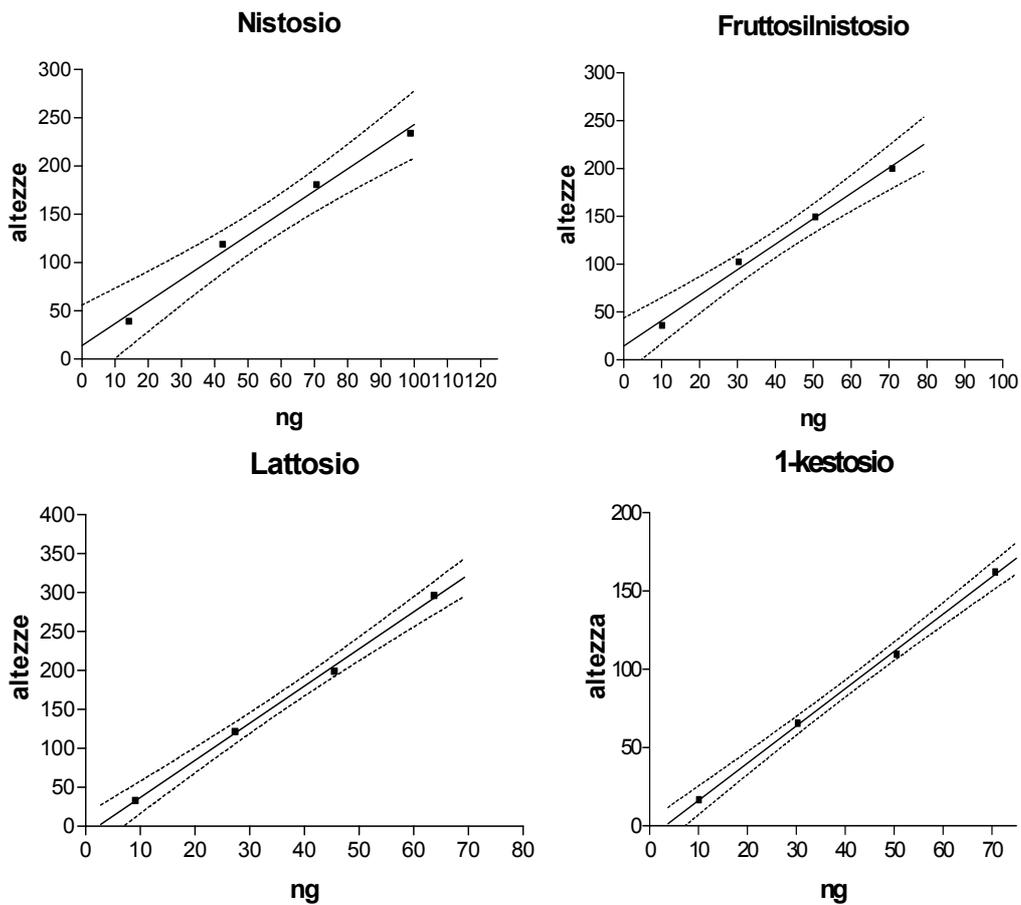


Fig.48 Curva di taratura dei mono, di- ed oligosaccaridi del secondo tipo di fermentazione

Anche per questa analisi ogni singolo campione è stato depositato con opportuna diluizione perché il valore di concentrazione degli zuccheri contenuti potesse corrispondere a metà delle curve di taratura, dove l'intervallo di fiducia ha il valore più piccolo.

Nelle figure 49, 50, 51 si riportano i densitogrammi di alcuni campioni di brodi di fermentazione:

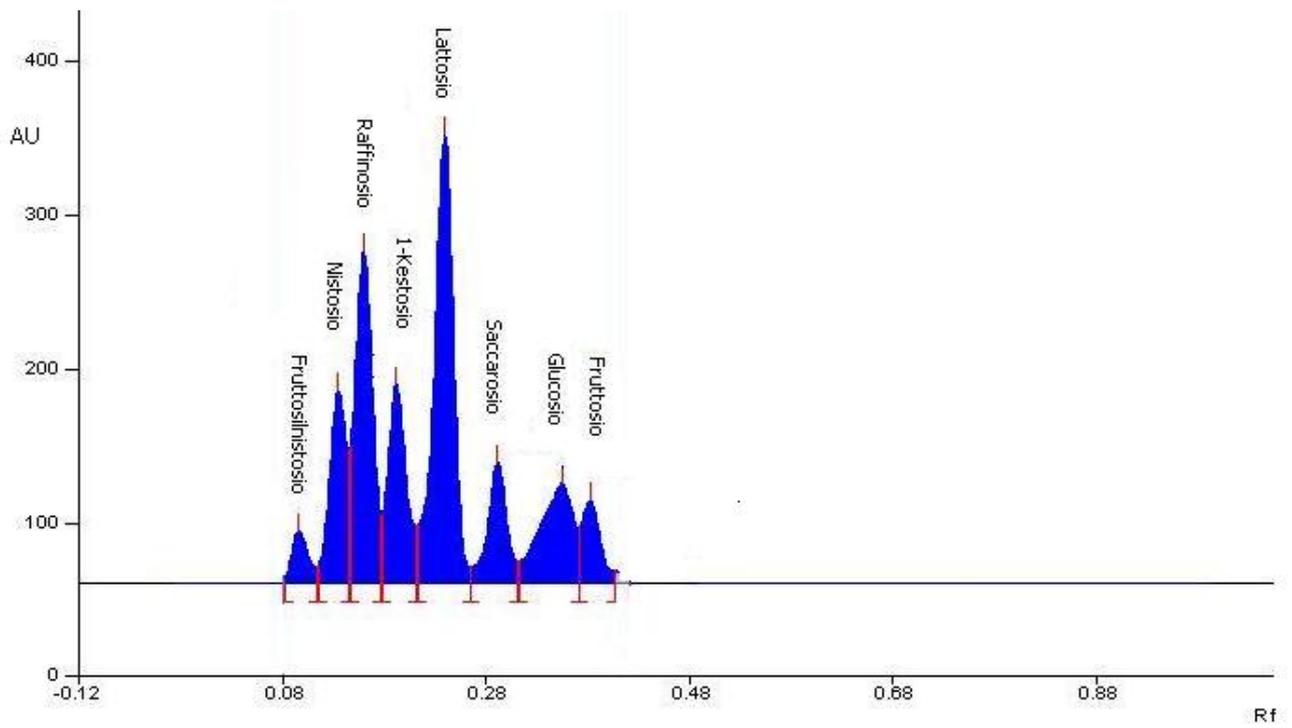


Fig.49 Densitogramma del campione T<sub>2</sub> (dopo 4 ore e 40 min dall'inizio della fermentazione) con diluizione 1/100 e 2  $\mu$ l di volume depositato.

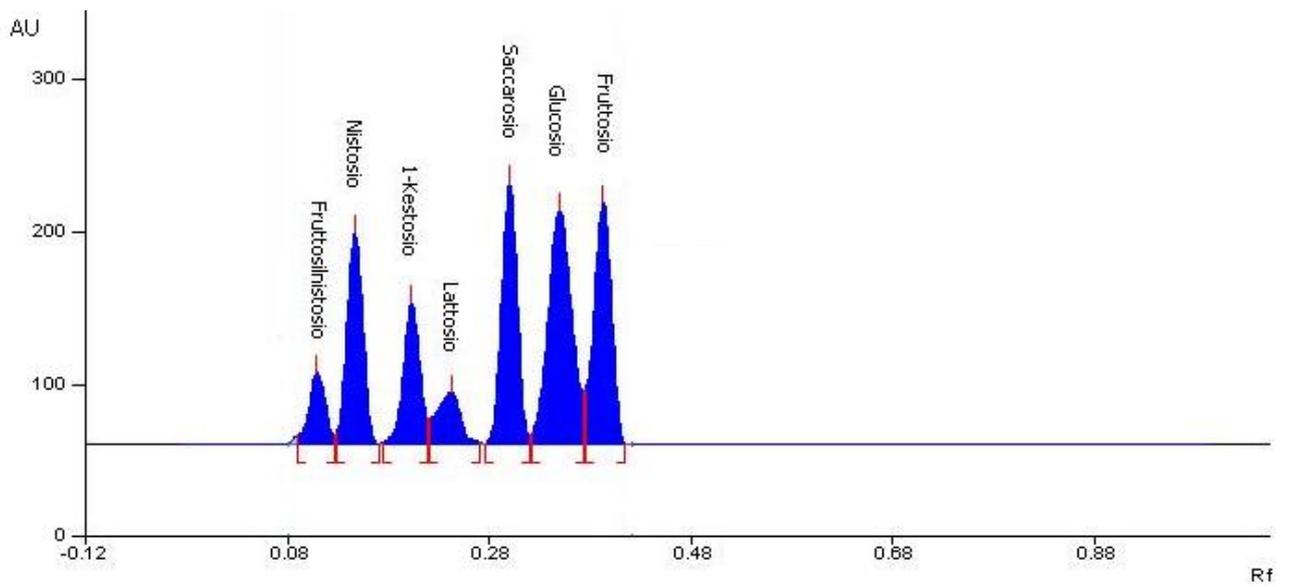


Fig.50 Densitogramma del campione T<sub>5</sub> (dopo 11 ore e 10 min dall'inizio della fermentazione) con diluizione 1/25 e 2 µl di volume depositato.

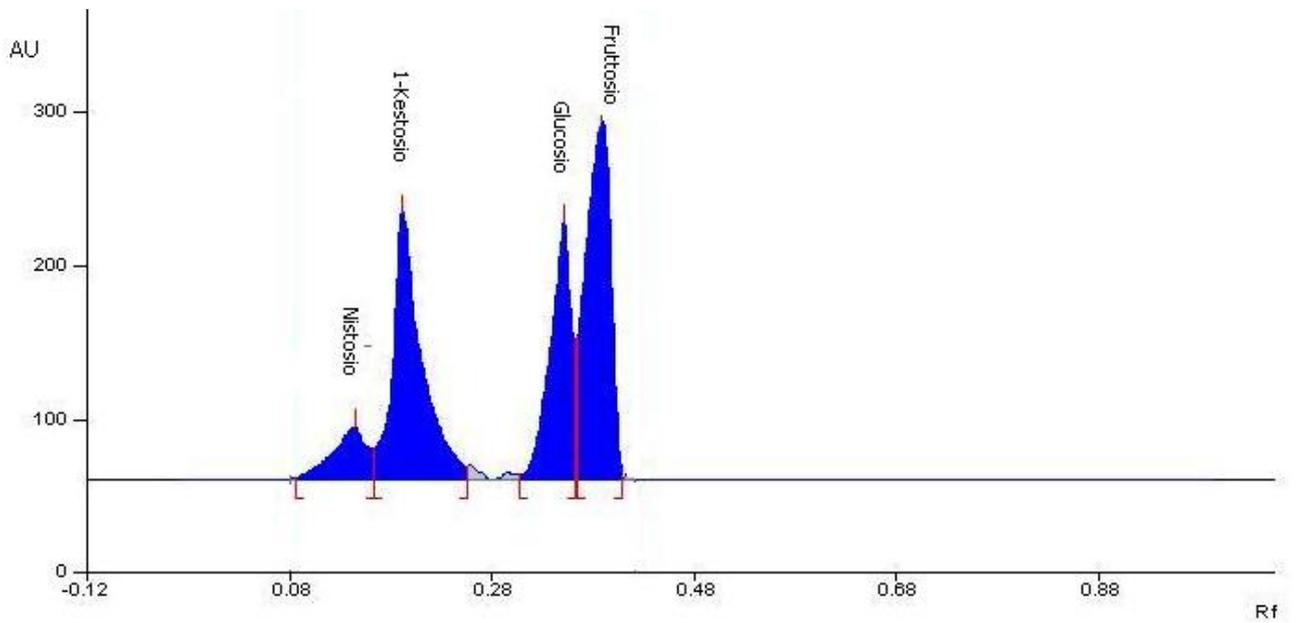
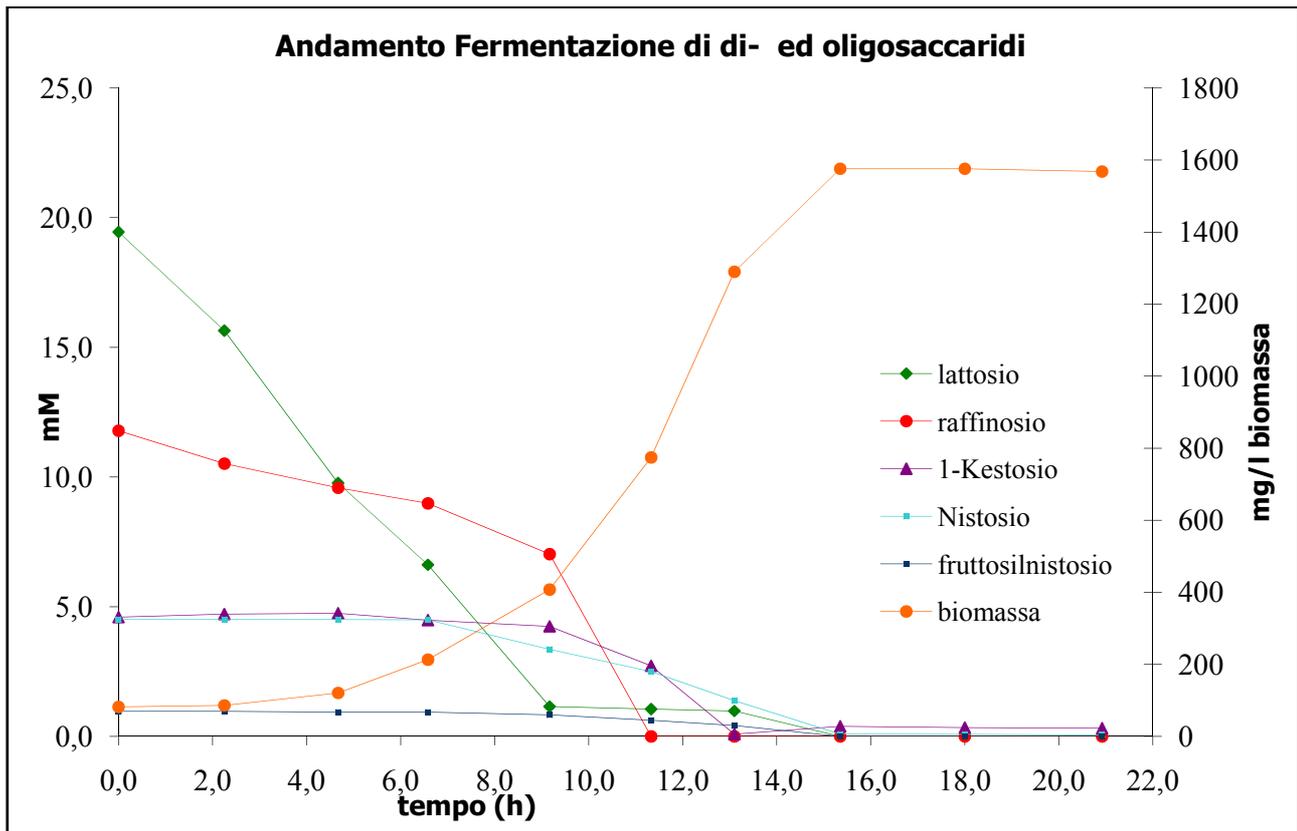


Fig.51 Densitogramma del campione T<sub>7</sub> (dopo 15 ore e 35 min dall'inizio della fermentazione) con diluizione 1/2 e 1 µl di volume depositato.

I tre densitogrammi riportati sopra mostrano come, al procedere della fermentazione, cambia la composizione del brodo di coltura.

Di seguito (figura 52) si riportano gli andamenti della fermentazione con i risultati dell'analisi.



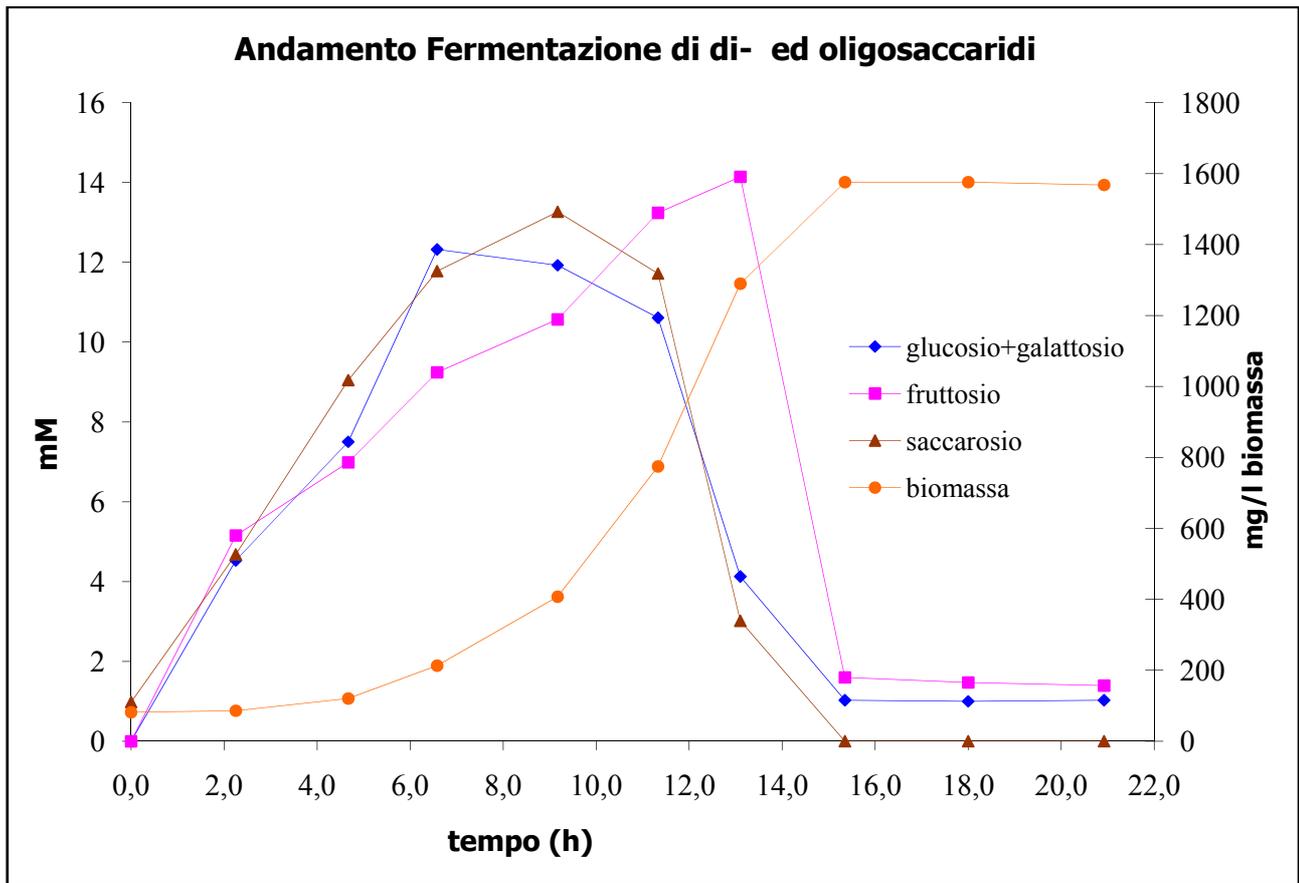


Fig.52 Rappresentazione grafica del consumo di di- ed oligosaccaridi e produzione dei corrispondenti monosaccaridi in relazione con lo sviluppo della biomassa.

In presenza di una miscela di lattosio, raffinosisio e FOS *B. adolescentis* MB 239 cresce con una velocità specifica di  $0,28 \text{ h}^{-1}$ , paragonabile a quella osservata sui singoli oligosaccaridi.

Il consumo di lattosio e raffinosisio è iniziato immediatamente dopo l'inoculo sebbene la coltura in termini di biomassa cellulare e acidificazione del mezzo di coltura, sia rimasta in lag-phase per circa 2,5 ore.

Il lattosio è consumato ad una velocità di circa  $4,0 \text{ mM h}^{-1}$  ed è pressoché scomparso dal brodo colturale già dopo 10 h.

Il raffinoso è consumato inizialmente alla velocità di  $1,5 \text{ h}^{-1}$ , per poi abbassarsi drasticamente dopo 9 h ed esaurirsi completamente dopo 11 h.

I frutto-oligosaccaridi sono consumati a partire da 6,5 h per esaurirsi dopo circa 15h.

E' stato inoltre possibile evidenziare che, nelle fasi centrali della fermentazione c'è un accumulo nel brodo di coltura di galattosio-glucosio, saccarosio e fruttosio provenienti dall'idrolisi degli oligosaccaridi.

Anche nel caso della miscela di oligosaccaridi questi non sono utilizzati in maniera sequenziale e le curve di degradazione, sebbene seguano cinetiche diverse, sono ampiamente sovrapposte.

L'accumulo nel brodo colturale dei prodotti di idrolisi degli oligosaccaridi e la diminuzione durante la lag-phase delle concentrazioni di lattosio e raffinoso, sottolineano la presenza di enzimi extracellulari o di enzimi legati alla superficie e confermano i risultati dei saggi enzimatici che saranno descritti di seguito.

### **7.11.3. FERMENTAZIONE SU MISCELA DI MONO, DI- ED OLIGOSACCARIDI: GLUCOSIO, FRUTTOSIO, GALATTOSIO, LATTOSIO, RAFFINOSIO, ACTILIGHT**

I densitogrammi e le deposizioni della miscela standard sono esattamente uguali a quelle riportate nella seconda fermentazione .

Anche se il brodo di coltura è più complesso, i profili dei densitogrammi mostrati nelle figure 50, 51 dei campioni, si assomigliano a quelli di questa fermentazione ed osservandoli in successione si osserva la variazione della composizione del brodo ad opera dei microrganismi.

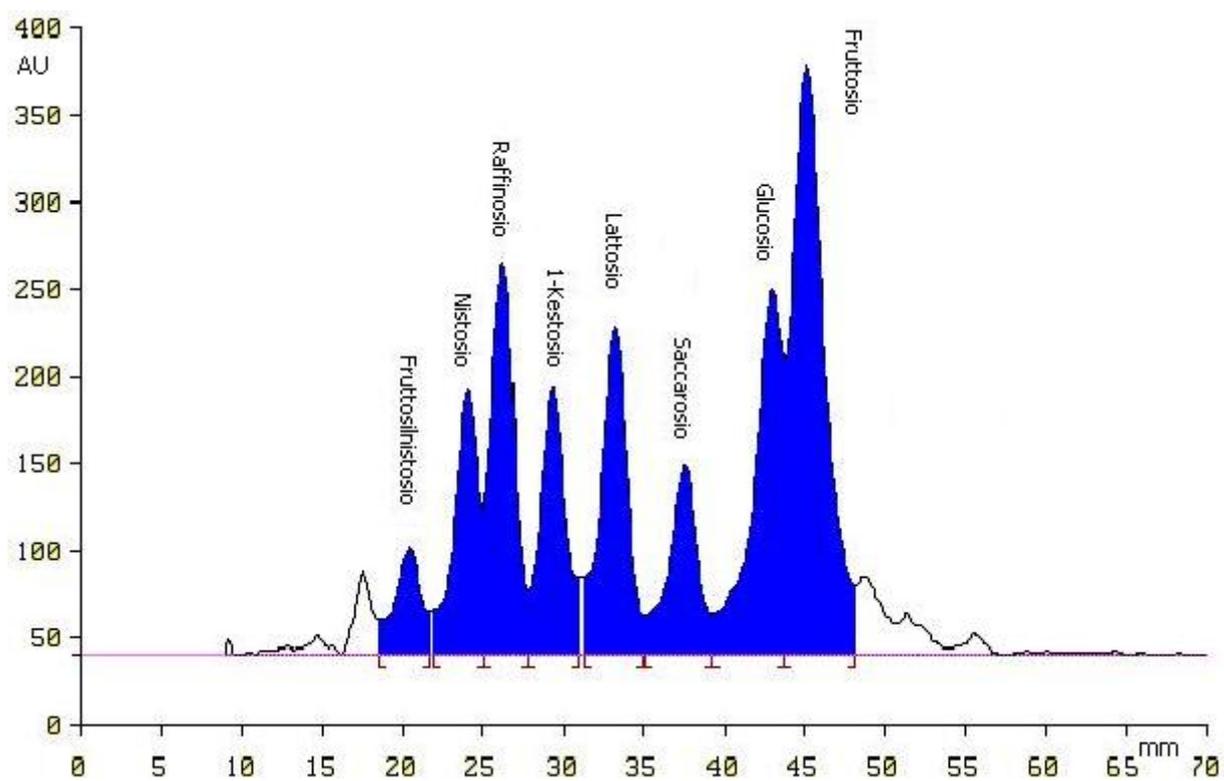


Fig.53 Densitogramma del campione del brodo di fermentazione T<sub>2</sub> (dopo 4 ore dall'inizio della fermentazione) con diluizione 1/10 e 1 µl di volume depositato

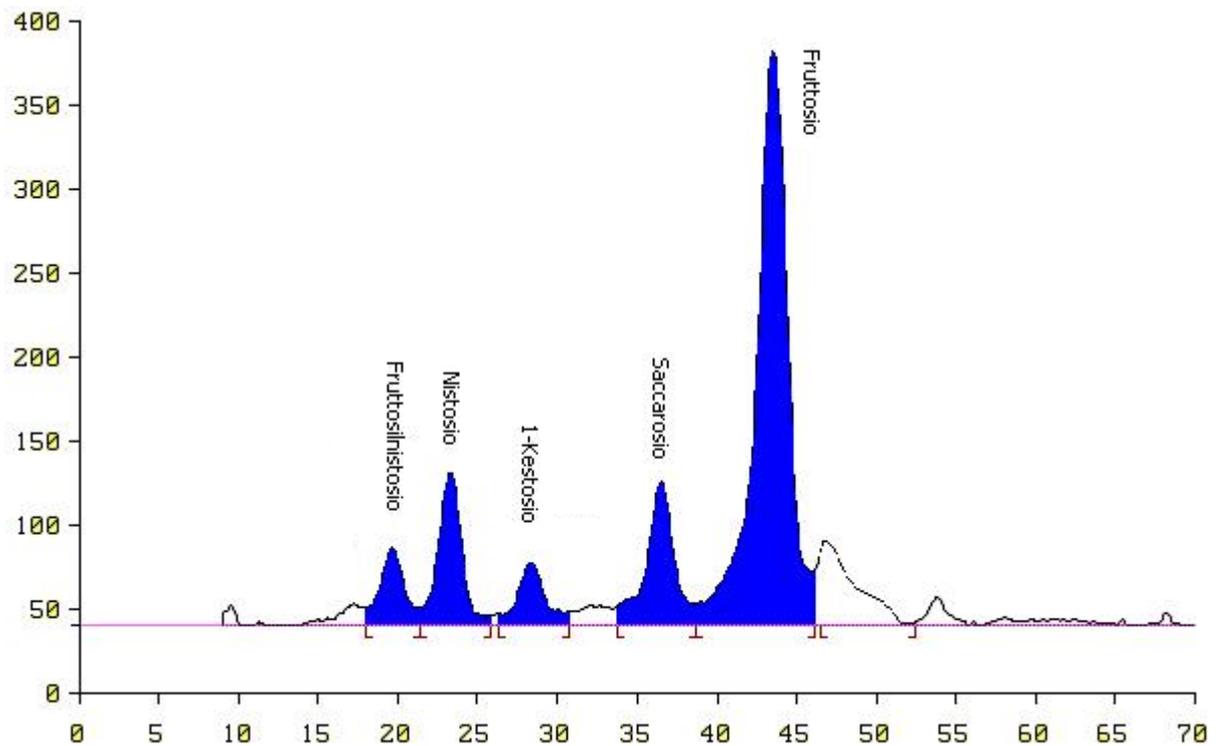


Fig.54 Densitogramma del campione del brodo di fermentazione T<sub>12</sub> (dopo 23 ore e 30 min dall'inizio della fermentazione) con diluizione 1/100 e 15 µl di volume depositato

Di seguito (figura 55) si riportano le curve di taratura degli standard ed in figura 56 troviamo gli andamenti della fermentazione con i risultati dell'analisi.

La degradazione di lattosio, raffinosisio e FOS è avvenuta secondo la cinetica descritta nell'esperimento precedente.

Il consumo dei monosaccaridi è avvenuto in ritardo rispetto agli oligosaccaridi: a circa 10 h è iniziato il consumo di glucosio, mentre a circa 20 h il fruttosio si trova ancora ad alte concentrazioni.

Nella fase iniziale della fermentazione, quando ad essere consumati erano soprattutto gli oligosaccaridi, la velocità specifica era di circa  $0,13 \text{ h}^{-1}$ ; dopo circa 15 h si è osservato un brusco rallentamento della crescita che, da quel momento ha proseguito con una velocità di  $0,06 \text{ h}^{-1}$

Dall'andamento generale si osserva un utilizzo preferenziale degli oligosaccaridi seguito solo in un secondo momento dal consumo dei monosaccaridi.

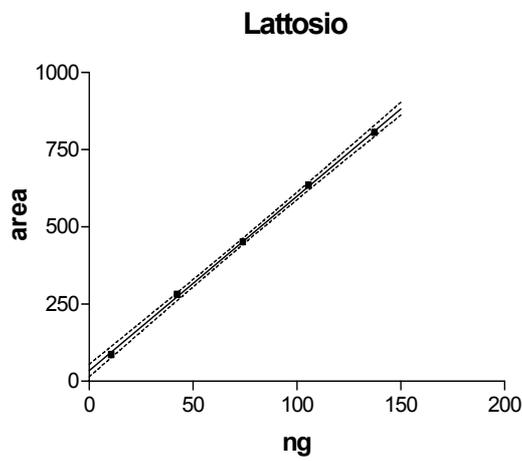
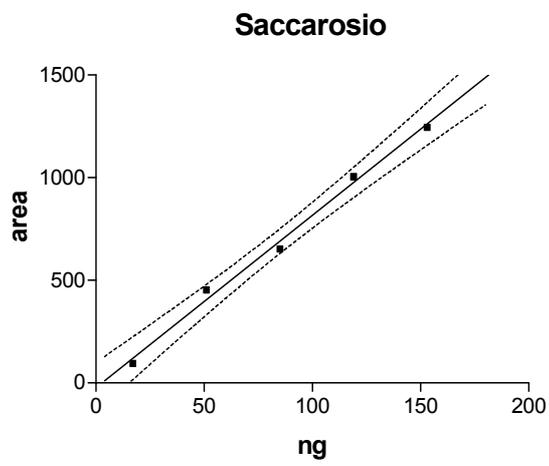
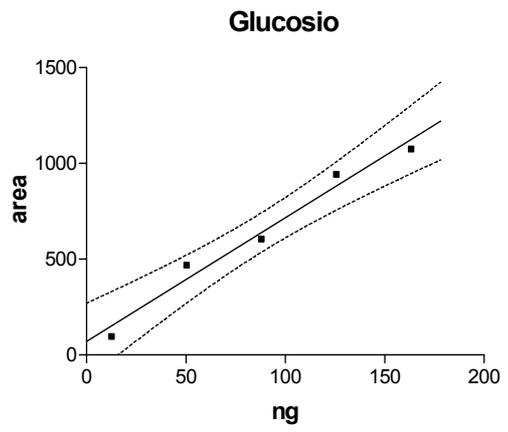
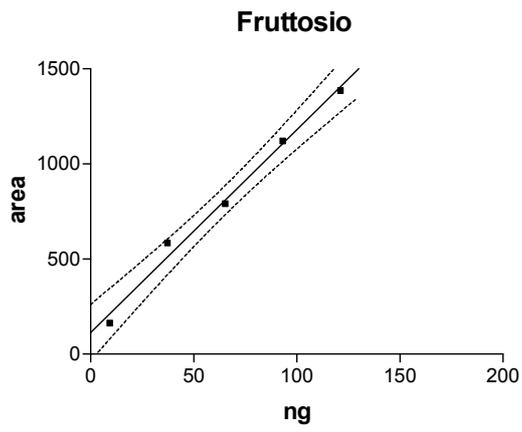
Dalla figura si può vedere come l'ordine di esaurimento sia: lattosio (14 h), raffinoso (16 h), glucosio (22 h), saccarosio ed 1-Kestoso (23 h), nistoso e fruttosilnistoso (24 h) mentre il fruttosio rimane presente ad elevate concentrazioni dopo 24 ore di fermentazione.

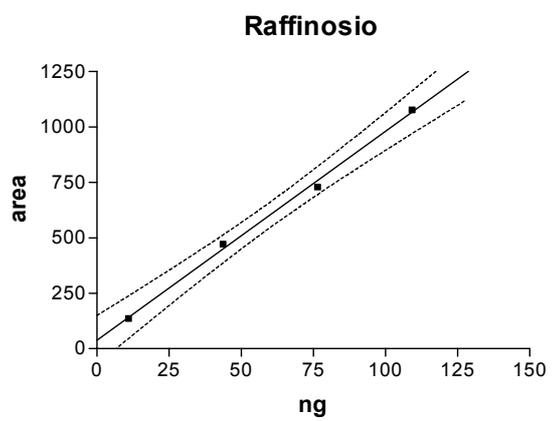
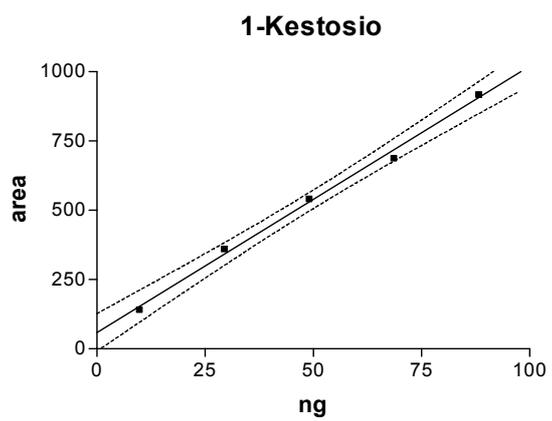
Si possono considerare tre fasi: nella prima (0-8 h) si osserva una lenta partenza della fase esponenziale, il lattosio è lo zucchero maggiormente utilizzato ed in parte ma in maniera meno marcata il raffinoso che viene poco utilizzato ed i valori di saccarosio e FOS, rimangono costanti.

Il glucosio aumenta nelle prime 10 h.

La seconda fase (8-16h), caratterizzata dalla crescita esponenziale della biomassa, vede l'esaurimento del lattosio seguita da quella del raffinoso, e l'inizio della degradazione dei FOS ma non del saccarosio. Inoltre si osserva che al catabolismo degli oligosaccaridi corrisponde un accumulo di monomeri nel terreno il che è indice di qualche attività glicosil-idrolasica extracellulare.

Dalla 10 h in poi anche il glucosio viene rapidamente consumato.





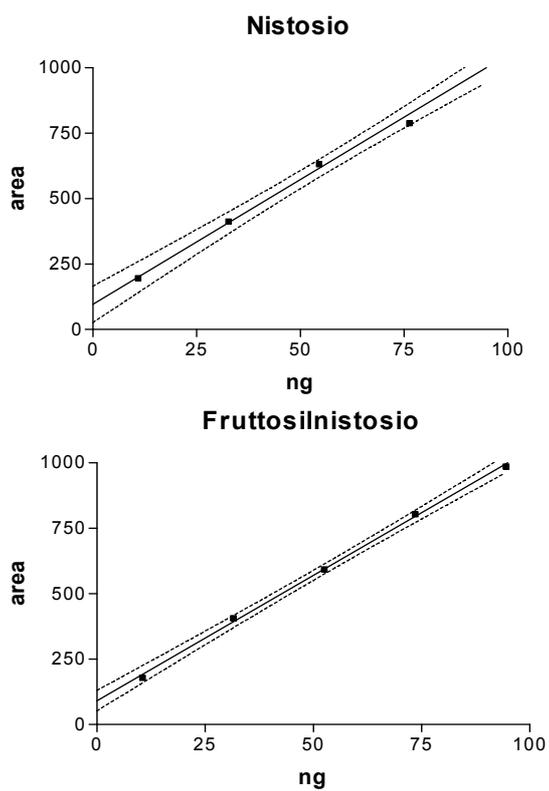


Fig.55 Curva di taratura dei mono, di- ed oligosaccaridi del terzo tipo di fermentazione

In questa fermentazione è stata eseguita anche una separazione in dieci step per discriminare il galattosio dal glucosio e poter seguire il suo iter fermentativo.

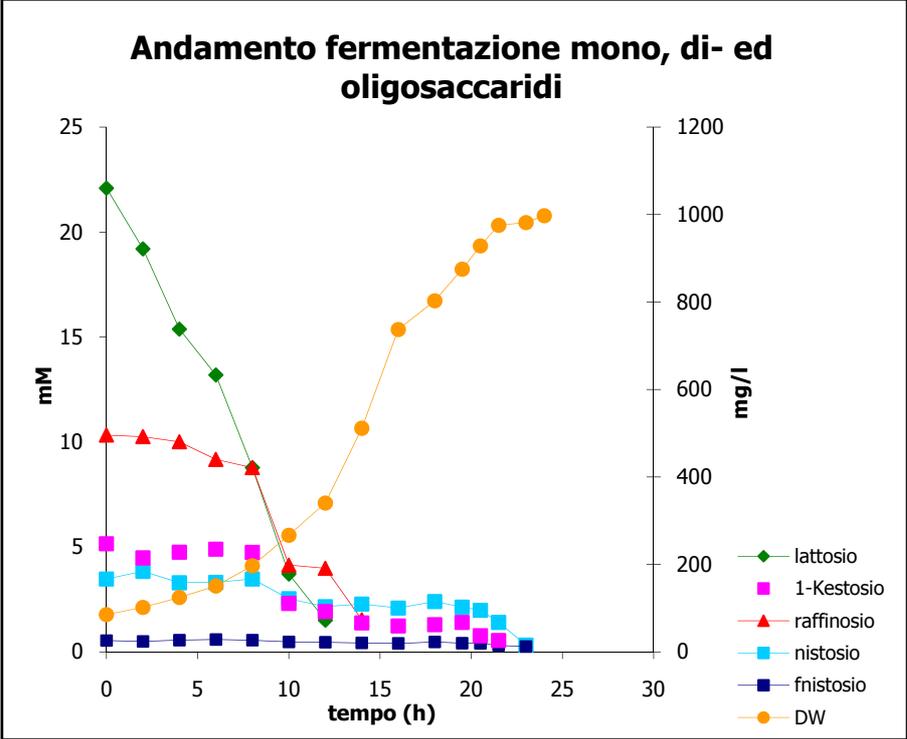
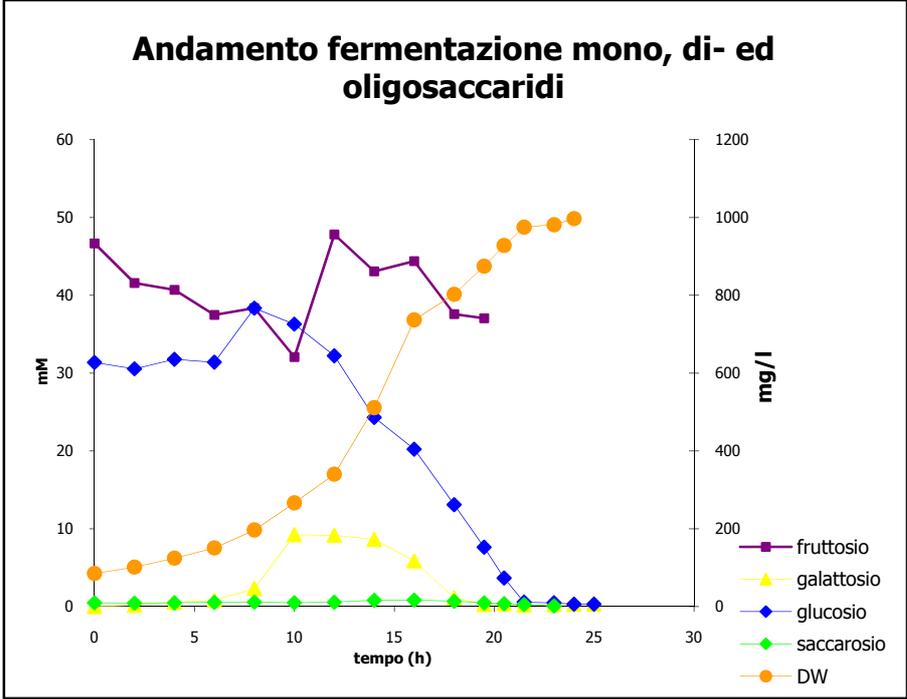


Fig.56 Rappresentazione grafica del consumo di mono di- ed oligosaccaridi in relazione con lo sviluppo della biomassa.

Nella terza fase, in cui si osserva la seconda parte della crescita esponenziale e l'inizio della fase stazionaria, si nota come l'esaurimento di raffinosio e lattosio sia seguito da un decremento della velocità di crescita ed un incremento della velocità di metabolismo del glucosio.

L'esaurimento del glucosio è seguito dal metabolismo del saccarosio prima e dei FOS in ordine di peso molecolare crescente.

La fermentazione termina con un'elevata concentrazione di fruttosio (37 mM) nel terreno di coltura.

## **6.12. CRESCITA DI *B. adolescentis* MB239 SU SINGOLE**

### **FONTI DI CARBONIO: modalità chemostato**

Il comportamento fermentativo di *Bifidobacterium adolescentis* MB239 sui singoli zuccheri è stato studiato in modalità chemostato su terreno SM contenente singoli carboidrati come unica fonte di carbonio.

Gli zuccheri studiati sono stati glucosio, fruttosio, lattosio, raffinosio e FOS. Sono state determinate le principali caratteristiche fermentative di *B. adolescentis* MB239, quali i principali parametri cinetici ( $\mu_{max}$  e  $Y_{X/S}$ ), le attività enzimatiche ( $\alpha$ - e  $\beta$ -galattosidasi, e  $\beta$ -fruttofuranosidasi) e la composizione del brodo esausto in termini di zuccheri residui e acidi organici prodotti durante la fermentazione.

### 7.13. PARAMETRI CINETICI

Le velocità specifiche di crescita massime ( $\mu_{max}$ ) di *B. adolescentis* MB239 sulle singole fonti di carbonio sono riportate in figura 57 e risultano essere valori medi di cinque batch e confermate da colture continue secondo il metodo wash-out..

Si osserva che le  $\mu_{max}$  ottenute su fruttosio e glucosio sono simili e più basse rispetto agli altri nutrienti utilizzati.

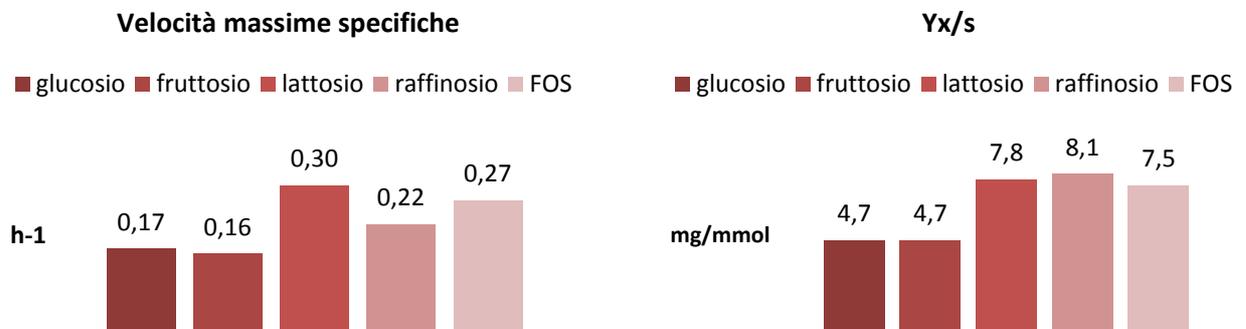


Fig.57 Parametri fermentativi di *B. adolescentis* MB239 in chemostato su differenti fonti di carbonio.

Le rese in biomassa  $Y_{x/s}$  ottenute con lattosio, raffinosisio e FOS sono maggiori e di valore simile di quelle ottenute su glucosio e fruttosio.

## **7.14. ATTIVITA' ENZIMATICHE ED ANALISI ZUCCHERI PRESENTI**

### **7.14.1. ATTIVITA' GLICOSIL-IDROLASICHE**

Le attività di  $\alpha$ -galattosidasi,  $\beta$ -galattosidasi e  $\beta$ -fruttofuranosidasi prodotte da *B. adolescentis* MB239 in presenza di glucosio, fruttosio, lattosio, raffinoso e FOS sono state misurate su colture in modalità chemostato allo stato stazionario alla medesima D ( $D = 0.075 \text{ h}^{-1}$ ). I risultati dipendono solo dalla fonte di carbonio utilizzata, e non dalla fase di crescita. Al fine di determinare la localizzazione delle attività glicosil-idrolasiche, sono state misurate le attività specifiche presenti nel surnatante, sulla superficie cellulare e nel citoplasma.

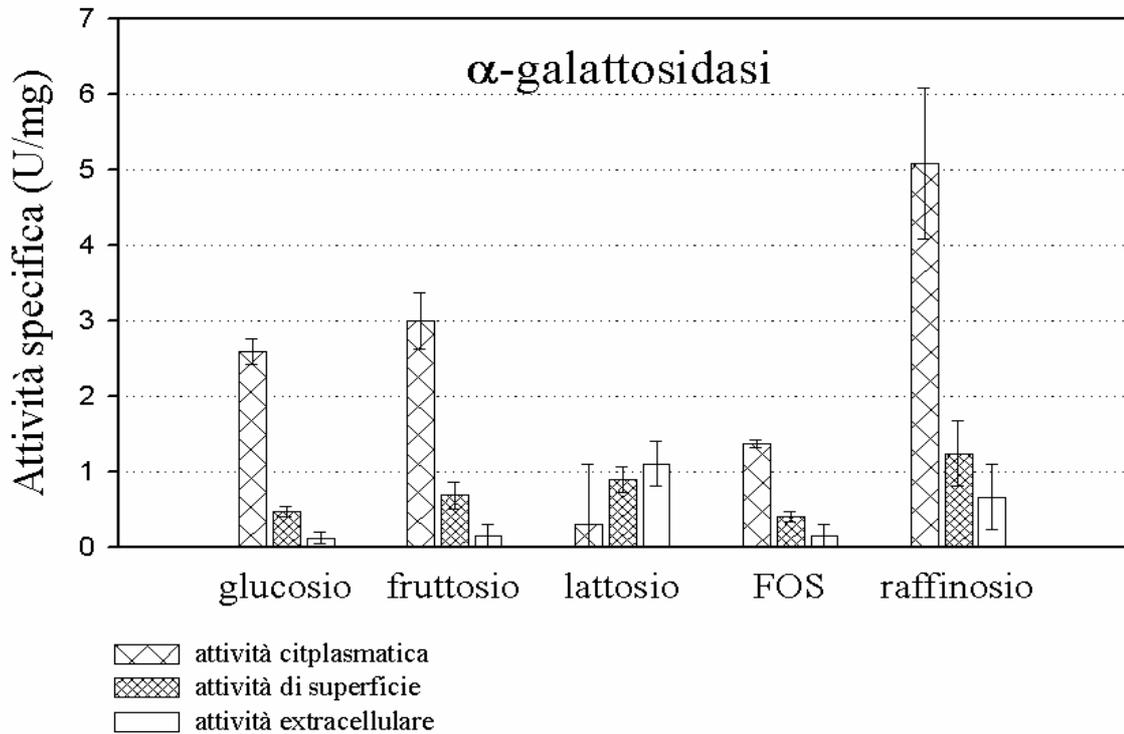


Fig.58 Attività specifica dell' $\alpha$ -galattosidasi (intracellulare, superficie e extracellulare) prodotte da *B. adolescentis* MB239 in chemostato ( $D = 0.075h^{-1}$ ) su singoli carboidrati.

Nel grafico di figura 58 sono riportate le attività dell'  $\alpha$ -galattosidasi e si può osservare che l'attività enzimatica è localizzata prevalentemente a livello intracellulare con la sola eccezione del caso del lattosio e glucosio e fruttosio non hanno alcuna influenza inibente.

Esiste, inoltre, una certa attività  $\alpha$ -galattosidasica costitutiva localizzata sulla membrana, indipendentemente dalle concentrazioni intracellulari ed extracellulari di enzima. L'attività extracellulare è presente in quantità significativa solo su lattosio e soprattutto raffinoso che peraltro sono i substrati più rapidamente consumati quando presenti in miscela con gli altri.

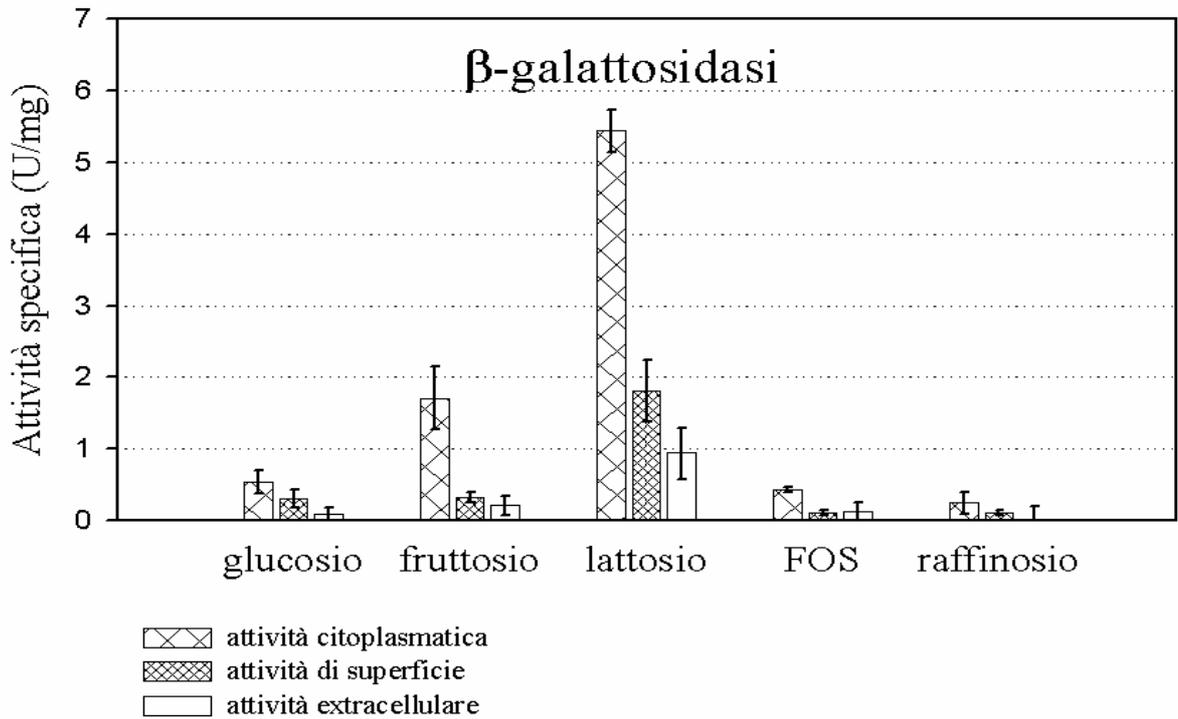


Fig.59 Attività specifica della  $\beta$ -galattosidasi (intracellulare, superficie e extracellulare) prodotte da *B. adolescentis* MB239 in chemostato ( $D = 0.075h^{-1}$ ) su singoli carboidrati.

Dal grafico in figura 59 si osserva come *B. adolescentis* MB239 produce la maggiore attività  $\beta$ -galattosidasica a livello di citoplasma, superficie e surnatante su lattosio; solo in presenza di fruttosio si osserva un'apprezzabile attività intracellulare, mentre in presenza di glucosio, FOS e raffinosisio l'attività  $\beta$ -galattosidasica è molto bassa se non addirittura nulla.

Come per l' $\alpha$ -galattosidasi, in ogni caso l'attività più importante è presente intracellularmente.

In figura 60 sono riportati in grafico i valori dell'attività della  $\beta$ -fruttofuranosidasi di *B. adolescentis* MB239.

In presenza di lattosio non sono state osservate apprezzabili attività enzimatiche.

In presenza di monosaccaridi, glucosio e fruttosio, che sono i prodotti della reazione di idrolisi, si nota un'attività  $\beta$ -fruttofuranosidasi citoplasmatica molto superiore rispetto a quella ottenuta in presenza di oligosaccaridi, FOS e raffinoso che sono i substrati di tale enzima.

In tutti i casi non è osservata una significativa attività enzimatica di superficie.

Possiamo inoltre notare come non vi sia una significativa presenza di attività extracellulare in nessuno dei campioni analizzati se non su glucosio e raffinoso.

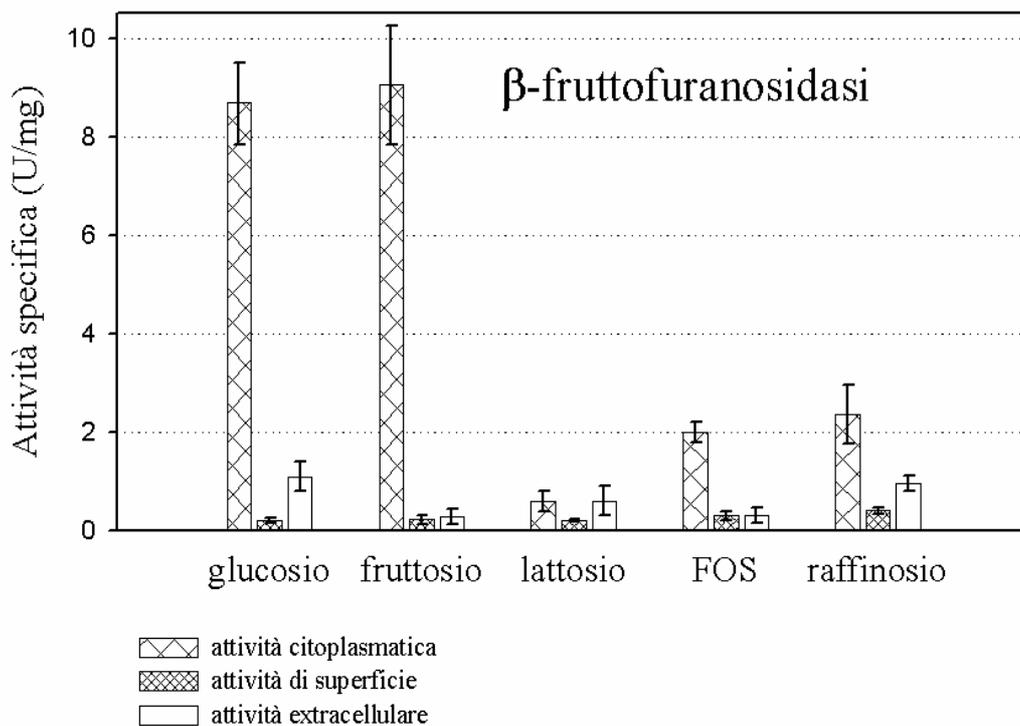


Fig.60 Attività specifica della  $\beta$ -fruttofuranosidasi (intracellulare, superficie e extracellulare) prodotte da *B. adolescentis* MB239 in chemostato

( $D = 0.075\text{h}^{-1}$ ) su singoli carboidrati.

L'analisi dei carboidrati residui allo stato stazionario ( $D = 0.075\text{ h}^{-1}$ ) durante la crescita di *B. adolescentis* MB239 in presenza degli oligosaccaridi lattosio, raffinoso e FOS è stata effettuata su campioni di brodo esausto da chemostato ed ha rivelato un significativo cambiamento della composizione relativa degli zuccheri presenti nel brodo di coltura rispetto al terreno utilizzato in alimentazione.

La composizione degli zuccheri nell'effluente è spostata verso i prodotti di idrolisi, totali e/o parziali, delle fonti di carbonio presenti nell'alimentazione.

Questa indagine è stata effettuata anche per capire se c'è congruenza con i dati di attività enzimatica, cioè per capire se FOS, lattosio e/o raffinoso sono idrolizzati all'esterno della cellula oppure inglobati e scissi internamente ad essa.

Dalla figura 61 si può notare come utilizzando i FOS come substrato, la frazione rappresentante i frutto-oligosaccaridi più pesanti, f-nistosio e nistosio, vengano quasi totalmente degradati, mentre si accumulano le frazioni corrispondenti ai prodotti di degradazione quali kestosio e fruttosio, con tracce di glucosio. Non si osserva presenza di saccarosio.

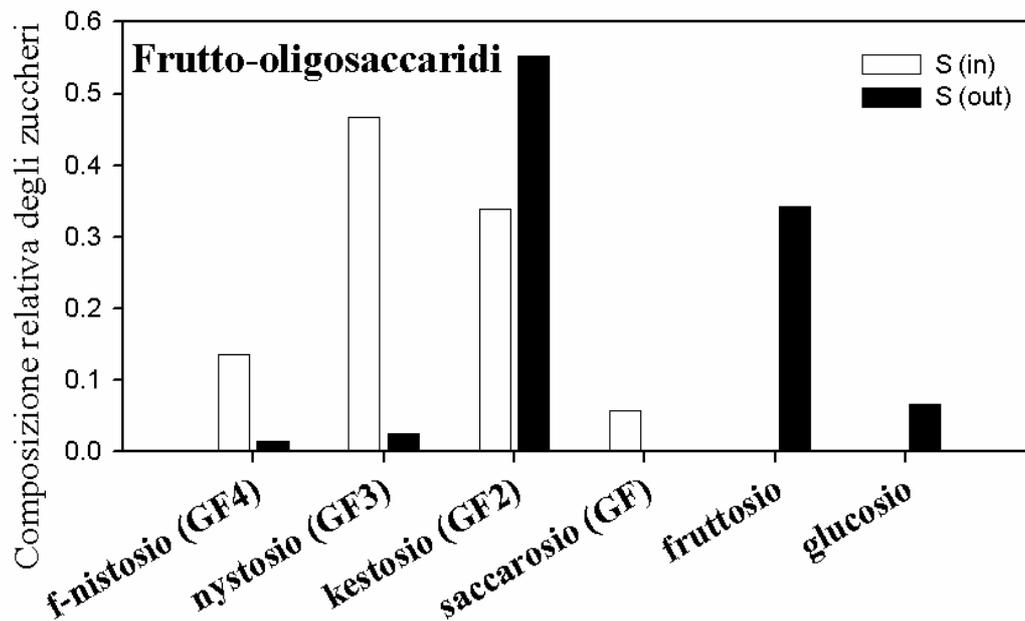


Fig.61 Composizione relativa degli zuccheri presenti nei terreni in entrata, S (in), e uscita, S (out), dal chemostato di *B. adolescentis* MB239, su terreno SM con frutto-oligosaccaridi.

Nel brodo delle fermentazioni condotte in lattosio, circa la metà degli zuccheri residui è composta dal substrato iniziale e galattosio con tracce di glucosio.

Nel chemostato con raffinotio si osserva che il substrato residuo rappresenta il 10% degli zuccheri residui ed il fruttosio il 33%.

Circa metà degli zuccheri residui è rappresentata da galattosio, mentre il glucosio è presente in tracce. E' da notare il fatto che non sono state individuate tracce di melibiosio, disaccaride proveniente dalla degradazione.

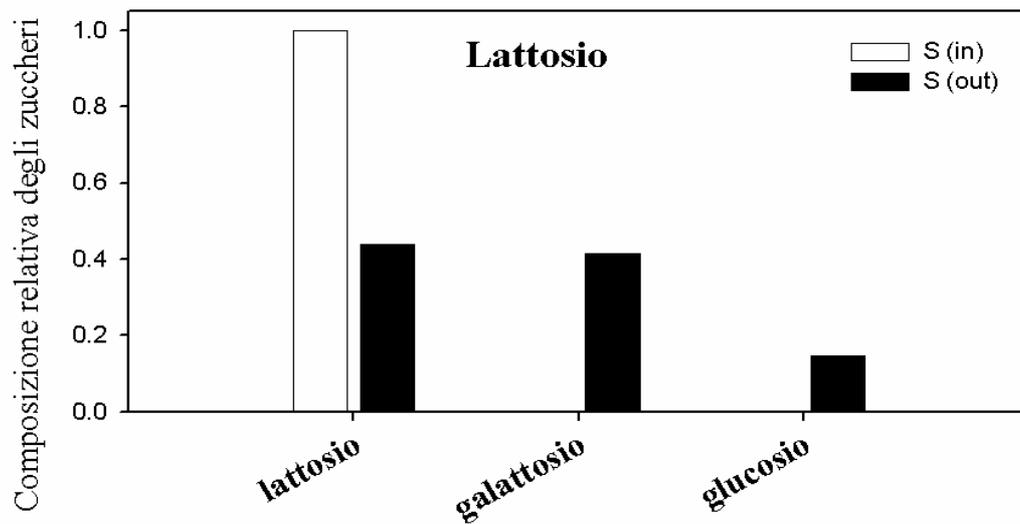


Fig.62 Composizione relativa degli zuccheri presenti nei terreni in entrata, S (in), e uscita, S (out), dal chemostato di *B. adolescentis* MB239, su terreno SM con lattosio.

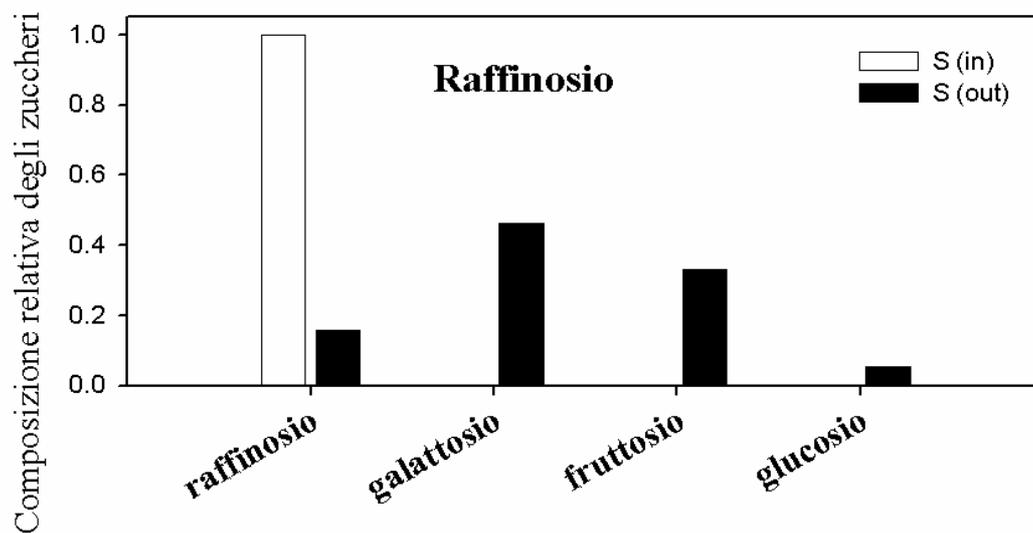


Fig.63 Composizione relativa degli zuccheri presenti nei terreni in entrata, S (in), e uscita, S (out), dal chemostato di *B. adolescentis* MB239,

su terreno SM con raffinoso.

## 7.15. CONCLUSIONI

In base ai risultati ottenuti, le più alte velocità di crescita e di resa cellulare si osservano su lattosio, FOS e raffinoso se li confrontiamo con glucosio e fruttosio e sono risultati che confermano dati di letteratura in cui si riporta che i substrati preferiti sono di ed oligosaccaridi se confrontati con i rispettivi monosaccaridi. (Palframan et al. 2003; Gibson and Wang 1994; Rada et al. 2002; Hopkins et al. 1998; van der Meulen et al. 2004; Kim et al. 2003).

In presenza di glucosio, fruttosio, lattosio, raffinoso e FOS, *B. adolescentis* MB 239 dispone di  $\alpha$ -galattosidasi,  $\beta$ -galattosidasi e  $\beta$ -fruttofuranosidasi diversamente distribuite sulla parete cellulare, intracellularmente ed al di fuori nel mezzo di crescita.

Come ci si poteva attendere, il lattosio è il miglior induttore di  $\beta$ -galattosidasi in generale, mentre il raffinoso mostra un'attività di  $\alpha$ -galattosidasi elevata a livello intracellulare e di superficie.

In presenza di glucosio e fruttosio si ha la maggiore produzione di  $\beta$ -fruttofuranosidasi se confrontati con i FOS ed il raffinoso.

Quindi la presenza di questo enzima extracellulare su FOS e raffinoso potrebbe essere un comportamento indotto dal lento rilascio di questi monosaccaridi prodotti per idrolisi dell'enzima stesso. (Perrin et al. 2001; Rossi et al. 2005).

L'ubicazione degli enzimi idrolitici su lattosio, raffinoso e FOS, sembra indicare due possibili vie di utilizzo dei nutrienti oligosaccaridici, che possono anche coesistere.

La prima consiste nel trasporto degli oligosaccaridi all'interno della cellula e la conseguente idrolisi e fermentazione ad opera degli enzimi presenti intracellularmente mentre la seconda via consente l'idrolisi degli zuccheri stessi nel mezzo di coltura o sulla superficie della membrana cellulare ed il successivo up-take delle unità costitutive (Palframan et al. 2003; Perrin et al. 2001; Moller et al. 2001).

E' stata rilevata la presenza delle unità monomeriche nei nostri esperimenti in modalità chemostato a supporto della seconda teoria in cui l'attività enzimatica ha azione sui nutrienti fuori dalla cellula per poi assorbirli sotto forma di monomeri.

Le quantità trovate non riflettono le quantità stechiometriche ottenibili dagli omologhi superiori presenti e questo può essere una ulteriore prova che le due vie di utilizzo dei nutrienti possono coesistere.

Per le fermentazioni in modalità batch con miscele binarie di nutrienti, uno dei due viene sempre utilizzato prima dell'altro, producendo un andamento di tipo diauxico di crescita cellulare (Narang et al. 1997; Kovarova-Kovar and Egli 1998), nel nostro particolare caso quindi abbiamo creato una miscela complessa di nutrienti da fornire contemporaneamente a *B. adolescentis* MB 239 ed i risultati dimostrano, invece, che il consumo o meglio l'utilizzo dei carboidrati presenti è stato simultaneo producendo un'unica curva di crescita esponenziale.

Nella fermentazione con i tre zuccheri glucosio, galattosio e fruttosio questi risultano utilizzati contemporaneamente anche se con velocità differenti.

Allo stesso modo in presenza di una miscela di mono-, di- ed oligosaccaridi il batterio utilizza simultaneamente lattosio, raffiniosio e FOS con una unica fase di crescita.

Il consumo simultaneo degli oligosaccaridi è in perfetto accordo con l'attività rilevata dalle nostre analisi enzimatiche e dall'accumulo, nel

brodo di coltura, di galattosio, fruttosio e saccarosio durante l'utilizzo degli oligosaccaridi.

In letteratura i monosaccaridi rappresentano il substrato preferito quando si trovano in miscela con altri zuccheri più complessi (Bruckner and Titgemeyer 2002; Saier 1997; Saier et al. 1996), al contrario con *B. adolescentis* MB 239 non c'è alcuna preferenza per i monosaccaridi se questi sono simultaneamente presenti a lattosio, raffiniosio e FOS nel mezzo colturale, anzi li troviamo utilizzati a fine fermentazione con il fruttosio che addirittura rimane come residuo e quindi inutilizzato.

Questo comportamento fermentativo, quindi, indica l'adattamento di *B. adolescentis* MB 239 all'ambiente intestinale in cui notoriamente sono assenti i monosaccaridi e l'utilizzo simultaneo degli oligosaccaridi con la presenza di diverse idrolasi glicosidiche utili.

## CAPITOLO 8

### CRESCITA DI *Bifidobacterium* MB 239 SU GOS

I metodi di determinazione della biomassa, dell'attività della  $\beta$ -galattosidasi e della determinazione degli zuccheri ripercorrono le metodiche specificate nel capitolo precedente nell'ambito dello studio dei FOS.

Il fermentatore utilizzato rimane quello impiegato con i frutto-oligosaccaridi di Bioindustrie Mantovane BM-PPS3, ed invariate rimangono anche le condizioni di fermentazione, l'unica variazione risiede nel pH mantenuto a 5,5, questo perché da prove preliminari si sono ottenute le più alte produzioni di biomassa.

In questa fase di studio non sono state eseguite fermentazioni in modalità continua, quindi per il calcolo delle costanti cinetiche si è utilizzato un algoritmo ricorsivo con il metodo dei minimi quadrati, risolvendo il sistema di equazioni differenziali ordinarie per le variabili di stato del sistema di fermentazione.

Questa procedura è stata possibile grazie all'utilizzo di Matlab software (versione 6,5 ; Mathworks) con il risolutore di equazioni differenziali ODE15S unito al programma di analisi di regressione non lineare LSQNONLIN.

Questo programma richiede una stima iniziale dei parametri ed, in maniera reiterata, calcola i valori che minimizzano la somma dei minimi quadrati dei residui RSS:

$RSS = RSS_x + RSS_s + RSS_p$  dove  $RSS_x$ ,  $RSS_s$ ,  $RSS_p$  corrispondono alla somma dei minimi quadrati dei residui tra i valori sperimentali e quelli calcolati dal modello per la biomassa, per il substrato e per i prodotti.

Si utilizza anche la funzione NLPARCI per la stima dell'intervallo di confidenza al 95% dei parametri calcolati.

Nella tabella 11 si trovano le equazioni utilizzate, con le concentrazioni di biomassa, substrato e prodotti inseriti ed espressi in mM di atomi di carbonio.

La concentrazione di biomassa è calcolata utilizzando la composizione elementare di *Lactococcus lactis* la cui massa molecolare corrisponde a  $27,8 \text{ g C mol}^{-1}$ .

## COMPONENTI

Biomassa X (mM C)

Substrato S (mM C)

Prodotti P (mM C)

## EQUAZIONI BILANCI DI MASSA

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \cdot \frac{S}{S + K_S} - K_d \cdot X$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{\mu_{max}}{Y_{X/S}} \cdot \frac{S}{S + K_S} - m \cdot X$$

$$\frac{dP_{L,A,E,F}}{dt} = Y_{L,A,E,F/X} \cdot \mu_{max} \cdot \frac{S}{S + K_S} \cdot X$$

Tabella 10 Modello matematico di equazioni differenziali per fermentazioni batch di *B. adolescentis* MB239

I parametri per il modello sono forniti sperimentalmente dalle fermentazioni batch e si osserva una buona predizione delle costanti se si confrontano i dati sperimentali con quelli teorici (Boonmee M., 2002; Ross E.W., 2005).

## 15.1. MESSA A PUNTO DEL METODO DI ANALISI DEI CARBOIDRATI

Le analisi sui carboidrati presenti nel terreno di coltura sono state effettuate utilizzando la tecnica analitica HPTLC-AMD per la miscela più complessa in studio mentre per la quantificazione degli zuccheri presenti nelle fermentazioni con singoli nutrienti è risultato comodo e rapido usare la tecnica cromatografica OPLC.

### 8.1.1. FERMENTAZIONE SU UNICO NUTRIENTE: GLUCOSIO, GALATTOSIO E LATTOSIO

La tecnica OPLC, Over Pressure Layer Chromatography, come ampiamente illustrato in precedenza, si riferisce ad un sistema di eluizione che utilizza una pompa per forzare la fase mobile attraverso quella stazionaria.

Si esercitata una pressione elevata (50 bar) per mezzo di un cuscino che preme sulla lastra cromatografia in maniera uniforme.

Il principio di funzionamento quindi ricalca la ben più nota tecnica cromatografica HPLC a differenza del fatto che la fase stazionaria è planare e non all'interno di una colonna. L'eluizione utilizzata è in questo caso di carattere isocratico con una fase stazionaria di silice (HTSorb™ Fine silica gel con supporti in fogli di alluminio Bionisis lastre 20×20) ed una fase mobile di Acetonitrile/acqua 85/15, eluente che è risultato di forza adatta per condurre analisi sui monosaccaridi di interesse per questo lavoro.

Le altre condizioni operative sono:

Volume R 300 µl

Velocità del flusso di eluizione 300 µl/min

Volume di eluente impiegato 10000 µl

Con questa tecnica sono stati dosati glucosio, galattosio e lattosio nelle rispettive fermentazioni e gli stessi zuccheri nella fermentazione con GOS.

Campioni e standard (glucosio, galattosio e lattosio Sigma-Aldrich Steinheim Germania) sono stati depositati sotto forma di bande da 3mm.

### **8.1.2. FERMENTAZIONE SU MISCELA OLIGOSACCARIDICA: GOS**

La messa a punto del metodo di analisi di una miscela complessa come i GOS, ripercorre gli stessi step analitici della separazione descritta per i frutto-oligosaccaridi.

La separazione della miscela di GOS syrup (Vivinal GOS Borculo Domo Zwolle Olanda con 18,8% in glucosio, 3,5% galattosio, 19,4% lattosio e 58,3% GOS) è stata realizzata su lastre 20 x 10 cm in silice Kieselgel 60 F254s (Merck) pretrattata con una soluzione di sodio acetato 0,2 M (tempo di immersione 20 sec, tempo di asciugatura 20 minuti all'aria) e la deposizione sulle lastre è stata effettuata mediante Camag Linomat V.

I dati isocratici delle distanze di migrazione ottenuti con le miscele binarie di acqua ed acetonitrile sono riportati nella seguente figura, allo scopo di comprendere quale potesse essere il migliore range di forza dell'eluente per separare tutti gli analiti

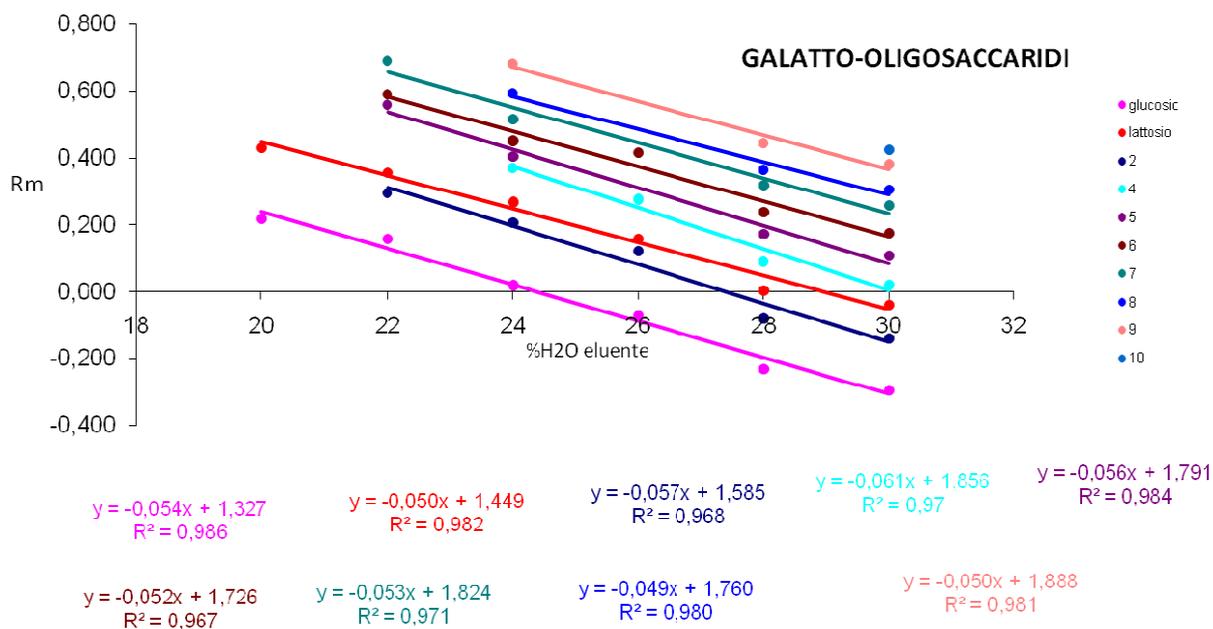
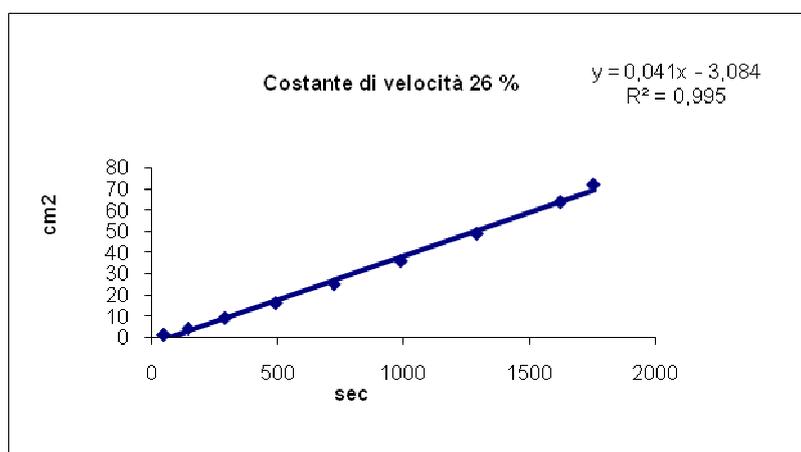


Fig.65 Ritenzione in funzione della frazione di acqua espressa come percentuale su silice

Durante la misura degli Rf di tutte le sostanze presenti nella miscela, si è tenuto conto dei tempi di eluizione per ogni composizione percentuale di acqua e si sono calcolate le relative costanti di velocità (figura 65).

Attraverso questi dati si può calcolare l'equazione che lega le costanti di velocità alle percentuali di acqua presenti nell'eluente, nell'intervallo prescelto, tutto questo è riportato nel grafico di figura 66.



Distanza (cm <sup>2</sup> )	Tempo medio (sec)
1	46
4	144
9	292
16	491
25	726
36	990
49	1289
64	1620
<b>72,25</b>	<b>1749</b>

Fig.66 Grafico relativo al calcolo della costante di velocità per una percentuale di acqua nell'eluente del 26%.

Mentre nella figura 67 si riporta il grafico utilizzato per calcolare l'equazione delle costanti di velocità utili per la programmazione della AMD e della eluizione da eseguire.

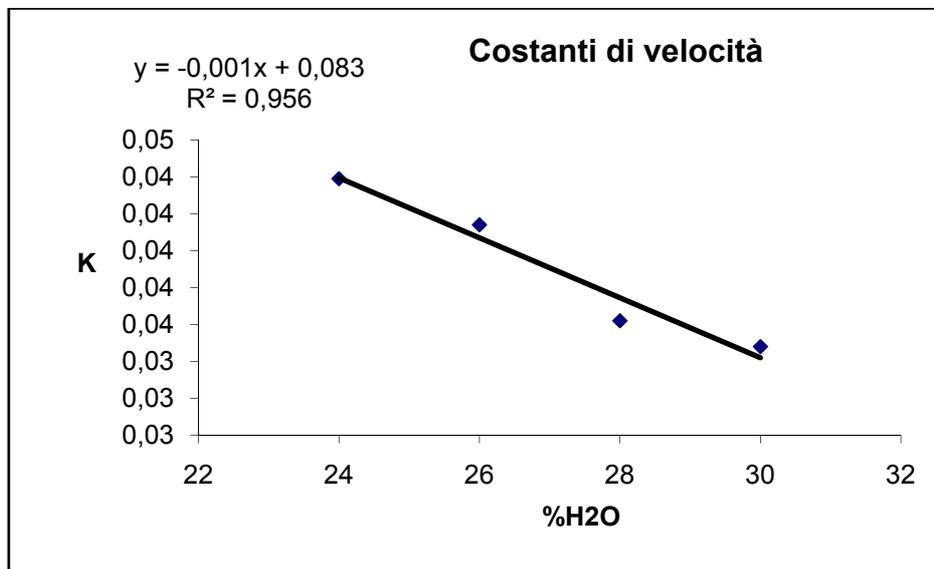


Fig.67 Costanti di velocità ottenute sperimentalmente su lastre di silice con eluente H<sub>2</sub>O (24-30%) ed acetonitrile

Per arrivare all'eluizione si ripercorrono gli stessi step descritti nella separazione dei FOS compresa la preparazione dei campioni, degli standard e le relative deposizioni.

La miscela complessa di nutrienti di questa fermentazione ha presentato dal punto di vista analitico diverse difficoltà.

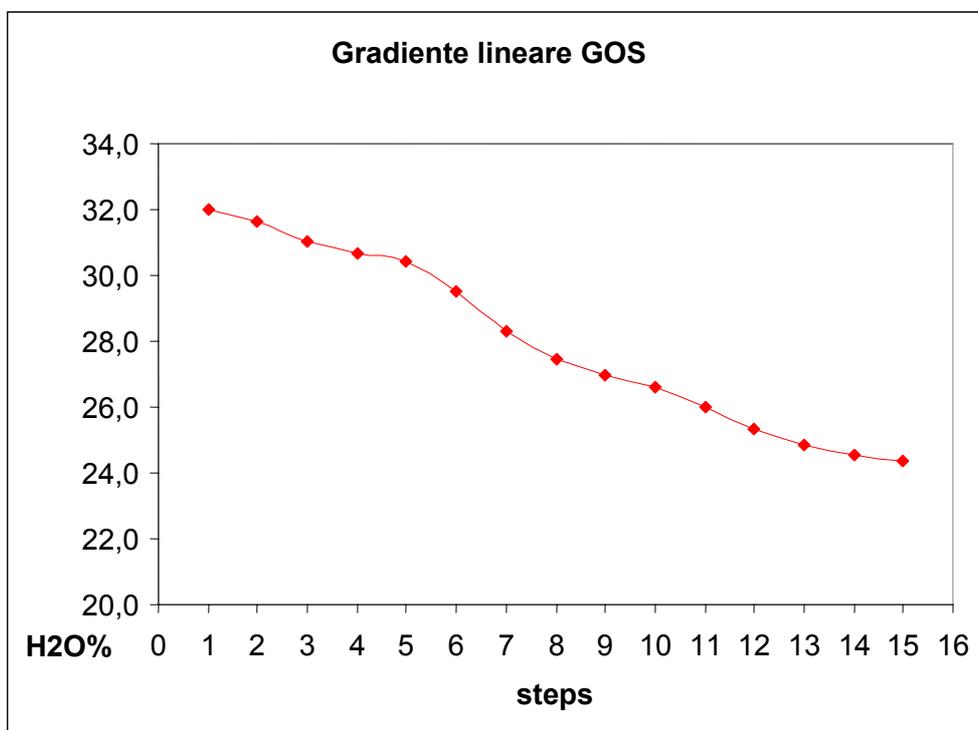
I GOS utilizzati sono sintetizzati per via enzimatica perciò la miscela presentava una eterogeneità di sostanze non certificata in maniera precisa.

La sfida dal punto di vista analitico perciò richiedeva la necessità di separarne tutte le componenti a tal punto da poterle identificare e soprattutto dosare, anche se sul mercato non esistono i relativi standard.

La cromatografia planare HPTLC, nella sua applicazione specifica AMD, attraverso il sistema cromatografico di fase mobile e stazionaria, di seguito descritto, ha permesso una risoluzione di tutti i componenti, in modo tale da offrire la possibilità di conoscerne la complessità costitutiva.

Per l'eluizione si sono utilizzate quattro soluzioni di acqua ultrapura (32%, 30%, 26%, 24% v/v) e acetonitrile (Carlo Erba Reagenti) secondo un gradiente lineare in 15 steps.

Ogni stadio è seguito da 20 minuti di essiccamento in flusso d'azoto secco (figura 68 ).



Step	Soluzione 1 <sup>a</sup>	Soluzione 2 <sup>b</sup>	Soluzione 3 <sup>c</sup>	Tempi (min)
1	100			0,210
2	81,38	18,62		0,825
3	52,59	47,41		1,806
4	33,98	66,02		3,154
5	21,96	78,04		4,873
6	14,19	67,19	18,62	6,734
7	9,17	43,42	47,41	8,680
8	5,92	28,06	66,02	10,960
9	3,83	18,13	78,04	13,58
10	2,47	11,71	85,81	16,54
11	1,6	7,57	72,21	19,56
12	1,03	4,89	46,66	22,65
13	0,67	3,16	30,15	26,12
14	0,43	2,04	19,48	29,96
15	0,28	1,32	12,59	34,16

<sup>a</sup> Acetonitrile/acqua=68/32

<sup>b</sup> Acetonitrile/acqua=70/30

<sup>c</sup> Acetonitrile/acqua=74/26

<sup>d</sup> Acetonitrile/acqua=76/24

I tempi di asciugatura per ogni step sono stati impostati a venti minuti, in modo da assicurare che la lastrina fosse perfettamente asciutta per le operazioni successive.

Fig.68 Gradiente multi-step utilizzato nella separazione dei galatto-oligosaccaridi presenti nei brodi di fermentazione.

Campioni e standard sono stati depositati su lastre HPTLC sotto forma di bande da 4mm per l' AMD e da 3mm per l' OPLC, ad una velocità di deposizione di 20 µl/min in flusso d'azoto.

I campioni sono stati diluiti da un minimo di 2 ad un massimo di 100 volte con acqua (senza ulteriore trattamento che non fosse la semplice diluizione) e depositati su più

tracce in volumi tali da fornire risposte all'interno delle rette di calibrazione degli analiti in istudio.

Per le rette di calibrazione sono state utilizzate soluzioni madre standard 1000 mg/l di glucosio, galattosio e lattosio (sono state depositati 2, 4, 6, 8 e 10 µl delle soluzioni madre preventivamente diluite a 10 mg/l).

In figura 69 si riporta un densitogramma ottenuto dalla miscela di GOS syrup, opportunamente diluita.

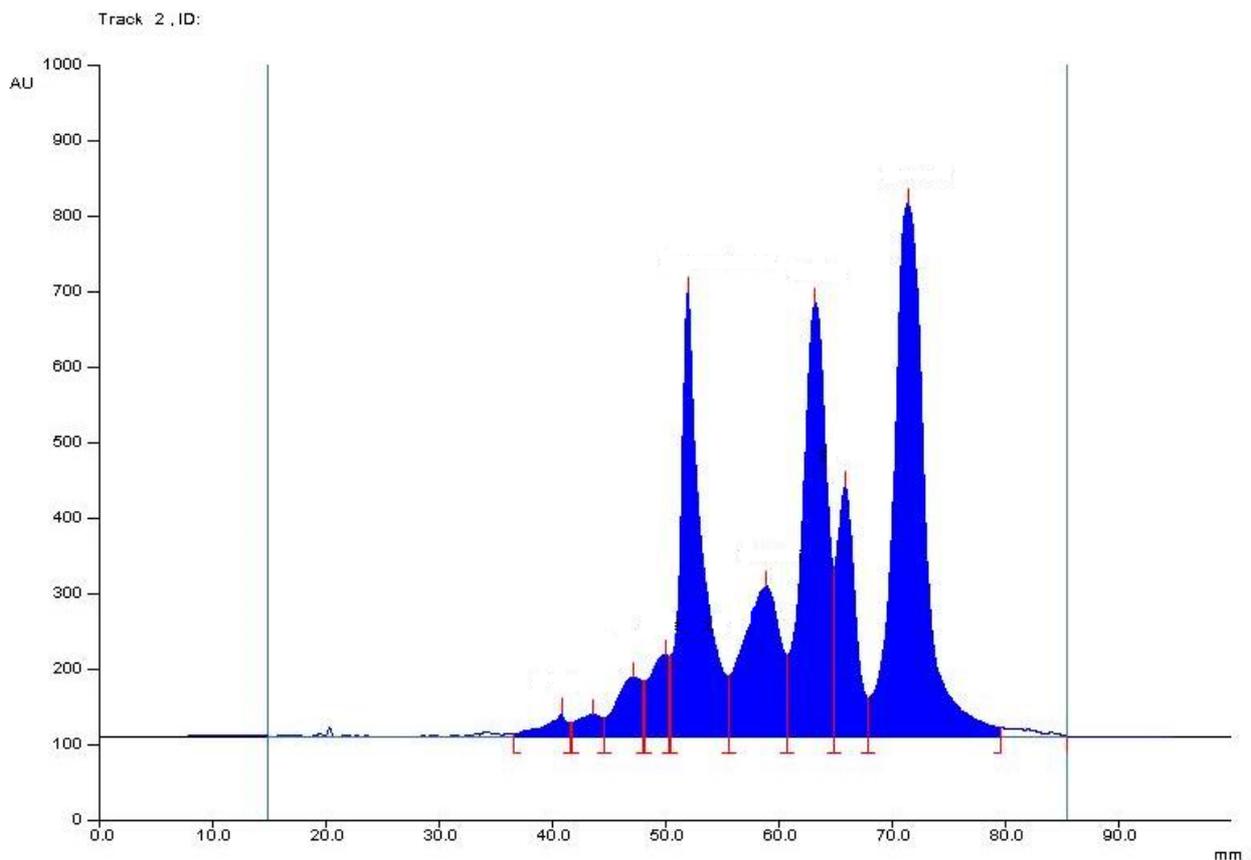


Fig.69 Densitogramma ottenuto in AMD, della miscela di Gos syrup utilizzata per la fermentazione.

L'identificazione dei picchi, come di norma, passa attraverso la verifica della relazione di Martin nella quale si osserva l'esistenza di una correlazione tra le distanze di migrazione ed i picchi risolti.

La possibilità di mettere in relazione queste due grandezze permette di identificare in maniera precisa la tipologia di galattoligosaccaride (figura 70).

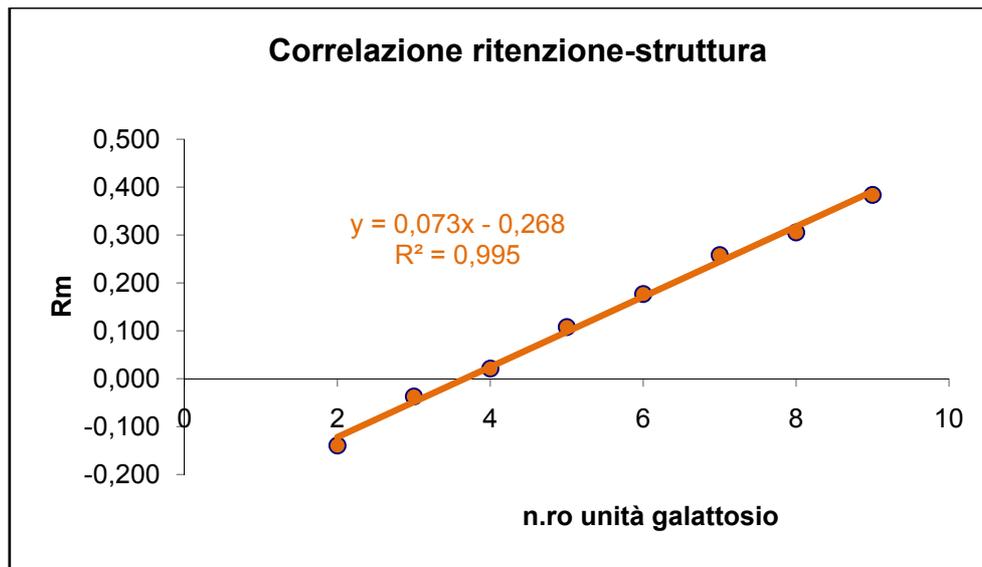


Fig.70 Correlazione ottenuta durante le prove di separazione in isocratica al 30 % di acqua.

La stima precisa del consumo di glucosio, galattosio e lattosio è stata calcolata da analisi condotte in cromatografia planare OPLC utilizzando i relativi standard (Figura 71).

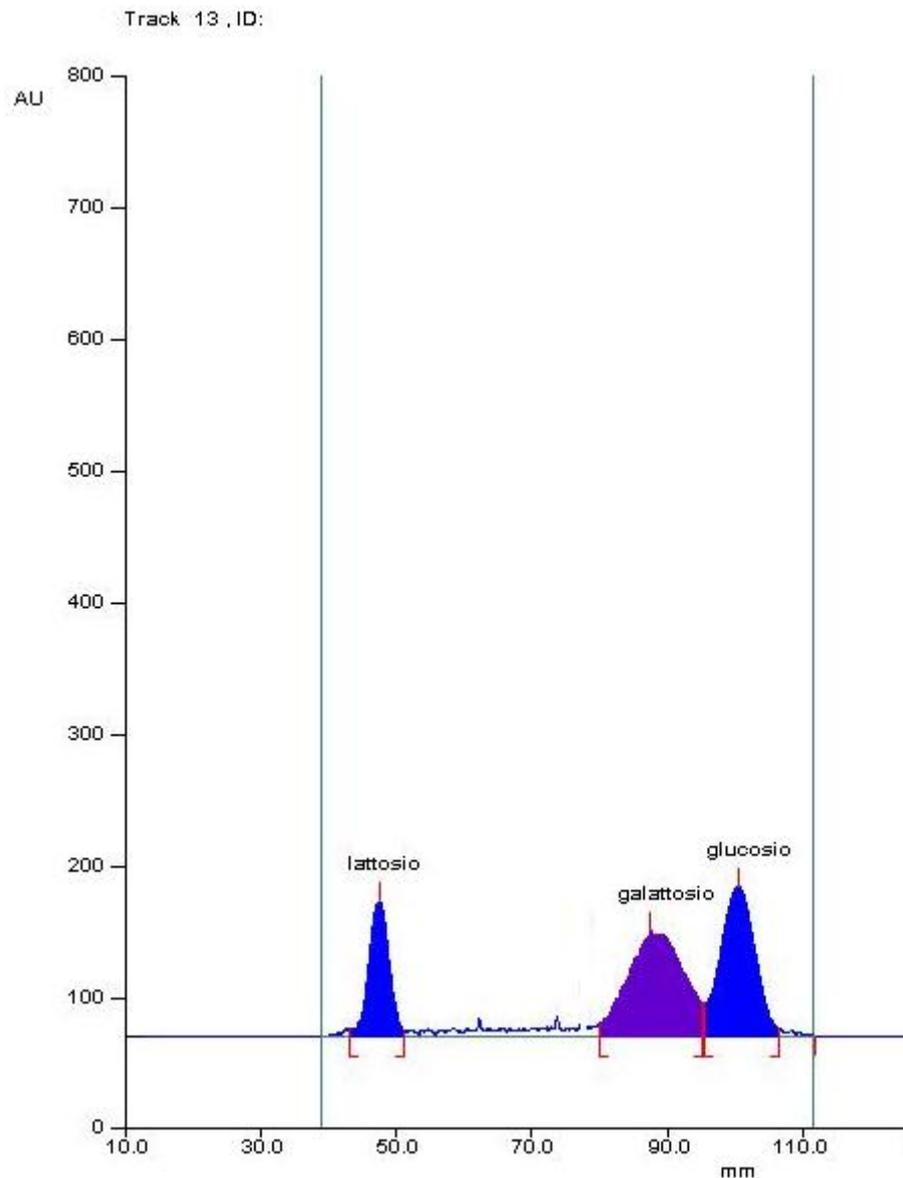


Fig.71 Densitogramma ottenuto per separazione in OPLC

L' AMD, come si diceva prima, è entrata in gioco nel momento in cui si è presentata la necessità di risolvere la miscela nelle sue componenti oligosaccaridiche e, data l'assenza dei relativi standard, in parallelo è stata eseguita l'idrolisi enzimatica dei campioni di fermentazione raccolti.

Tale idrolisi utilizza l'enzima  $\beta$ -galattosidasi da *Aspergillus Oryzae* (soluzione 2000 unità/ml) in ambiente tamponato a pH 6.

Il contenuto di GOS e lattosio nella soluzione da trattare doveva essere compresa tra 0,1 e 0,3 grammi, incubata a 60° C per 30 minuti e per bloccare l' enzima, posta in soluzione di acqua e ghiaccio con aggiunta di acetonitrile.

L'analisi di glucosio e galattosio prodotti per enzimazione dei GOS presenti nei campioni, è stata eseguita in OPLC con le stesse condizioni descritte sopra.

La strategia adottata per la quantificazione del consumo di nutrienti nella fermentazione con GOS quindi è stata quella di riportare a 100 la somma delle altezze di picco ottenute in AMD, calcolarne la concentrazione per ogni singolo componente in ogni campione analizzato attraverso il contenuto di GOS risultante dall'analisi degli idrolizzati per via enzimatica.

A fronte di questo, è stato possibile quantificare il consumo dei nutrienti di questa fermentazione per poterla confrontare anche con le altre.

## **8.2. DERIVATIZZAZIONE**

Le lastre, una volta eluite, sono state immerse per 9 sec in una soluzione di toluene contenente il 2.5 % (v/v) di una soluzione al 2 % (p/v) di acetato basico di piombo(IV) in acido acetico glaciale ed il 2.5 % (v/v) di una soluzione allo 0.2 % (p/v) di 2,7-diclorofluoresceina in etanolo e successivamente scaldate a 105° C per tre minuti.

Tale derivatizzazione è stata eseguita per mezzo dell' apparato di immersione per TLC della Camag.

Le lastre così derivatizzate, vengono lette attraverso il densitometro della Camag TLC SCANNER 3 ad una lunghezza d'onda di 366 nm (lampada al mercurio, filtro cut-off 400 nm) in fluorescenza.

## **RISULTATI**

### **2.3. CRESCITA DI *B. Adolescentis* MB 239 SU GLUCOSIO, GALATTOSIO, LATTOSIO E GOS: modalità batch**

#### **8.3.1. FERMENTAZIONE SU MONOSACCARIDE: GLUCOSIO**

In figura 72 sono riportati gli andamenti delle curve di crescita della biomassa, del consumo di substrato e della produzione degli acidi organici.

Dalla curva di crescita della biomassa si può notare che vi è una lag phase della durata di circa 4 ore seguita da un'unica fase di crescita esponenziale, questa fase dura circa 13 ore ed è caratterizzata da una velocità specifica di crescita  $\mu = 0.22 \text{ h}^{-1}$ .

La coltura successivamente entra in fase stazionaria durante la quale non si osserva più aumento della biomassa ma piuttosto una diminuzione della concentrazione cellulare probabilmente dovuta alla lisi batterica.

Di conseguenza la produzione massima di biomassa si raggiunge alla 17a ora ed è uguale a 2.08 g/l.

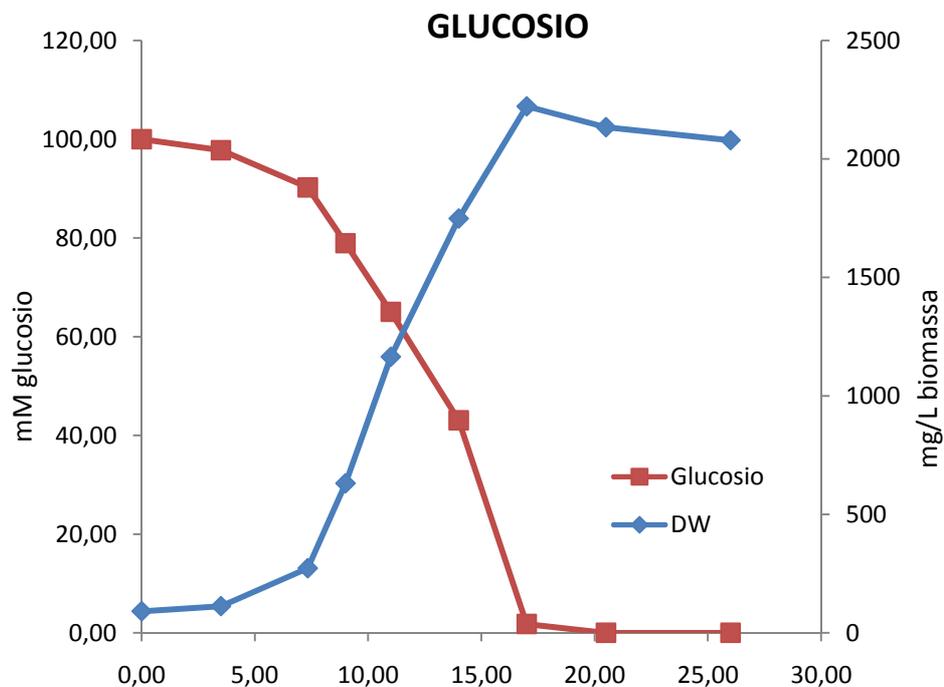
Come è evidenziato dalla sua cinetica di consumo, il substrato viene velocemente consumato e depletato alla fine della fase esponenziale causando evidentemente l'ingresso della coltura in fase stazionaria di crescita.

I prodotti del metabolismo, acido lattico, acido acetico ed etanolo sono tutti prodotti legati alla crescita.

Ciò è supportato dal fatto che il loro accumulo, avviene esclusivamente durante la fase di crescita esponenziale.

Le concentrazioni finali dell'acido lattico, dell'acido acetico e dell'etanolo misurate nel terreno al termine della fermentazione sono rispettivamente 90, 110 e 53 mM.

Non si è riscontrato come prodotto del metabolismo l'acido formico.



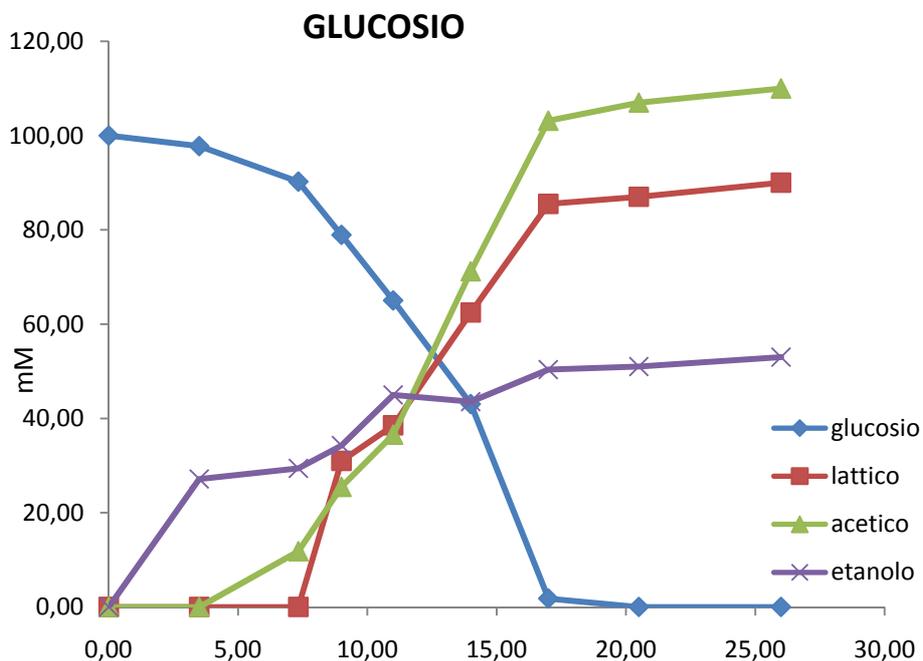


Fig.72 Fermentazione batch di *B. adolescentis* MB 239 su glucosio. a) Curve di crescita e consumo di glucosio. b) Consumo di substrato e accumulo di prodotti.

### 8.3.2. FERMENTAZIONE SU MONOSACCARIDE: GALATTOSIO

In figura sono riportati gli andamenti delle curve di crescita della biomassa, del consumo di substrato e della produzione degli acidi organici.

Dalla curva di crescita della biomassa è possibile evidenziare che non vi è una lag phase ben definita, ma inizia subito la fase esponenziale di crescita caratterizzata da una  $\mu = 0.51 \text{ h}^{-1}$  ed ha una durata complessiva di 9 ore.

Dopo la fase esponenziale la coltura entra in fase stazionaria durante la quale si ha un lieve calo della concentrazione di biomassa dovuto anche in questo caso a lisi cellulare.

La quantità massima di biomassa prodotta è pari a 3.57 g/l.

La concentrazione iniziale di galattosio è tale da produrre 100 mM disponibili nel brodo di fermentazione.

Anche in questo caso il substrato viene utilizzato molto rapidamente e risulta completamente consumato quando il microrganismo è già in fase stazionaria portando non ad un aumento della biomassa ma dei prodotti del metabolismo.

L'analisi dei prodotti rivela che anche in questo caso l'accumulo di acido lattico e acido acetico avviene principalmente durante la crescita esponenziale e rallenta in fase stazionaria.

Le concentrazioni finali dei due acidi prodotti sono: 98 mM per l'acido acetico e 56 mM per l'acido lattico, non viene prodotto invece etanolo in quantità significative.

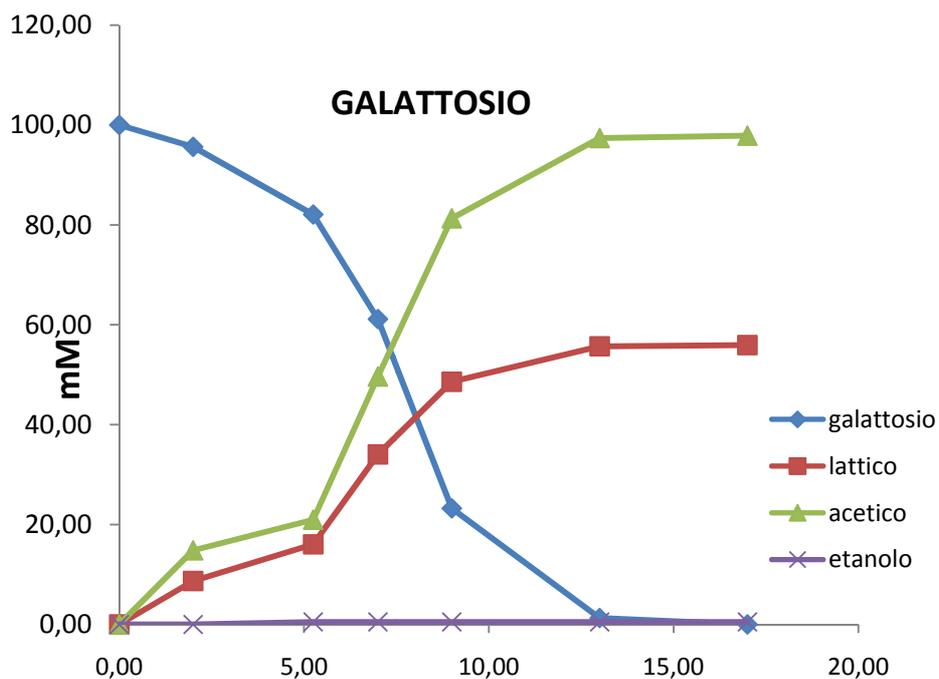
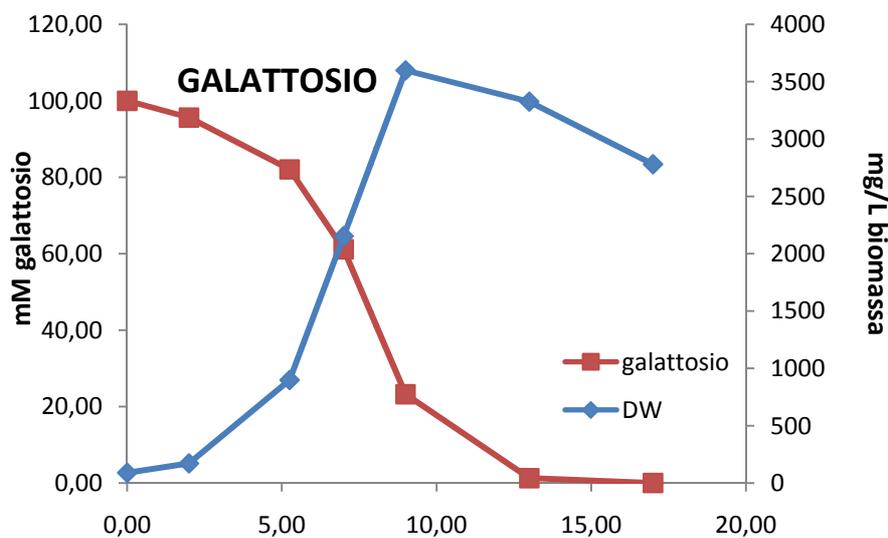


Fig.73 Fermentazione batch di *B. adolescentis* MB 239 su galattosio. a) Curve di crescita e consumo di NaOH 4M. b) Consumo di substrato e accumulo di prodotti.

### 8.3.3. FERMENTAZIONE SU DISACCARIDE: LATTOSIO

L'andamento della curva di crescita della biomassa può essere diviso in fase esponenziale e fase stazionaria dato che non si osserva la lag phase iniziale.

La durata della fase esponenziale è di circa 12 ore e la velocità specifica di crescita è  $\mu = 0.32 \text{ h}^{-1}$ , durante la fase stazionaria la concentrazione della biomassa rimane costante e la quantità massima prodotta è 3.29 g/l.

Anche il lattosio, unico substrato fermentabile, è presente ad una concentrazione di 100 mM.

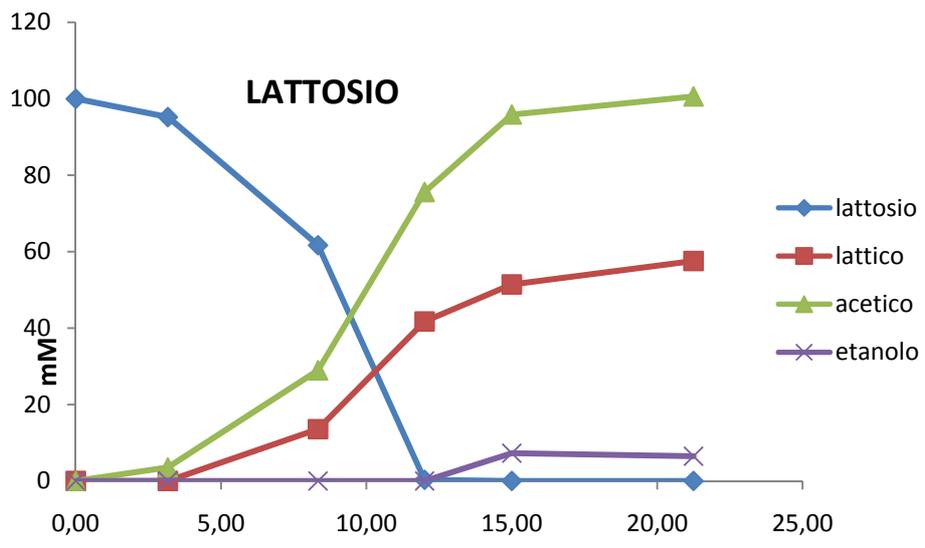
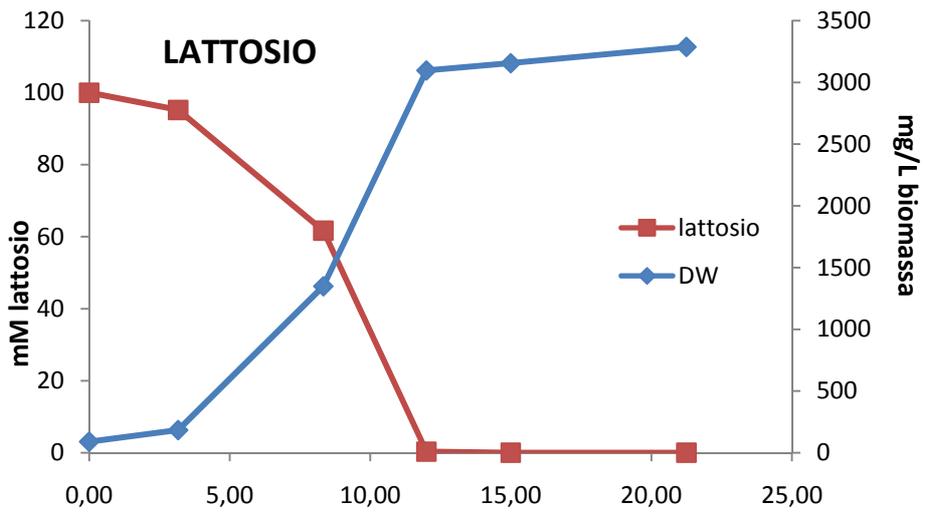
È riscontrabile dalla sua cinetica che il substrato viene rapidamente consumato e risulta completamente depletato dal brodo di fermentazione alla fine della fase esponenziale portando la coltura in fase stazionaria di crescita.

I principali prodotti della fermentazione del lattosio sono acido lattico e acido acetico e anche in questo caso la produzione di etanolo può essere considerata trascurabile (7 mM).

La concentrazione finale dell'acido lattico produce 62 mM mentre quella dell'acido acetico 72 mM.

Durante la fermentazione, nelle sue prime 12 ore, si è osservata la produzione di piccole quantità di glucosio e galattosio.

Quest'ultimo è completamente consumato una volta esaurito il lattosio mentre il glucosio rimane anche se in piccole quantità.



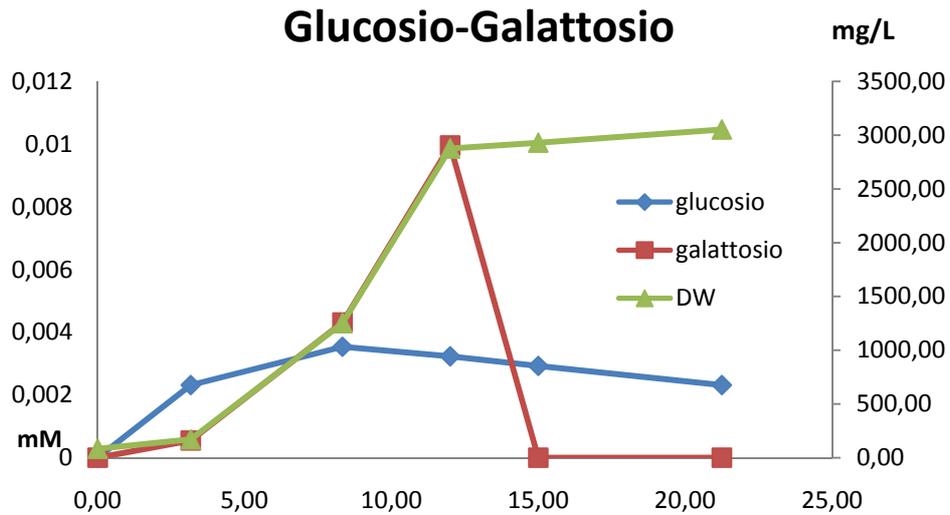


Fig.74 Fermentazione batch di *B. adolescentis* MB 239 su lattosio.

E' interessante notare che i prodotti del metabolismo aumentano anche mentre il batterio si trova in fase stazionaria, l'etanolo è prodotto in maniera più evidente proprio in questo momento della fermentazione.

Questo ricalca un poco quello che accade su glucosio e testimonia anche il fatto che i prodotti di degradazione del nutriente vengono utilizzati per il metabolismo e non per'accrescimento della biomassa.

#### 2.3.4. FERMENTAZIONE SU MISCELA OLIGOSACCARIDICA: GOS

La fermentazione di *B. adolescentis* MB 239 è stata condotta in terreno SM a pH 5.5 esattamente come tutte le altre fermentazioni, addizionato di Vivinal GOS syrup (Borculo Domo).

In figura 75 sono riportati gli andamenti delle curve di crescita della biomassa, del consumo di substrato e della produzione degli acidi organici.

In questa fermentazione il ceppo mostra una velocità di crescita specifica che cala progressivamente, suggerendo differenti cinetiche di consumo per i componenti della miscela.

La sua fase esponenziale è caratterizzata da una velocità specifica di crescita di  $\mu = 0.41 \text{ h}^{-1}$  e della durata di 11.5 ore al termine della quale si ottiene la produzione massima in biomassa che è uguale a 1,4 g/l.

La concentrazione iniziale e complessiva dei GOS nel terreno di coltura è tale da produrre 100 mM.

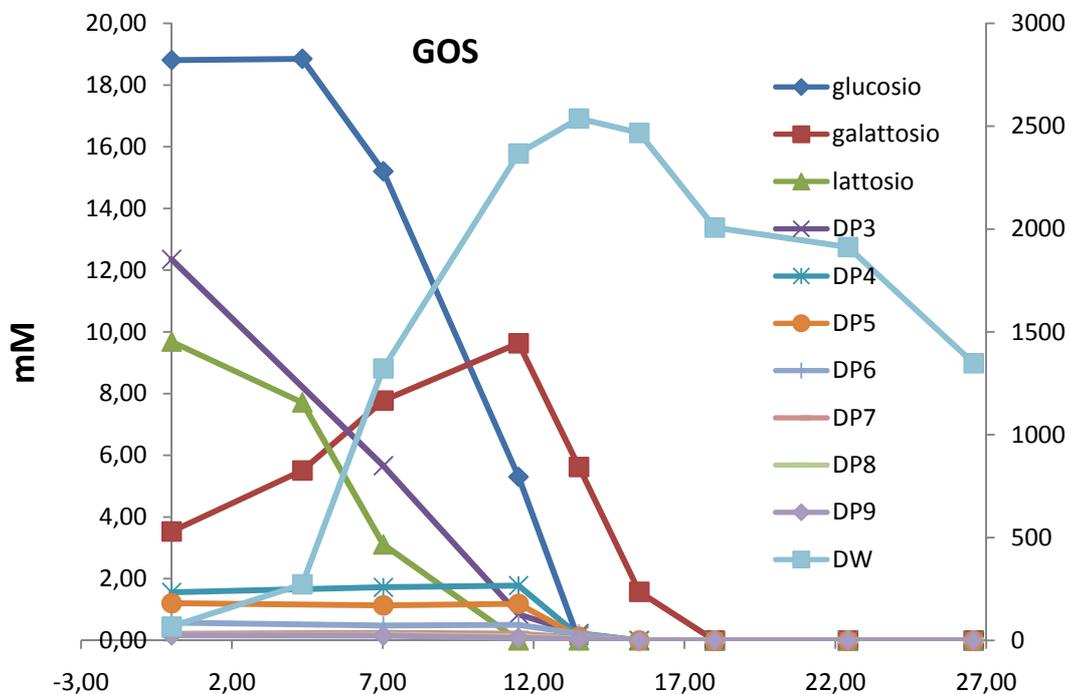
I primi componenti ad essere consumati sono il lattosio ed il corrispondente trisaccaride mentre il glucosio non viene utilizzato se non a partire dalla quinta ora di fermentazione per poi risultare completamente depletati rispettivamente a 12,14 e 15 ore dall'inizio della fermentazione.

Dal quel punto in poi il processo di consumo interessa tutte le fonti carboniose in maniera più o meno marcata.

Nessuno degli oligomeri con DP compreso tra 4 e 9 vengono utilizzati sino alla dodicesima ora di processo, cioè sino a quando tutto il lattosio non viene consumato, dopo di che entro la quindicesima ora vengono utilizzati tutti.

Il consumo di oligosaccaridi produce un ampio accumulo di galattosio, tale da superare la necessità metabolica del microrganismo.

Il completo utilizzo si verifica invece alla fine della fase esponenziale di crescita.



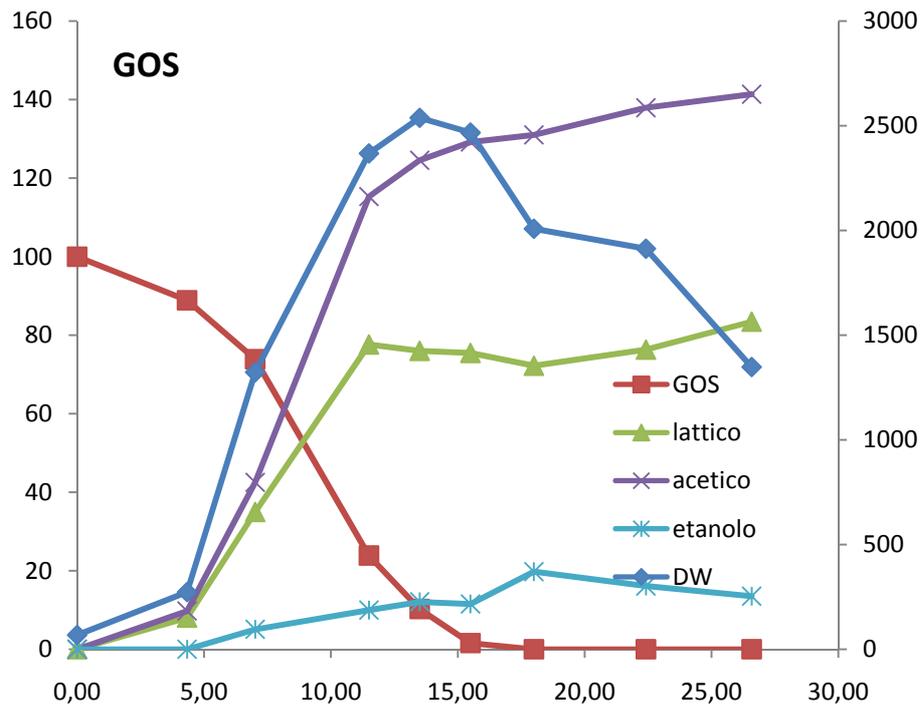


Fig.75 Fermentazioni batch di *B. adolescentis* MB 239 su GOS. a) Curve di crescita della biomassa e nutrienti. b) Consumo di substrato, accumulo di prodotti e crescita della biomassa.

I prodotti del metabolismo sono quelli consueti, acetico e lattico, ma in questo caso particolare anche l'etanolo è presente con un massimo di produzione di 17,8 mM .

La rapidità con cui sono prodotti è massima in concomitanza alla fase esponenziale di crescita ma soprattutto per l'acido acetico c'è un trend positivo di produzione anche in fase stazionaria proprio in concomitanza con il consumo del galattosio, residuo probabile dell'idrolisi dei suoi omologhi superiori.

La stessa analogia si osserva nella fermentazione su galattosio, cioè in fase stazionaria continua ad aumentare l'acido acetico e non il lattico.

## 2.4. PARAMETRI CINETICI

Le velocità specifiche di crescita massime di *B. adolescentis* MB239 sulle diverse fonti di carbonio sono riportate in figura 76.

Si osserva che la  $\mu_{max}$  ( $h^{-1}$ ) più bassa è a carico del solo glucosio mentre lattosio

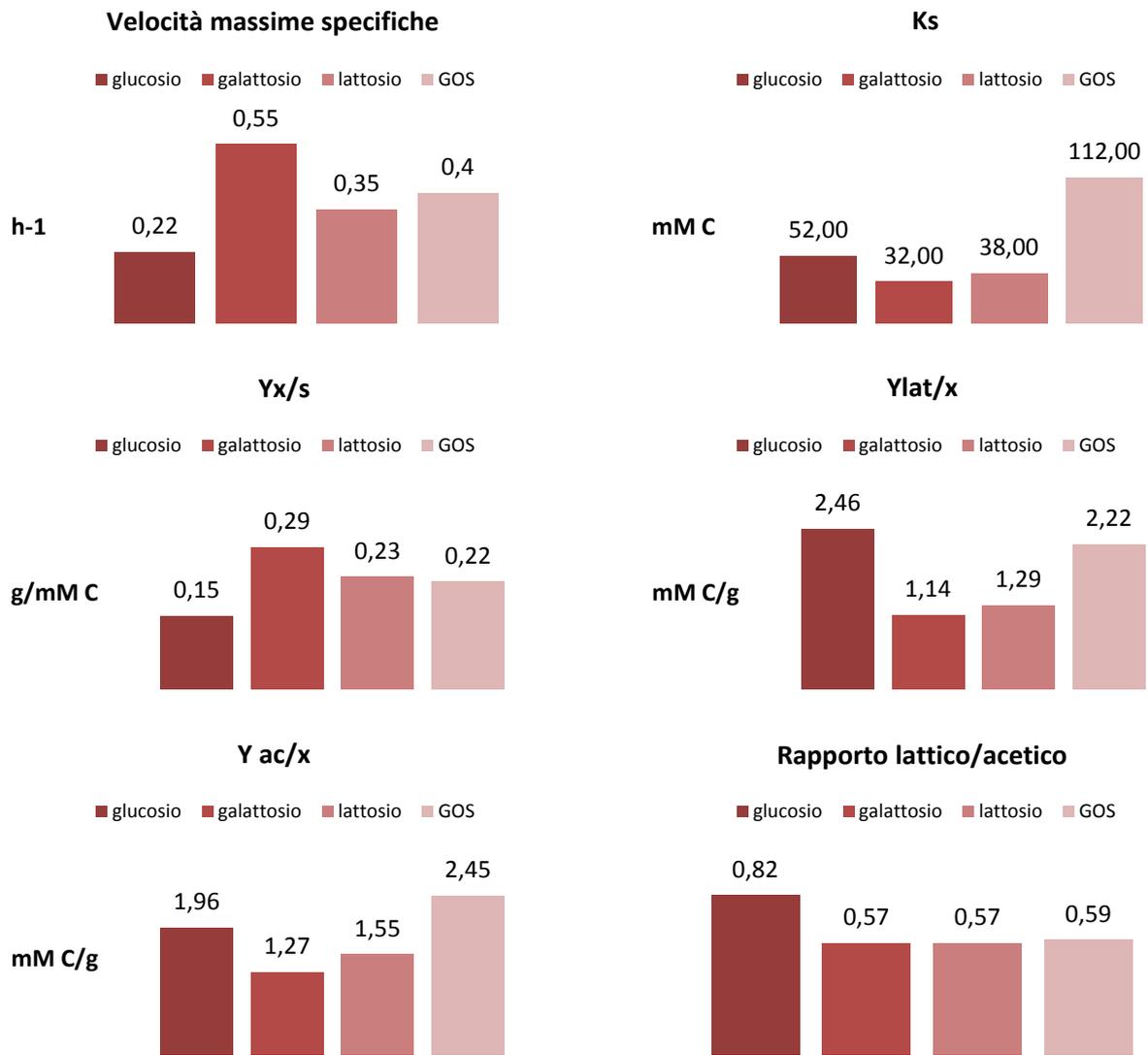


Fig.76 Grafici dei parametri fermentativi di *B. adolescentis* MB 239 su differenti fonti di carbonio

galattosio e GOS hanno valori confrontabili anche se quello superiore è su galattosio.

Le K<sub>s</sub> più basse si registrano per galattosio e lattosio ed il valore più alto è su GOS piuttosto che su glucosio.

Anche le rese in biomassa ripercorrono la stessa gerarchia delle velocità di crescita, in cui il nutriente glucosio risulta quello meno ideale alla crescita, il galattosio quello favorito e gli altri due sono confrontabili.

Importante è notare il trend di produzione degli acidi, l'acido lattico è prodotto in quantità maggiore su e GOS e lo stesso si può dire per l'acido acetico in cui il più alto contenuto si osserva nella fermentazione con GOS.

Per queste fermentazioni è presente anche etanolo, in cui la più abbondante concentrazione si è riscontrata su glucosio e la più bassa su galattosio, mentre l'acido formico non è stato prodotto su nessuno dei nutrienti studiati.

L'unico rapporto tra le quantità di acidi prodotti che si discosta da quello ottimale, dettato dal pathway metabolico dei bifidobatteri è quello su glucosio.

Probabilmente questo sbilancio è generato dalla produzione di etanolo in quantità consistenti andando a discapito della produzione di acido acetico.

## **2.5. ATTIVITA' ENZIMATICHE**

### **2.5.1. ATTIVITA' GALATTOSIL-IDROLASICHE**

Le attività di  $\beta$ -galattosidasi prodotte da *B. adolescentis* MB 239 in presenza di glucosio, galattosio, lattosio e GOS sono state misurate su campioni raccolti da modalità batch con la stessa modalità analitica adottata per le fermentazioni su FOS.

I risultati dipendono solo dalla fonte di carbonio utilizzata.

L'attività di superficie viene determinata sulle cellule intere; l'attività intracellulare è calcolata come differenza sulle determinazioni di cellule intere e permeabilizzate; in ogni sistema fermentativo sul surnatante non si è osservata alcuna attività.

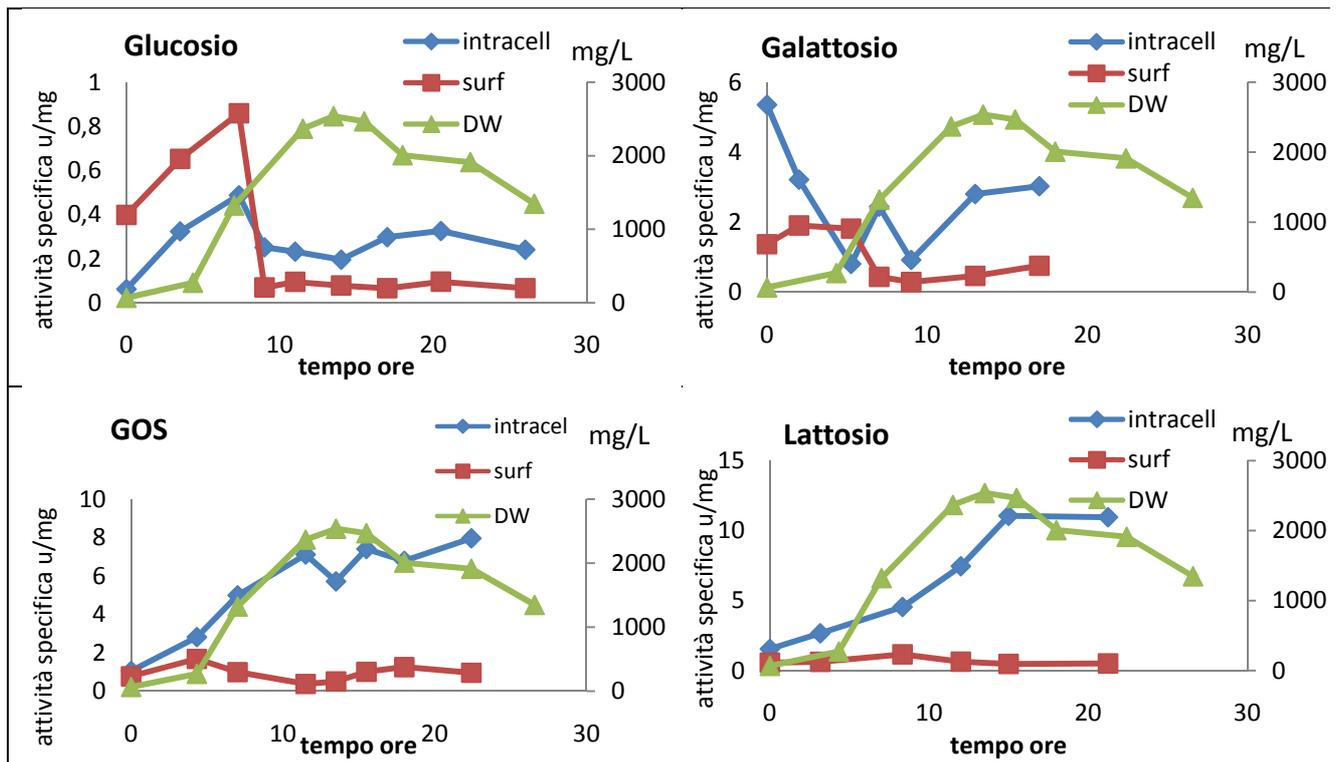


Fig.77 Attività enzimatiche della  $\beta$ -galattosidasi riscontrate durante le prove fermentative

Dagli andamenti riscontrati si osserva che l'attività dell'enzima non è mai al di sopra di 0,9 U/mg su glucosio.

Su galattosio la  $\beta$ -gal intracellulare cala da 5,3 a 0,8 U/mg durante la fase esponenziale per poi arrivare a 3,0 U/mg in fase stazionaria.

Circa 2,0 U/mg è il valore sulla superficie cellulare nelle prime 5 ore di fermentazione seguita da una rapida diminuzione in fase esponenziale ed un leggero aumento in fase stazionaria.

In presenza di lattosio diventa importante l'attività intracellulare che segue perfettamente la crescita della biomassa sino a 10 U/mg mentre l'attività di superficie non è mai oltre 1,1 U/mg.

Nella fermentazione su galatto-oligosaccaridi l'attività intracellulare aumenta in maniera consistente sin da subito, sino ad arrivare a 7,2 U/mg e si osservano i valori più alti rispetto a tutte le fermentazioni studiate.

Come per il caso del galattosio, l'attività idrolitica superficiale è di circa 2,0 U/mg nelle prime 5 ore di fermentazione, e diminuisce in tarda fase esponenziale per tornare a crescere in fase stazionaria.

## 8.5. CONCLUSIONI

Nelle pubblicazioni precedenti a questo lavoro (Mloblei 1998; Perrin 2001; Van der Meulen 2006) in riferimento ai bifidobatteri, i monosaccaridi sono i nutrienti preferiti in pochi casi se confrontati con disaccaridi ed oligosaccaridi.

Riassumendo i dati ottenuti si può concludere dicendo che nei nostri esperimenti il galattosio è il substrato che è più rapidamente consumato se confrontato con lattosio, glucosio e GOS.

La costante di saturazione più alta è nella fermentazione su GOS, in cui i componenti della miscela sono consumati con cinetiche differenti e, probabilmente, i carboidrati con minore affinità e che sono utilizzati alla fine della fase di crescita influenzano in maniera negativa il valore della  $K_s$ .

*Bifidobacterium Adolescentis* MB239 esibisce una grande affinità su oligomeri a basso peso molecolare ( $DP_2$  e  $DP_3$ ) che sono i primi ad essere consumati e gli oligomeri a più alto peso molecolare sono utilizzati contemporaneamente dopo la totale scomparsa di lattosio.

A conferma della diversa cinetica di consumo dei componenti della miscela c'è l'entità della velocità di crescita che assume valori decrescenti in concomitanza all'avanzare delle fermentazione.

Il consumo poliauxico può essere giustificato dalle attività enzimatiche riscontrate.

A differenza di precedenti pubblicazioni (Bruckner 2002; Saier 2002; Saier 1996) in cui i monosaccaridi sono substrati preferiti in una miscela complessa di nutrienti, *B. Adolescentis* non mostra alcuna preferenza al glucosio contenuto nella miscela commerciale utilizzata.

Attraverso le prove fermentative su lattosio e GOS si osserva che il galattosio si accumula nel brodo di coltura, suggerendo che l'idrolisi dei legami  $\beta$ -(1-4) avviene al di fuori della cellula e che la velocità di up-take del monosaccaride è inferiore rispetto a quella di idrolisi.

Infatti il galattosio, nonostante sia il nutriente che possiede la più alta velocità di crescita specifica, non viene utilizzato sino a quando si esauriscono gli oligosaccaridi più complessi.

Per riassumere anche i dati di attività enzimatica si può dire che per la  $\beta$ -galattosidasi extracellulare i valori risultano essere bassi su tutti i nutrienti utilizzati.

Per l'attività intracellulare i suoi valori sono scarsi per la fermentazione su glucosio, mentre su galattosio il valore iniziale riscontrato, che cala drasticamente in fase esponenziale, per poi tornare significativo nella fase stazionaria, sembra indicare che l'attività su galattosio sia fortemente inibita e che compaia solo in assenza del monosaccaride.

Come ci si attendeva, invece, il migliore induttore di  $\beta$ -galattosidasi intracellulare è il lattosio ed alti valori di attività si sono osservati anche su GOS.

Su tutti i nutrienti esiste attività sulla superficie della membrana e quindi questo porta a considerare che l'idrolisi è contemplata sia all'interno che all'esterno del microrganismo.

Degno di nota è il fatto che si osservano differenze nella produzione di etanolo: su galattosio non è presente, basse rese si hanno su lattosio e GOS mentre il glucosio ne produce il più alto valore.

Una osservazione può essere aggiunta per concludere, la produzione di etanolo segue lo stesso trend, considerando le diverse fonti carboniose impiegate, delle più basse velocità di crescita specifiche e delle più basse rese in biomassa.

## CAPITOLO 9

# CRESCITA DI *Bifidobacterium adolescentis* MB 239 SU XOS

Anche nell'ambito di questo studio, le tecniche analitiche per il monitoraggio degli zuccheri e degli acidi, la determinazione della biomassa, la preparazione dei campioni, degli standard, il calcolo dei parametri cinetici delle fermentazioni ed il fermentatore utilizzato sono gli stessi descritti nei capitoli precedenti.

### 9.1. CONDIZIONI DI FERMENTAZIONE

Xilosio ed una miscela commerciale di XOS (xilosio, xilobiosio, xilotriosio, xilotetrosio, xilopentosio, xiloesosio) sono stati utilizzati, per prove fermentative separate, come sola ed unica fonte di carbonio in fermentazioni batch.

La composizione del terreno di coltura e le condizioni di fermentazione ricalcano esattamente quelli delle fermentazioni citate nei capitoli precedenti.

Il pH del terreno è portato a neutralità con NaOH 0.5 M e sterilizzato a 110° C per 30 min. I carboidrati sono sterilizzati separatamente ed aggiunti al terreno alla concentrazione opportuna per il particolare esperimento.

I campioni raccolti sono stati immediatamente raffreddati alla temperatura di 0° C, centrifugati e filtrati (attraverso filtri di cellulosa 0,22 µm) in modo da rimuovere la biomassa.

La composizione del terreno SM è tale da non permettere la crescita dei bifidobatteri in assenza di una fonte carboniosa.

Gli zuccheri oggetto di studio sono aggiunti sempre in quantità di circa 120 mM tali da garantire che la crescita sia limitata dalla fonte di carbonio e non da altri componenti del terreno.

	<b>Ferm.1</b>	<b>Ferm.2</b>
<b>Carboidrati</b>	<b>mM</b>	<b>mM</b>
<b>Xilosio</b>	<b>120</b>	
<b>Xilosio+XOS</b>		<b>120</b>

Tabella 12 Concentrazione espressa in millimoli di fonte carboniosa nelle fermentazioni studiate

## 9.2. DETERMINAZIONE DELLE ATTIVITA' GALATTOSIL-IDROLASICHE

Le attività di  $\beta$ -xilanosidasi è valutata mediante dosaggio spettrofotometrico del nitrofenolo liberato dall'idrolisi di para-nitrofenil  $\beta$ -D-xilopiranoside (pNPX).

Questo composto di sintesi chimica, è il galattoside che viene idrolizzato per l'azione del nostro enzima; una unità di  $\beta$ -xilanosidasi è definita come la quantità di enzima necessaria per liberare 1  $\mu$ mole di nitrofenolo sotto le condizioni di reazione.

L'analisi è effettuata su cellule permeabilizzate e non permeabilizzate, i campioni raccolti vengono centrifugati a 6000 g per 10 minuti ad una temperatura di 0°C.

La biomassa deve essere lavata due volte in Buffer Z (tampone fosfato a pH 7 0,1 M,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  10 mM,  $CaCl_2$  1mM) e concentrata 10 volte rispetto al volume iniziale.

La permeabilizzazione delle cellule si ottiene miscelando 0,5 ml della sospensione cellulare con 0,5 ml di Triton X-100 (5% v/v in Buffer Z) ed incubato a 37°C per 10 minuti.

L'attività specifica è espressa come unità enzimatica per milligrammo di biomassa secca.

## 9.3. ELUIZIONE IN ISOCRATICA DEI CAMPIONI DI FERMENTAZIONE

### 9.3.1. FERMENTAZIONE SU SINGOLO NUTRIENTE: XILOSIO

La tecnica cromatografica HPLC è stata utilizzata per dosare gli acidi organici prodotti nelle colture di *B. adolescentis* MB 239 e lo xilosio nella fermentazione in cui compariva come singolo nutriente.

A tal fine è stata utilizzata una colonna Aminex HPX-87H, ad esclusione di ioni, a temperatura ambiente.

È stata effettuata un'eluizione isocratica utilizzando come eluente acido solforico 0.01 M, preparato con acqua deionizzata filtrata con filtri da 0.45  $\mu\text{m}$ , con velocità di flusso 0.6 ml/min.

L'iniezione dei campioni è stata effettuata mediante un sampling loop che permette un volume di iniezione di 20  $\mu\text{l}$  ed un'alta riproducibilità dei volumi iniettati, i campioni sono stati iniettati tal quali od eventualmente diluiti e per ognuno di essi sono state eseguite iniezioni in triplo. L'identificazione è stata fatta attraverso un rivelatore ad indice di rifrazione.

La difficoltà analitica è dovuta alla sovrapposizione dei picchi dello xilosio e dell'acido ascorbico, presente nel brodo di fermentazione per mantenere l'ambiente in anaerobiosi.

L'accorgimento analitico è stato quindi quello di costruire le curve di taratura in presenza dell'acido ascorbico in concentrazione pari a quella dei campioni analizzati.

Di ausilio è stato il fatto che, nella fermentazione studiata, l'acido ascorbico non è stato consumato e quindi la sua concentrazione in ogni campione corrispondeva esattamente a quella iniziale.

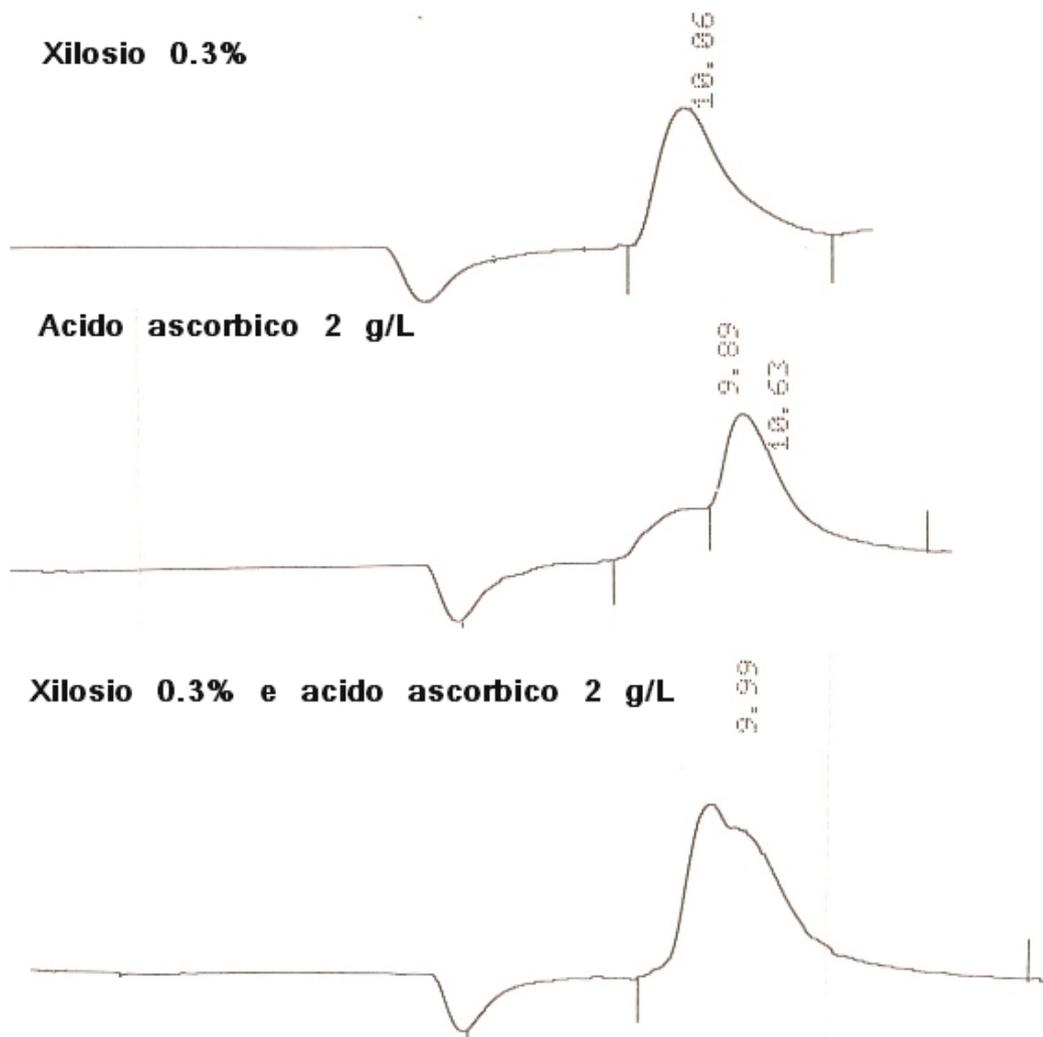


Fig.78 Cromatogrammi ottenuti durante l'analisi dello xilosio residuo nei brodi di fermentazione

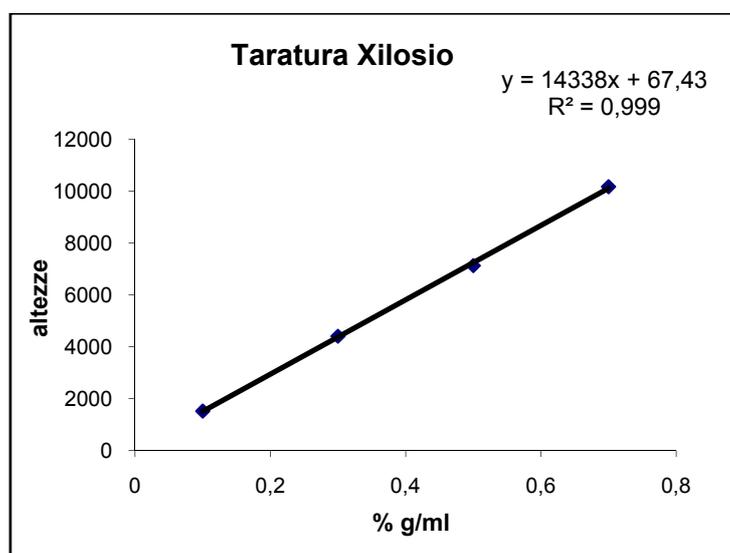


Fig.79 Curva di taratura in HPLC di xilosio con acido ascorbico presente in concentrazione costante pari alla concentrazione dello stesso nel brodo di coltura

### 9.3.2. FERMENTAZIONE SU MISCELA DI MONO ED OLIGOSACCARIDI: XOS

La miscela di XOS utilizzati è stata prodotta per via enzimatica, perciò presenta una eterogeneità di prodotti non certificata in maniera precisa.

Dal punto di vista analitico, quindi, c'era la necessità di separare tutti i componenti della miscela e di identificarli.

La cromatografia planare HPTLC, attraverso il sistema cromatografico di fase mobile e stazionaria di seguito descritti, ha permesso una risoluzione di tutti i componenti e quindi di seguire in maniera puntuale il consumo dei nutrienti durante la fermentazione ad opera dei bifidobatteri.

Il sistema cromatografico impiegato è il seguente: (Reiffova K.; Nemcova R. 2006)

Strato sottile: lastra di silice 254F con strato sottile ad alte prestazioni.

Criterio di eluizione: eluente Butanolo/etanolo/acqua (5/3/2)

Corsa a 7 centimetri dal bordo della lastra, con quattro eluizioni successive.

Asciugatura della lastra con phon per 15 minuti circa tra un'eluizione e l'altra.

La camera di eluizione deve essere saturata per 30 minuti prima di introdurre la lastra.

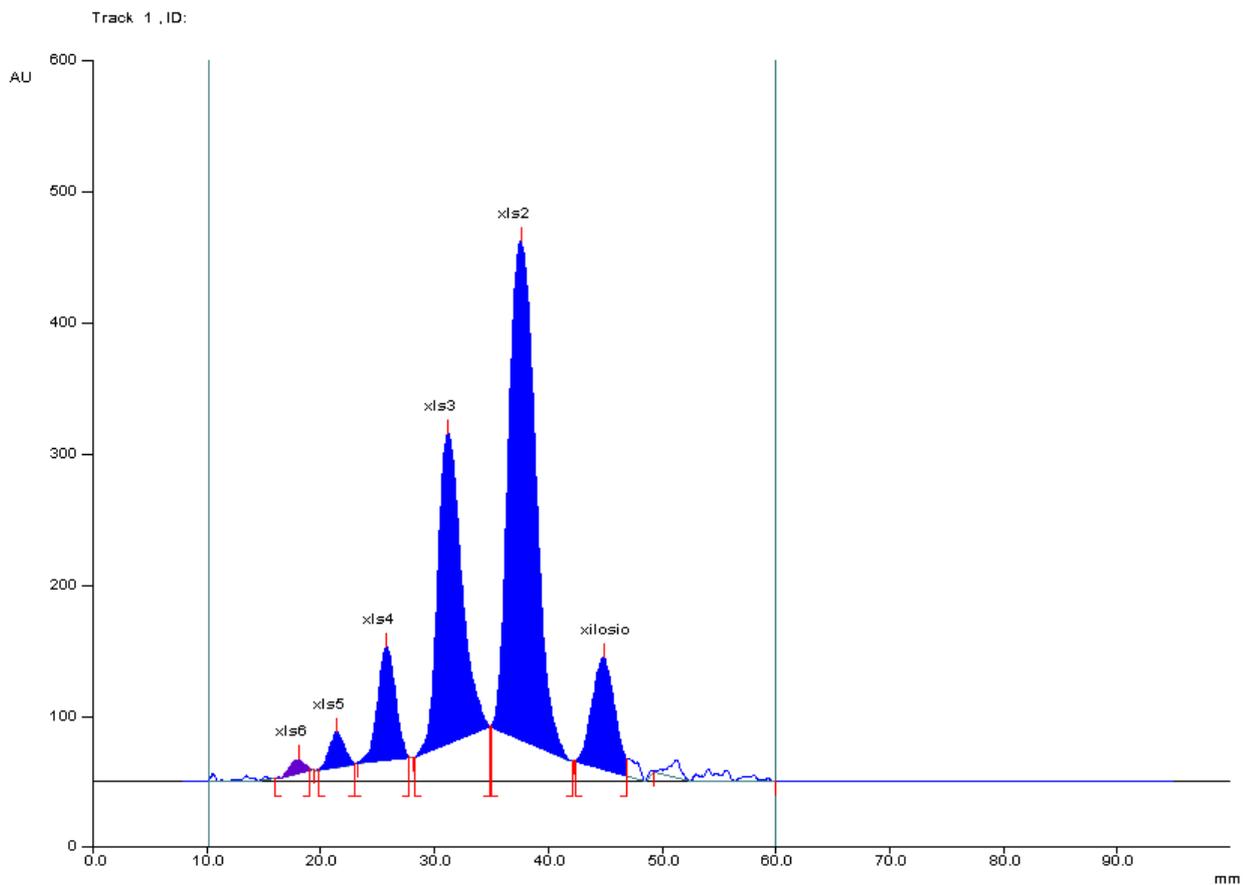
Lo standard utilizzato, come detto in precedenza, è una miscela di origine enzimatica di XOS (Co. Farmaceutica Milanese C.F.M.), ma non è certificato il contenuto in termini di concentrazione e tipo di oligosaccaridi, quindi dopo la prima eluizione è stata fatta una indagine per capire se esisteva una relazione ritenzione-struttura dei componenti.

I modelli ritenzione-struttura, per eluizioni isocratiche, si applicano per verificare l'esistenza di una correlazione lineare tra il numero di unità ripetute all'interno della molecola e la distanza di migrazione.

Il diagramma riportato di seguito dimostra che tutti i componenti della miscela sono polimeri lineari che differiscono per una unità di xilosio.

Contemporaneamente si è verificata la bontà separativa delle quattro eluizioni consigliate perché per esperienza sapevamo che eluizioni successive sulla stessa lastra peggiorano la qualità del fondo in termini di rumore e di linea di base.

Di seguito si riportano i densitogrammi delle quattro eluizioni



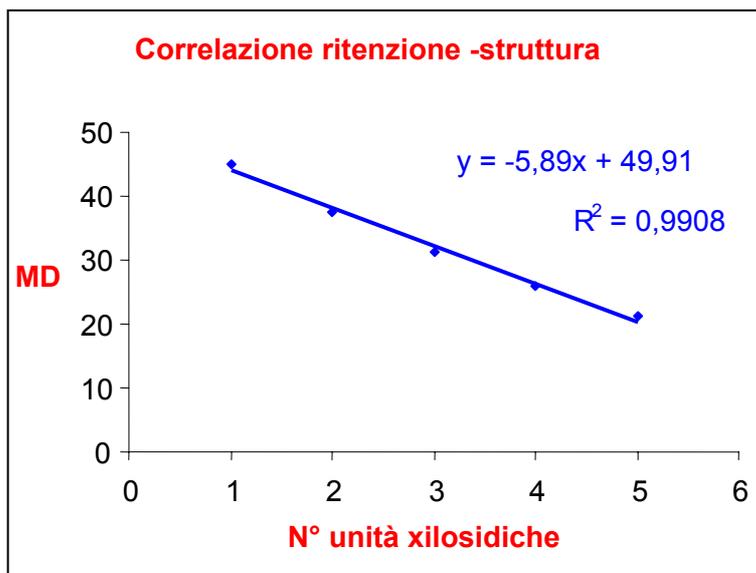
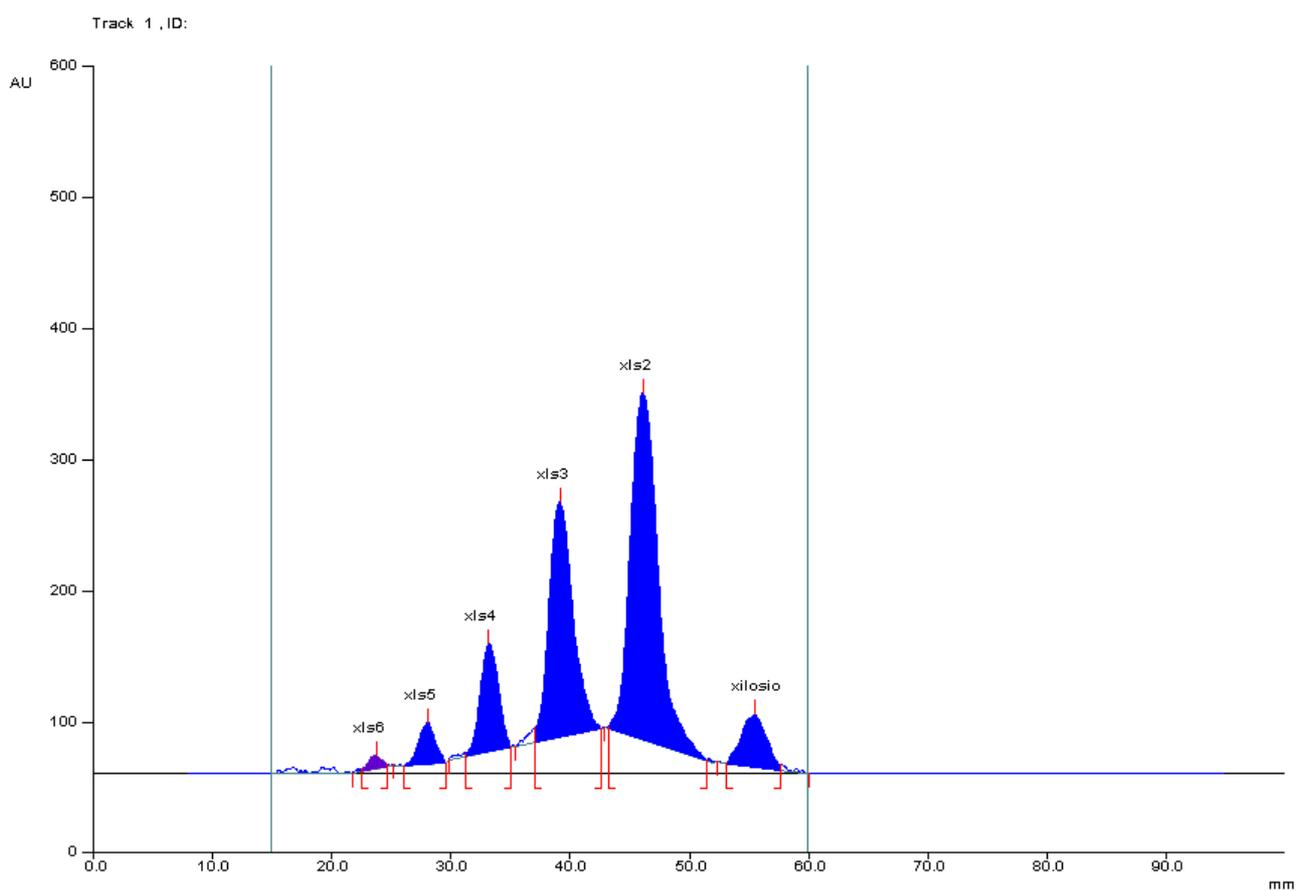
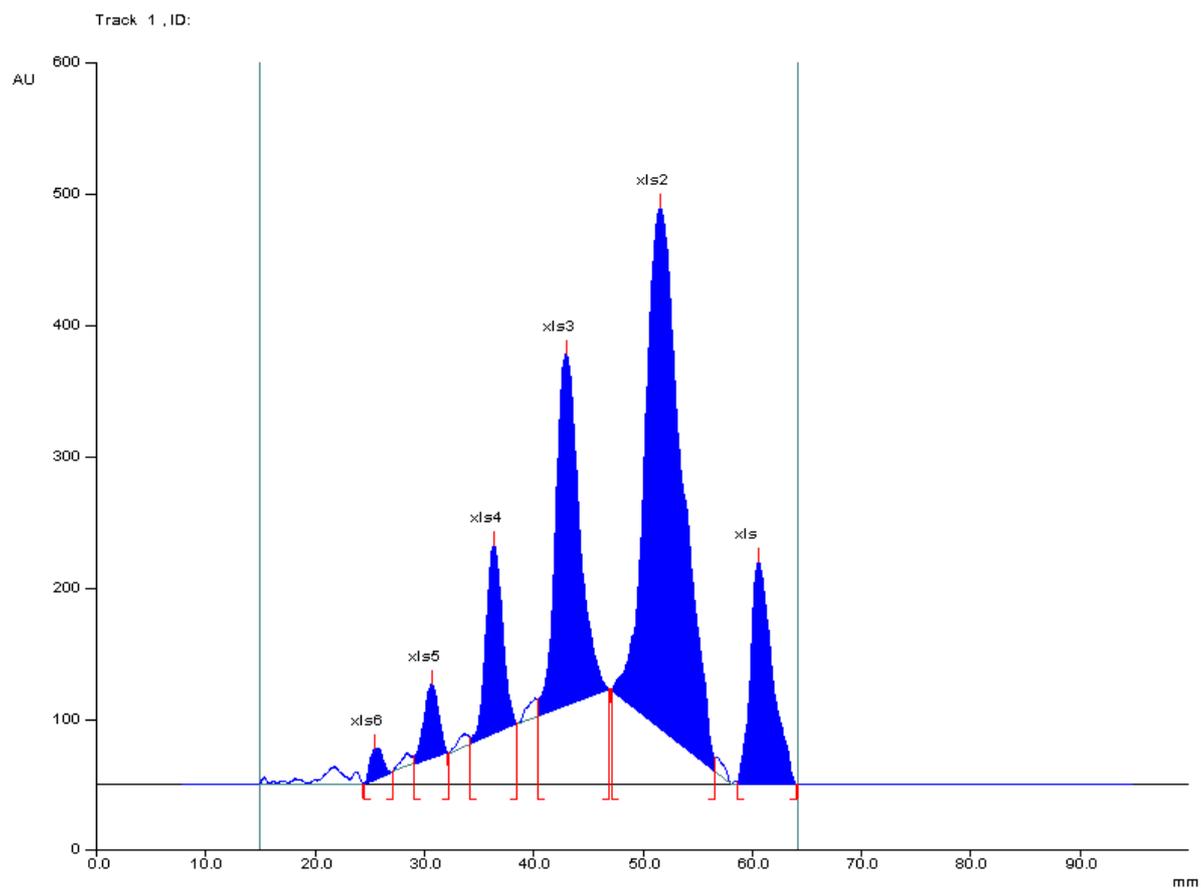


Fig.80 Densitogramma relativo alla prima eluizione con il diagramma ritenzione-struttura delle sostanze separate





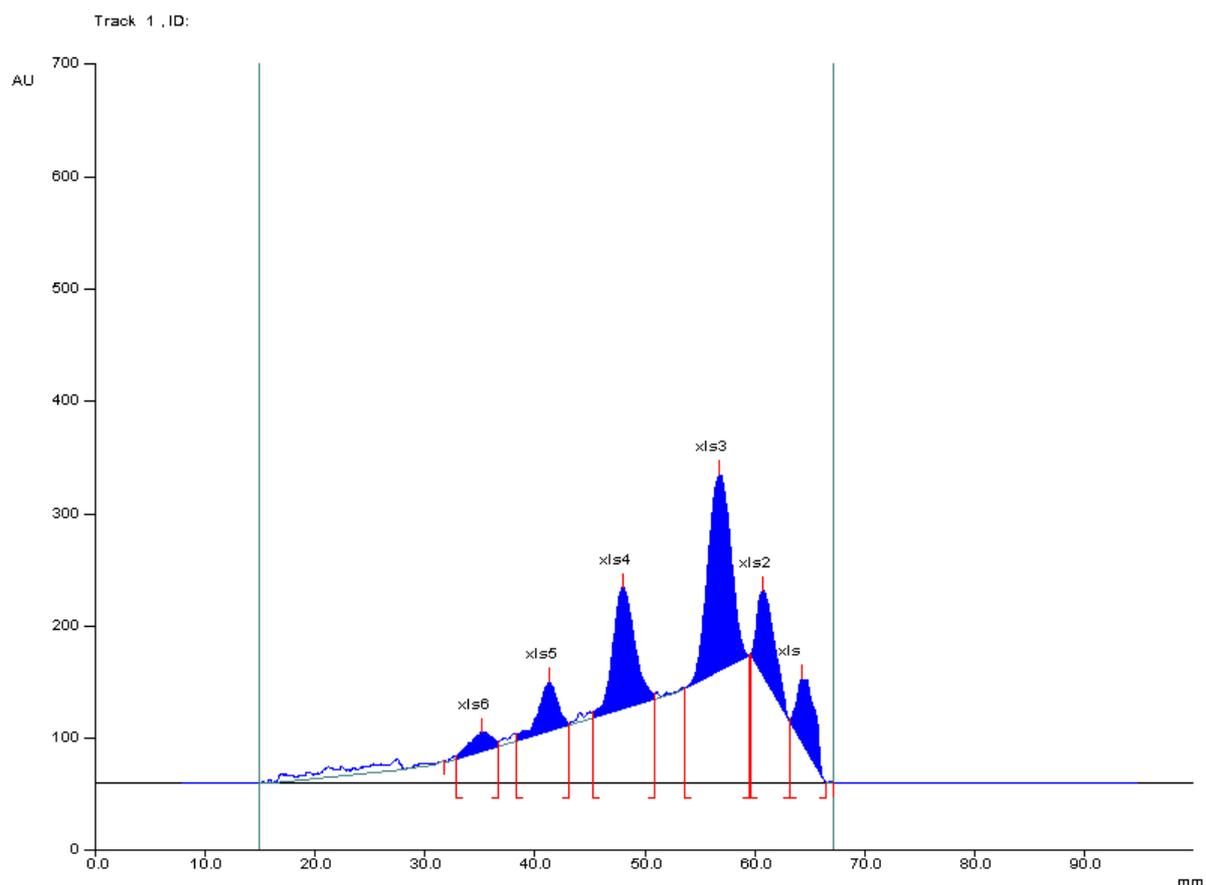


Fig.81 Densitogrammi relativi alle quattro eluizioni successive effettuate per la separazione degli XOS.

In base ai risultati ottenuti, considerando la bontà della separazione, l'intensità di risposta delle sostanze (a parità di concentrazione) e la bontà della linea di base, si è ritenuto che la separazione migliore si ottiene con due sole eluizioni.

Inoltre, la correlazione ritenzione-struttura, riscontrata nel nostro caso testimonia il fatto che, la miscela di XOS utilizzata nella fermentazione, è di polimeri lineari di xilosio a basso peso molecolare a partire da xilosio sino a xiloesosio.

A differenza dei galatto-oligosaccaridi, in commercio si trovano gli standard puri di xilo-oligosaccaridi fino al DP6 quindi è stato possibile monitorare quantitativamente il consumo dei nutrienti durante la fermentazione.

Per dosare gli acidi organici prodotti invece ci siamo serviti ancora della tecnica HPLC, sostituendo però la precedente colonna con una che, sebbene non permettesse di separare lo xilosio come la precedente (ma di questo non ci importava dal momento che

lo dosavamo già in HPTLC insieme agli XOS) ci ha consentito di dimezzare i tempi di analisi.

Le condizioni operative adottate sono:

- colonna Hamilton Anion Exclusion PRP-X300, 250x4.1 mm
- eluente: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.002 M, preparato con acqua deionizzata e filtrata con filtri da 0.45 μm
- eluizione in isocratica
- velocità di flusso: 1.7 ml/min
- sampling loop: 20 μl
- rivelatore ad indice di rifrazione
- temperatura ambiente

Anche qui i campioni sono stati iniettati tal quali o diluiti se necessario e per ognuno di essi sono state eseguite iniezioni in triplo.

#### **9.4. DERIVATIZZAZIONE**

La miscela utilizzata in questo caso è così composta (Jork pag.189):

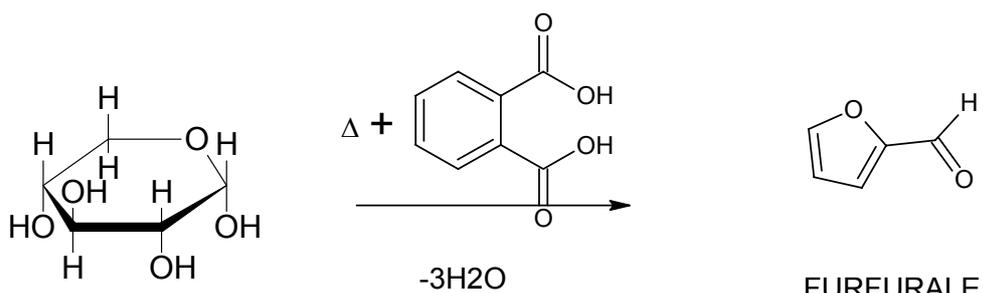
0,9 ml di anilina (Riedel de Haen) e 1,66 gr di acido ftalico per cromatografia (Carlo Erba) sono sciolti in 100 ml di acetone suprapuro (Merck).

Lo strato sottile, una volta asciugato dalla fase mobile, è immerso nella soluzione derivatizzante per 5 secondi, asciugata in posizione verticale e trattata a 120° C in stufa per 20 minuti.

Lettura a 370 nm in riflettanza.

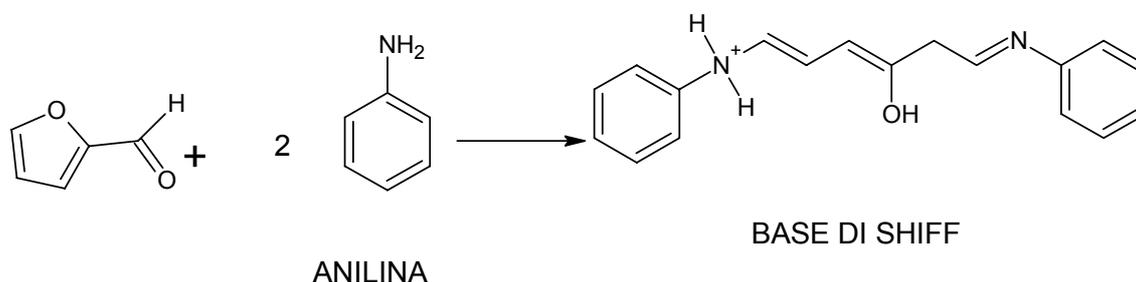
I derivati furfuralici degli zuccheri si generano quando questi sono sottoposti ad elevate temperature, questi condensano con l'anilina a basi di Schiff.

## REAZIONE DI DERIVATIZZAZIONE



XYLOSIO

FURFURALE



ANILINA

BASE DI SHIFF

## RISULTATI

### 9.5. CRESCITA DI *B. ADOLESCENTIS* MB239 SU DIVERSE FONTI DI CARBONIO: modalità batch

#### 9.5.1. FERMENTAZIONE SU XILOSIO

In figura 82 sono riportati gli andamenti delle curve di crescita della biomassa, del consumo di substrato e della produzione degli acidi organici.

Dalla curva di crescita della biomassa si può notare che non vi è una fase lag ma che il bifidobatterio inizia a crescere sin dall'inoculo.

La fase di crescita esponenziale interessa circa 10 ore di fermentazione ed è caratterizzata da una velocità specifica di crescita  $\mu = 0.30 \text{ h}^{-1}$ .

La coltura successivamente rallenta ed entra in fase stazionaria dopo circa 12 ore di fermentazione, quando si osserva la massima concentrazione di biomassa.

Durante la fase stazionaria non si osserva più aumento della biomassa ma piuttosto una diminuzione della concentrazione cellulare intorno alla trentesima ora, di conseguenza la produzione massima di biomassa risulta essere raggiunta alla 16a ora fermentativa ed è uguale a 3.14 g/l.

Dopo 12 ore il substrato è ancora presente nel brodo di coltura e si esaurisce in prossimità della sedicesima ora.

I prodotti del metabolismo, acido lattico ed acido acetico sono tutti legati alla crescita. Ciò è supportato dal fatto che il loro aumento, avviene esclusivamente durante la fase di crescita.

L'acido acetico è prodotto in quantità leggermente superiore rispetto all'acido lattico mentre acido formico e/o etanolo non sono tra i prodotti del metabolismo del bifidobatterio su xilosio.

Le concentrazioni finali dell'acido lattico e dell'acido acetico misurate nel terreno al termine della fermentazione sono rispettivamente 87 e 98 mM.

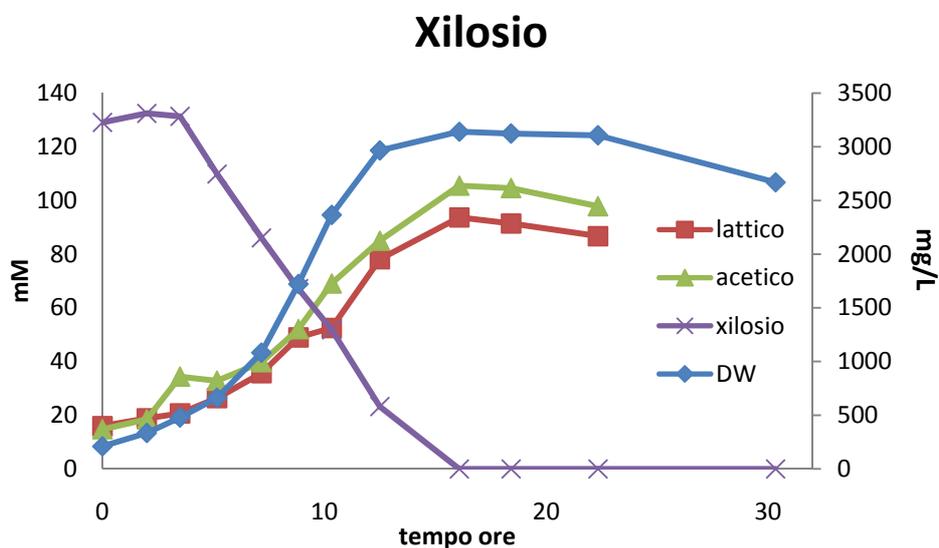


Fig.81 Fermentazione batch di *B. adolescentis* MB 239 su xilosio

### 9.5.2. FERMENTAZIONE SU XOS

Come già riportato, il dosaggio dei nutrienti per questa fermentazione è stato possibile grazie a standard puri commerciali con i quali sono state costruite le curve di taratura dei sei oligomeri di cui riportiamo un densitogramma.

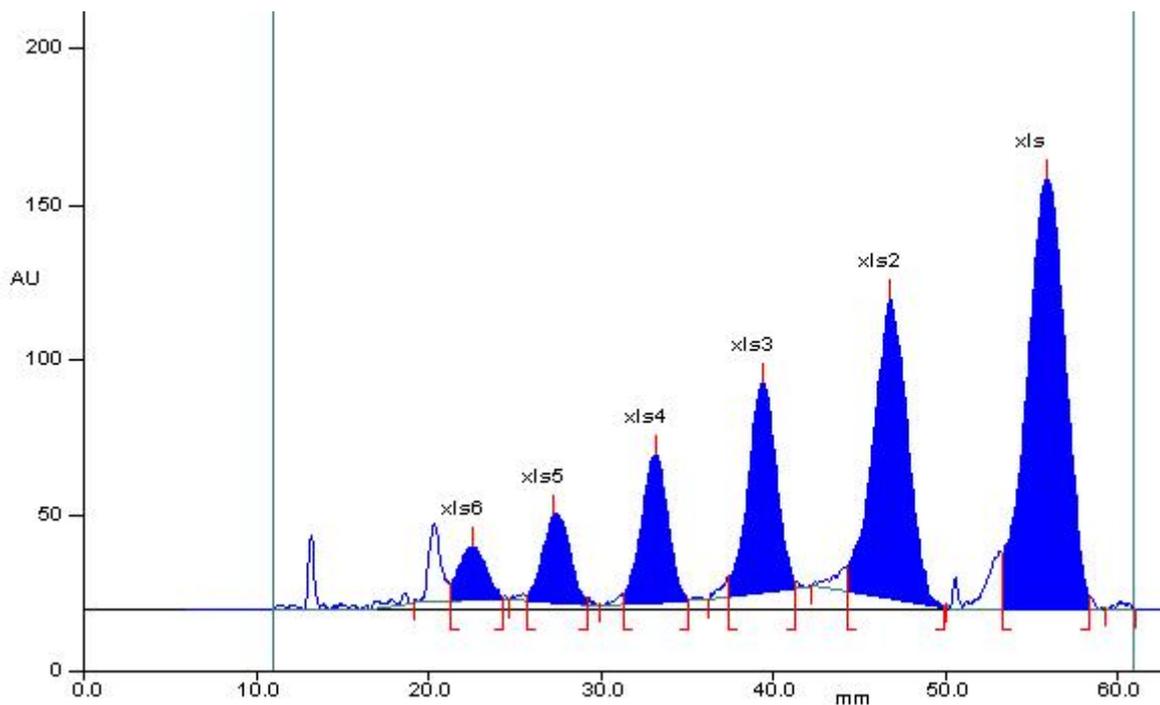
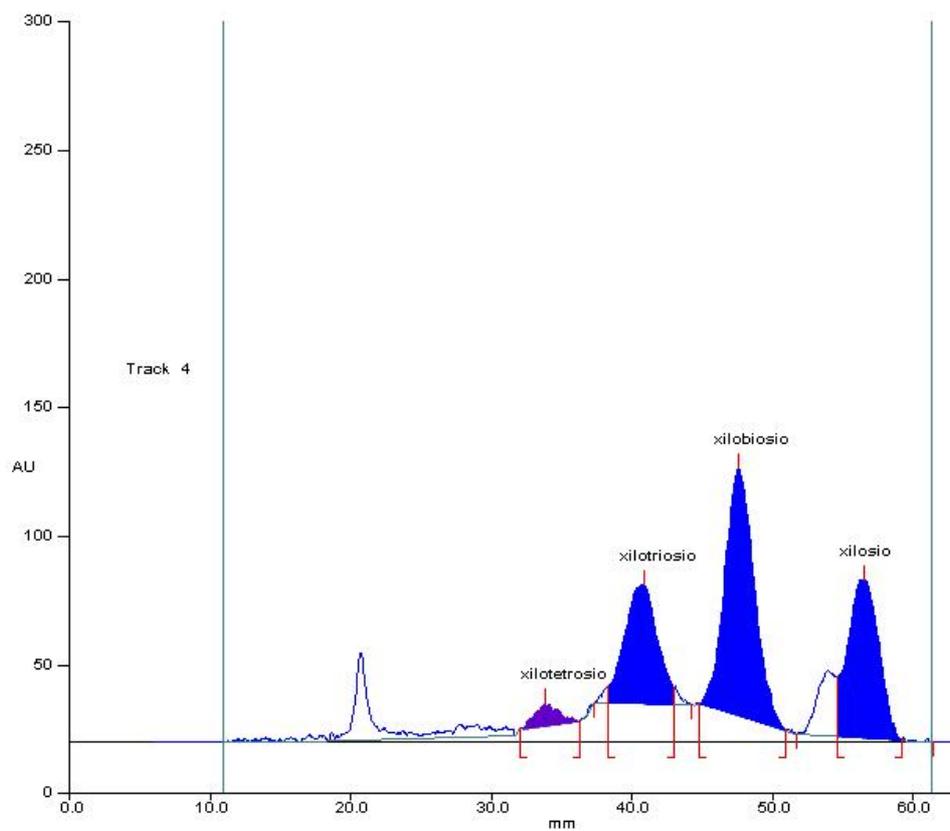
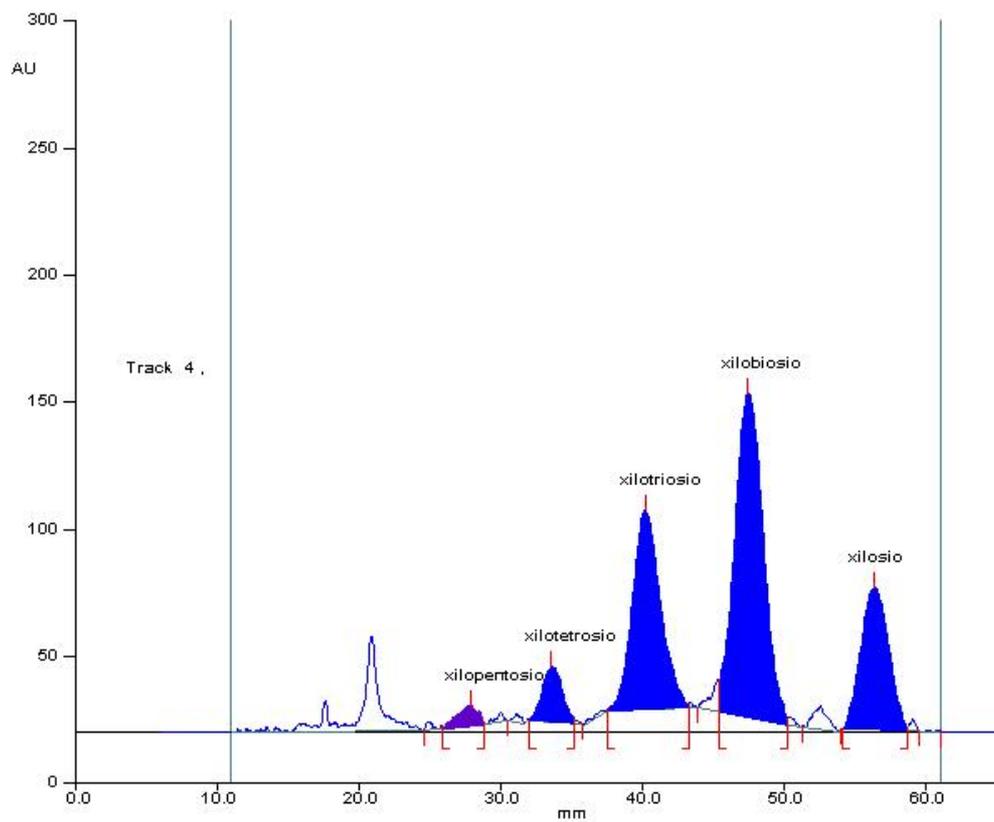


Fig.83 Miscela di xilo-oligosaccaridi standard: soluzione 20 ppm 3  $\mu$ l depositati

Si riportano tre densitogrammi relativi a campioni di inizio, metà e fine fermentazione per dare esempio del consumo progressivo dei nutrienti.

Il primo densitogramma si riferisce al  $T_0$ , campione di inizio fermentazione che è stato diluito 1/100 e depositati 2  $\mu$ l.

Nel secondo densitogramma invece si ha, con la stessa diluizione, il  $T_6$  che è un campione relativo alla fase esponenziale di crescita del bifidobatterio e nell'ultimo, è riportato il  $T_{14}$  che rappresenta la tarda fase stazionaria.



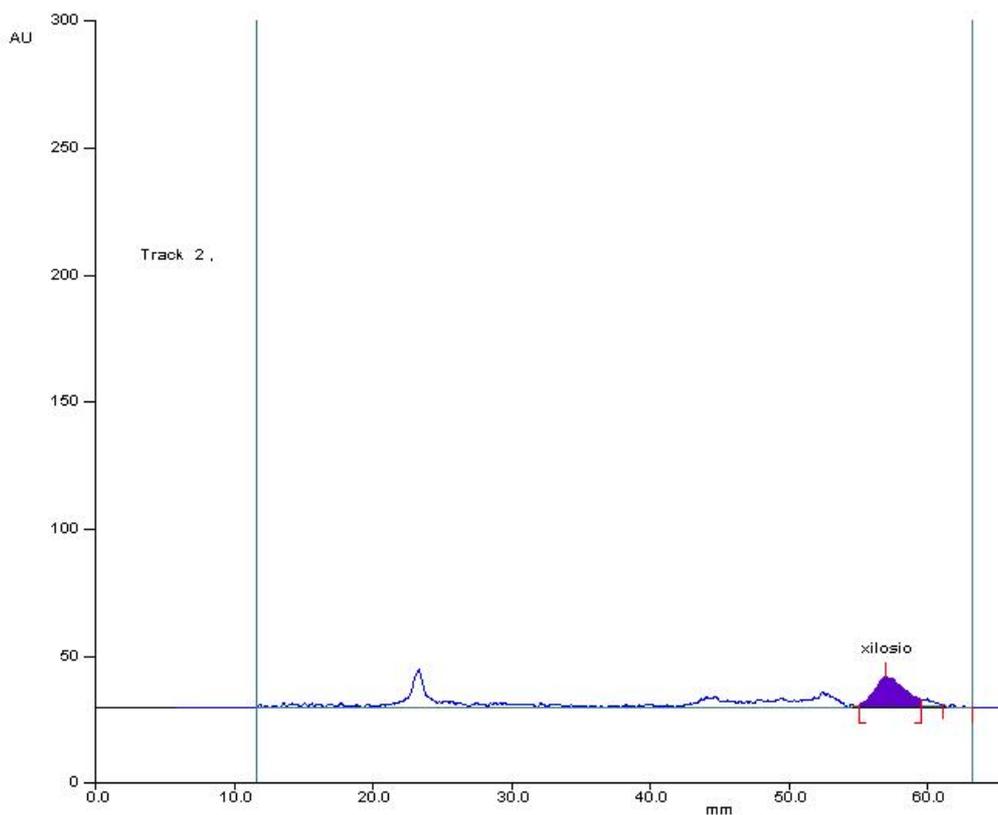


Fig.84 Densitogrammi relativi ai campioni prelevati per il monitoraggio degli XOS nella fermentazione con *B. adolescentis* MB239

La fermentazione di *B. adolescentis* MB 239 è stata condotta in terreno SM a pH 5.5, addizionato di XOS (C.F.M.).

In figura 85 sono riportati gli andamenti delle curve di crescita della biomassa, del consumo di substrato e della produzione degli acidi organici.

Anche in questa fermentazione non si osserva fase lag.

La fase di crescita esponenziale interessa circa dodici ore e sono ancora presenti tracce di xilotriosio (5 mM) e xilosio (13 mM) quando *B. adolescentis* MB239 entra in fase stazionaria.

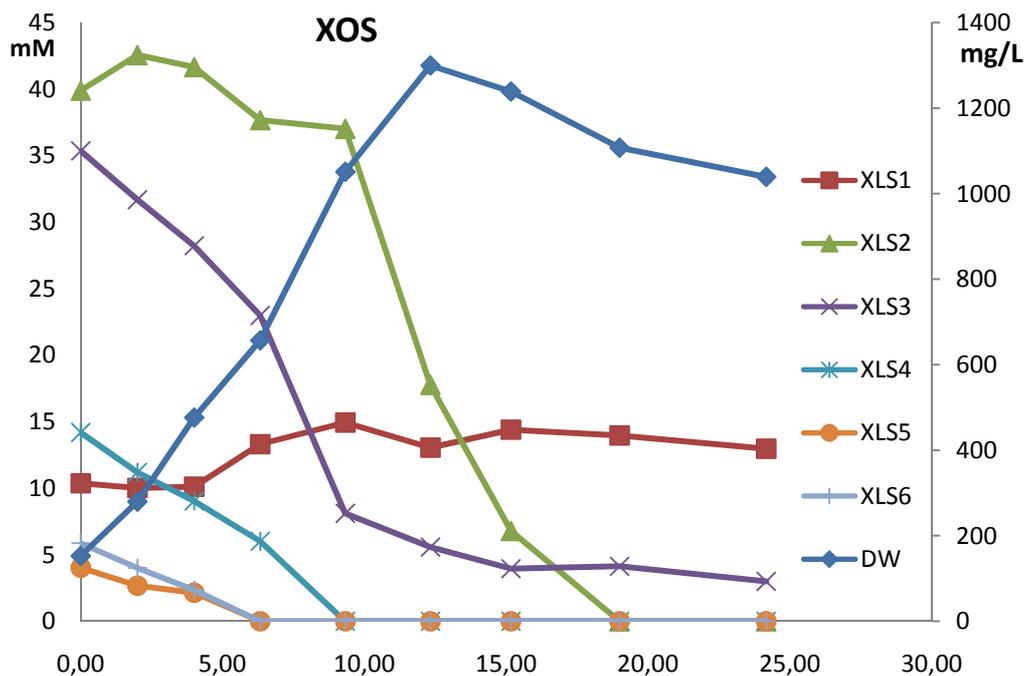


Fig.85 Fermentazione batch su XOS con andamento del consumo dei nutrienti

Inoltre possiamo notare che nelle prime sei ore di fermentazione il consumo degli XOS con  $DP \geq 3$  avviene simultaneamente, mentre le concentrazioni di xilosio e xilobiosio rimangono quasi inalterate fino alla decima ora circa. Lo xilobiosio inizia a decrescere successivamente alla decima ora quando gli omologhi a più alto peso molecolare sono in esaurimento ed è completamente consumato intorno alla ventesima.

Lo xilosio, invece, aumenta tra la quarta e la decima ora ed è presente anche a fine fermentazione, nonostante il terreno di coltura non sia limitato dalla concentrazione di fonte di carbonio.

I prodotti metabolici, acido lattico ed acido acetico, aumentano durante la fase esponenziale di crescita (figura 86).

Nella fase stazionaria notiamo che continuano ad aumentare fino all'esaurimento dello xilobiosio (ventesima ora) e successivamente si mantengono pressoché costanti. Anche in questo caso acido formico e etanolo non sono prodotti.

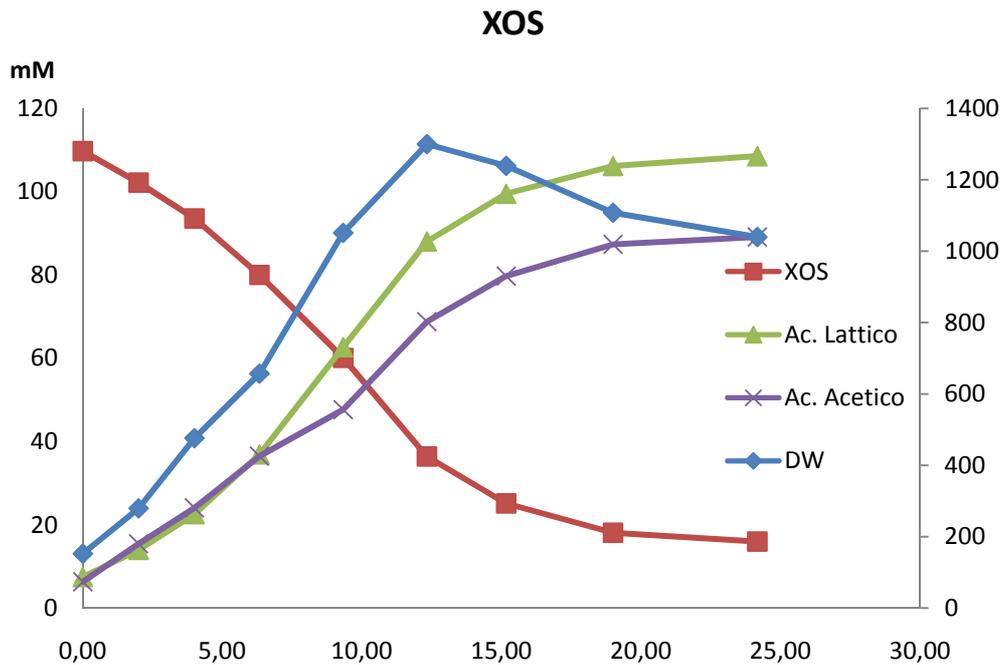


Fig.86 Fermentazione batch su XOS con andamento del consumo dei nutrienti a confronto con la produzione di biomassa e dei metaboliti

## 11.6. PARAMETRI CINETICI

Le velocità specifiche di crescita massime di *B. adolescentis* MB239 sulle diverse fonti di carbonio sono riportate in figura 87.

Notiamo che i parametri cinetici fondamentali, la velocità massima specifica di crescita  $\mu_{max}$  e la costante di saturazione  $K_s$ , non differiscono in maniera significativa nelle due fermentazioni.

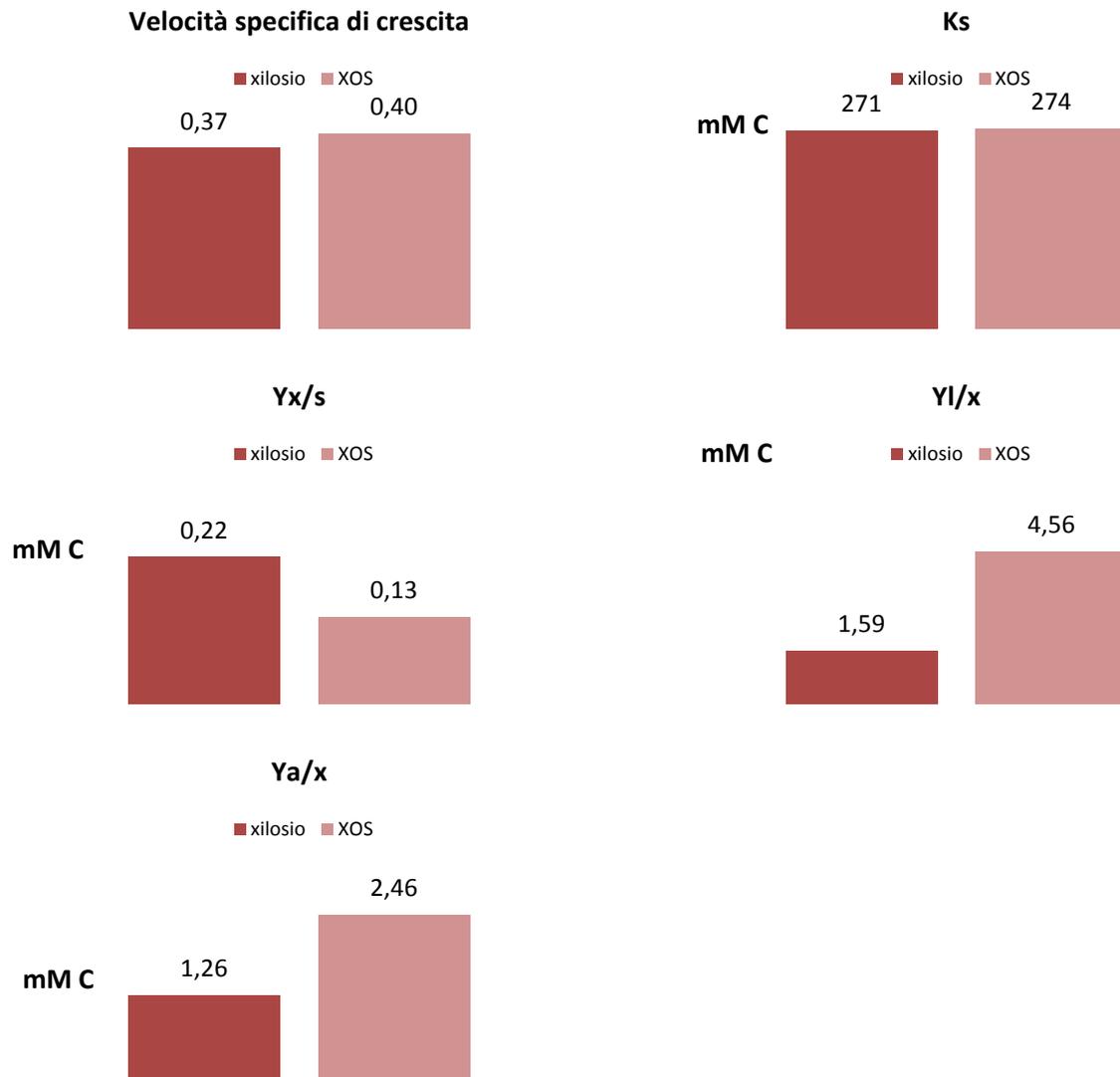


Fig.87 Grafici relativi ai parametri fermentativi di *B. adolescentis* MB239 su differenti fonti di carbonio

La resa di biomassa rispetto al substrato  $Y_{x/s}$  nella fermentazione su solo xilosio risulta circa doppia rispetto alla fermentazione su XOS, mentre le rese dei prodotti rispetto alla biomassa  $Y_{a/x}$  e  $Y_{l/x}$  seguono un trend opposto.

Le rese relative alla fermentazione su xilosio come nutriente singolo sono tutte inferiori a quelle ottenute su XOS a parte la resa in biomassa.

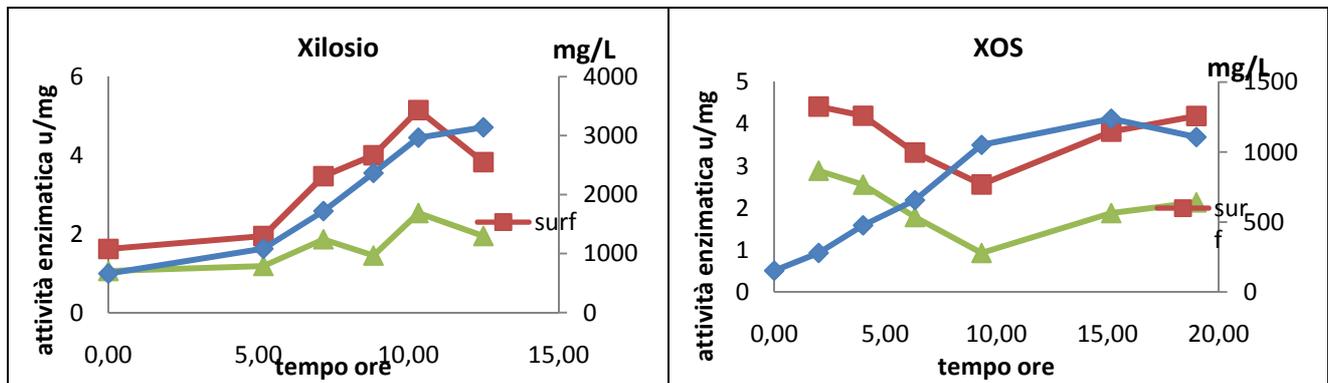
## 11.7. ATTIVITA' ENZIMATICHE

### 11.7.1. ATTIVITA' XILOSIL-IDROLASICHE

Le attività di  $\beta$ -xilosidasi prodotte da *B. adolescentis* MB 239 in presenza di glucosio, galattosio, lattosio e GOS sono state misurate su campioni raccolti da modalità batch con la stessa modalità di campionamento adottata per le fermentazioni su FOS e GOS.

I risultati dipendono solo dalla fonte di carbonio utilizzata.

L'attività di superficie viene determinata sulle cellule intere; l'attività intracellulare è calcolata come differenza sulle determinazioni di cellule intere e permeabilizzate.



Riguardo le attività enzimatiche nella fermentazione con xilosio, notiamo che il valore di  $\beta$ -xilanosidasi intracellulare rimane sempre su valori inferiori (mai sopra 2.5 U/mg) rispetto all'attività di superficie (fino a un massimo di 5.1 U/mg).

La  $\beta$ -xilanosidasi di superficie, e in minore misura quella intracellulare, aumentano durante la crescita esponenziale e sono massime all'inizio della fase stazionaria.

Riguardo l'attività enzimatica, nella fermentazione su XOS notiamo ancora che il contributo più importante è di superficie.

Entrambi gli andamenti sono simili e subiscono un calo durante la crescita microbica, raggiungendo il valore minimo alla decima ora.

Successivamente le attività tornano a crescere ed a ristabilirsi in fase stazionaria.

## 9.8. CONCLUSIONI

Nella fermentazione su xilosio il substrato è completamente consumato alla sedicesima ora benché la fine della fase esponenziale si collochi circa quattro ore prima.

Il nutriente consumato in questo intervallo non ha dunque più come conseguenza l'ulteriore accrescimento della biomassa – cioè nel bilancio tra produzione e morte della biomassa si va in pareggio – ma solamente dei prodotti metabolici.

Nella fermentazione su XOS sembrerebbe che gli oligomeri a più alto peso molecolare (fino allo xilotriosio) siano tutti consumati più rapidamente di xilobiosio e xilotriosio, ma in realtà ciò non può essere valutato distintamente dal momento che la degradazione dei primi di per sé può avere come conseguenza la produzione di oligomeri a più basso peso molecolare.

La fermentazione su solo xilosio, riguardo la velocità specifica massima di crescita e la costante di saturazione, ha mostrato valori del tutto paragonabili a quelli degli XOS: ciò ci induce a pensare che *B. Adolescentis* MB 239 abbia una analoga affinità per le due tipologie di substrato.

In questo contesto si può a maggior ragione pensare che i differenti andamenti di xilosio e xilobiosio rispetto agli altri oligomeri risultino complessivamente da un bilancio tra produzione e consumo.

Dal momento che lo xilosio è un substrato normalmente non reperibile per i bifidobatteri nel loro ambiente naturale, mentre gli XOS sì, questi ultimi risultano più interessanti in campo alimentare come potenziali componenti di alimenti destinati alla cura e al benessere dell'ospite.

In base al pathway metabolico di *B. adolescentis* MB 239 il rapporto dei prodotti acido acetico/acido lattico dovrebbe essere 1,5:1 sugli esosi e 1:1 sui pentosi.

Su xilosio si è osservato un rapporto acido acetico/acido lattico non unitario ma che si discosta di poco.

Lo scostamento dal rapporto 1:1 è maggiore su XOS, rispetto allo xilosio ed è addirittura invertito, cioè è l'acido lattico ad essere prodotto in quantità superiore.

Coerentemente, sugli XOS si produce una maggiore quantità di metaboliti a scapito della crescita della biomassa.

Per quanto riguarda le attività di  $\beta$ -xilanosidasi, gli andamenti descritti indicano lo xilosio come nutriente non inibitore di tale enzima e probabilmente, dato che il substrato non necessita di idrolisi, la quantità di enzima riscontrata rispecchia l'attività standard del microrganismo.

Nella fermentazione su XOS notiamo ancora il contributo più importante di attività enzimatica sulla superficie cellulare, però entrambi gli andamenti sono simili e subiscono un calo, raggiungendo un valore minimo alla decima ora, forse correlato al completo consumo degli XOS a più alto peso molecolare. Successivamente le attività tornano a crescere quando il microrganismo è già in fase stazionaria fino a ripristinare la quantità di enzima presente inizialmente.

La localizzazione degli enzimi idrolitici (intracellulare o superficiale) indica, come già osservato per altri oligosaccaridi (Amaretti A. et al. 2006), due strategie per la loro fermentazione da parte di *B. Adolescentis* MB 239.

La prima implica il trasporto degli oligosaccaridi nella cellula e la successiva idrolisi ad opera degli enzimi intracellulari.

Alternativamente, e principalmente a giudicare dalla maggiore attività enzimatica, l'idrolisi degli oligosaccaridi avviene esternamente, sulla superficie cellulare e i monomeri sono poi trasportati al suo interno.

## **CONCLUSIONI FINALI**

Il genere *Bifidobacterium* è costituito da batteri saccarolitici anaerobi ed è uno dei più importanti gruppi microbici intestinali.

La presenza e l'attività dei bifidobatteri nel colon è associata ad effetti benefici sulla salute dell'uomo, per cui i bifidobatteri sono comunemente considerati probiotici e trovano largo impiego come supplementi di prodotti alimentari e farmaceutici.

A causa della digestione e dell'assorbimento nel tratto gastro-intestinale alto, il colon è un ambiente povero in mono- e disaccaridi.

Quindi gli oligo- e polisaccaridi presenti nel colon e sfuggiti all'idrolisi causata dagli enzimi digestivi umani (Salminen et al. 1998), rappresentano la principale fonte di carbonio fermentabile per i bifidobatteri.

I Bifidobatteri giocano un ruolo fondamentale nella fermentazione di questi carboidrati in quanto dotati di un'ampia gamma di glicosil-idrolasi che idrolizzano gli oligo- ed i polisaccaridi nei loro costituenti monomerici che sono incorporati nello shunt fruttosio-6-fosfato, per arrivare a produrre acidi a corta catena (acido lattico ed acido acetico).

Questo lavoro di dottorato è stato svolto allo scopo di indagare sul metabolismo fermentativo di *Bifidobacterium adolescentis* MB239 su fruttoligosaccaridi, galattoligosaccaridi e xiloligosaccaridi.

Pochi sono, allo stato attuale, i lavori pubblicati che trattano brodi di cultura di miscele complesse di nutrienti ed a questo scopo è stata utilizzata la moderna cromatografia planare come valida tecnica analitica in grado di monitorare il consumo di ogni singolo componente.

Per ogni miscela è stata messa a punto una metodica analitica mirata, in cui la fase stazionaria, gli eluenti, la modalità di separazione e la derivatizzazione sono stati studiati appositamente per fornire la possibilità di identificazione e di quantificazione degli oligosaccaridi.

Per i FOS è stato svolto il lavoro più impegnativo perché è stata applicata una separazione in gradiente.

Il primo step di lavoro riguarda il calcolo di tutti i parametri necessari alla eluizione, quindi una volta trovata la giusta miscela eluente, attraverso le prove isocratiche si sono determinate: il corretto intervallo delle soluzioni eluenti in grado di separare tutti i componenti della miscela, le costanti di velocità e i tempi di eluizione da impostare in AMD per l'eluizione voluta.

Allo stesso modo è stato ottimizzato lo step di derivatizzazione in termini di reagente, tempo di reazione e tempo di asciugatura dello strato sottile.

Con le stesse modalità di carattere sperimentale, è stata studiata la separazione dei GOS, ma oltre a questo si è reso necessario un lavoro ulteriore dettato dal fatto che il tipo di oligomeri della miscela e la loro concentrazione non erano certificate.

Il tentativo di trovare una relazione tra la ritenzione e la struttura dei galattoligosaccaridi ha fornito la possibilità di identificarli in termini di polimeri lineari che differiscono per il numero di unità di xilosio nella catena.

La separazione di XOS, invece, dal punto di vista della messa a punto del metodo, è stata la più semplice, perché trovata in bibliografia e quindi abbiamo apportato solamente un piccolo adattamento al metodo analitico dettato dall'esperienza maturata nei nostri laboratori, che ha permesso un risparmio in termini di tempo di analisi ed una migliore qualità dei densitogrammi.

Anche per gli XOS si è resa necessaria la verifica della relazione ritenzione-struttura perché anche in questo caso nel certificato dello standard era riportata solamente la percentuale totale degli oligomeri e non i relativi componenti e le rispettive concentrazioni.

La miscela commerciale di XOS comprende gli oligomeri compresi tra xilosio e xiloesiosio. Se intrecciamo i dati analitici della cromatografia planare, quelli in HPLC dei prodotti del metabolismo, le attività enzimatiche e la possibilità di avere le costanti cinetiche e le rese attraverso la modalità chemostato ed un metodo matematico di calcolo abbiamo la possibilità di comprendere la dinamica di utilizzo di queste tre tipologie di prebiotici con uno dei microrganismi più abbondanti dell'intestino.

I FOS hanno velocità di crescita specifica dello stesso ordine di grandezza di quelle riscontrate su lattosio e galattosio, che in ogni prova hanno sempre confermato una buona affinità con il bifido batterio in questione.

Il consumo di questi oligomeri è simultaneo, con una sola fase esponenziale e lattosio e raffiniosio sono i nutrienti che più rapidamente risultano consumati indicando che tra gli oligomeri sono preferiti quelli a più basso grado di polimerizzazione.

Le attività enzimatiche sono presenti, anche se con valori differenti, sia all'esterno che all'interno delle cellule giustificando la possibilità di idrolizzare i nutrienti sia prima che dopo up-take.

Per i GOS, la grande affinità risulta per gli oligomeri con grado di polimerizzazione 2 e 3 che sono i primi ad essere consumati e gli oligomeri a più alto peso molecolare sono utilizzati contemporaneamente dopo la totale scomparsa di lattosio.

Le attività enzimatiche più importanti risultano a livello intracellulare, quindi in linea di massima, si considera questo come il meccanismo più importante di utilizzo delle fonti carboniose, anche se non si esclude l'attività di membrana che è comunque osservata anche se a più bassi valori.

Gli XOS hanno velocità di crescita specifica e  $K_s$  confrontabili con quelle su xilosio e gli oligomeri più rapidamente consumati sembrano quelli con un Grado di polimerizzazione  $DP \geq 3$  e l'attività enzimatica che prevale è quella di superficie.

Quindi, a fronte di tutti i risultati ottenuti in questo lavoro si può concludere che *Bifidobacterium adolescentis* MB239, non solo dimostra una buona interazione sui prebiotici FOS, GOS e XOS, ma ne dà una visione più ampia, discriminando il consumo puntuale di tutti i componenti delle miscele di fonte carboniosa, osservando le differenti distribuzioni dei flussi carboniosi attraverso il pathway e determinando le attività enzimatiche che sono coinvolte in questa particolare tipologia di ambiente fermentativo, discriminando l'idrolisi nel surnatante, sulla superficie ed all'interno delle cellule stesse.

Conclusione ultima ma non meno importante è la stretta sinergia che abbiamo ottenuto tra indagine di carattere microbiologico con le attività enzimatiche, le costanti cinetiche e le rese fermentative e le indagini di carattere analitico del consumo di nutrienti e del monitoraggio dei prodotti di fermentazione, attraverso la cromatografica planare che ha la caratteristica di separare miscele complesse di analiti in matrici importanti e che ben si è prestata come applicazione di carattere analitico ed identificativo in questo lavoro.



## BIBLIOGRAFIA

1. Van Loo J., Cummings J., Delzenne N., Englyst H., Franck A., Hopkins M., Kok N., Mcfarlane G., Newton D., Quigley M., Roberfroid M., Van Vliet T., Van den Heuvel E. " Functional food properties of digestible properties of digestible oligosaccharides: a consensus report from the END project (DGXIIAIRII CT<sub>94-1095</sub>) Br. J. Nutr. 81: 121-132,(1999)
2. Jenkins D.J.A., Kendall C.W.C., Axelsen M., Augustin L.S.A., Vuksan V., Viscous and non-viscous fibres non adsorbable and low glycaemic index carbohydrates, blood lipids and coronary heart disease. Curr. Opin. Lipidol. 11: 49-56, 2000.
1. F. Brighenti, Carboidrati e fibra, cap.8, *Fondamenti di Nutrizione Umana*, Mariani Costantini, C. Cannella, Tomassi G., Il Pensiero Scientifico Editore,(1999).
3. R. Giacco e G. Clemente. *Dietary fiber in the treatment of diabetes*. II Congresso Probiotics & Prebiotics New Food, Roma 2-4 settembre 2001, Università Urbaniana.
4. L. Brown *et al.* *Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis*. Am J Clin Nutr, 69(1): 30-42
5. N.M. Delzenne e N. Kok. *Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism*, Am J Clin Nutr, 73(S): 456-458 (2001)
6. S.R. Glore *et al.* *Soluble fiber and serum lipids; a literature review*. J Am Diet Assoc, 94: 425-436 (1994)
7. A. Mangano *et al.* *Ruolo degli alimenti contenenti probiotici nella nutrizione umana*. Nutrizione Umana Ed. ADI
8. Cummings J.H., Mcfarlane G.T., Englyst H.N. "Prebiotic digestion and fermentation." Am. J. Clin. Nutr. 73: 415S-420S, 2001
9. Gibson G.R. and Roberfroid M, "The Dietary modulation of the colonic microbiota-  
*Introducing the concept of prebiotics*", J. Nutr., 1995, vol.125, 1401-1412 e da Orafti Doc. A9-20-06/2000.
10. Gibson G.R., Beatty E.R., Wang, Cummings J. H. "Selective stimulation of

*Bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin*,"  
Gastroenterology, 108, 975-82, 1995 e da Orafti Doc. A9-20-06/2000.

11. I. S. Bhatia, I. S. Bhatia, K. S. Nandra, *Studies on fructosyl transferase from Aerobasidium sp.* J. Biochem. 57, 22, (1954)
12. W. N. Arnold, *Fructofuranosidase from grape berries.* Biophys. Acta, 110, 134-147, (1965).
13. J. W. Yun, K. H. Jung, J. W. Oh, J. H. Lee, *Semibatch production of fructo-oligosaccharides from sucrose by immobilized cells of Aereobasidium pullulans.* Appl. Biochem. Biotechnol., 24/25, (1990), 299-308.
14. Knol, J., P. Sholten, C. Kafka, J. Steenbakkers, S. Groß, K. Helm, K. M. Klarczy, H. Shopfer, H. M. Bockler, and J. Well.. *Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: more like breast-fed infants.* J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 40:36-42, (2005).
15. Ito, M., Y. Deguchi, A. Miyamori, K. Matsumoto, H. Kikuchi, K. Matsumoto, Y. Kobayashi, T. Yajima, and T. Kan.. *Effects of administration of galactooligosaccharides on the human fecal microflora, stool weight and abdominal sensation.* Microb. Ecol. Health Dis. 3:285-292, (1990).
16. Gopal, P. K., P. A. Sullivan, and J. B. Smart.. *Utilisation of galactooligosaccharides as selective substrates for growth by lactic acid bacteria including Bifidobacterium lactis DR10 and Lactobacillus rhamnosus DR20.* Int. Dairy J. 11:19-25, (2001)
18. A. K. Gupta, I. S. Bhatia, *Glucofructosan biosynthesis in Fusarium oxysporum.* Phytochemistry, 19, 2557-2563, (1980).
19. Rabiou, B. A., A. J. Jay, G. R. Gibson, and R. A. Rastall. *Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by  $\alpha$ -galactosidases from Bifidobacterium species.* Appl. Environ. Microbiol. 67:2526-2530, (2001).

20. Tzortzis, G., A. K. Goulas, J. M. Gee, and G. R. Gibson. A novel galacto-oligosaccharide mixtures increases the bifidobacterial population in continuous *in vitro* fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs *in vivo*. *J. Nutr.* 135:1726–1731, (2005).
21. K.E. Scholz-Ahrens *et al.* *Effects of prebiotics on mineral metabolism.*, *Am J Clin Nutr*, 73(S): 459-464 (2001)
22. J.L. Casterline Jr e Yuoh-ku. *Binding of zinc to apple fiber, wheat bran, and fiber component.* *J Food Sci* 58 (2): 365-368 (1993)
23. Scardovi V., Trovatelli L.D. *The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus Bifidobacterium.* *Ann. Microbiol. Enzimol.*, 15: 19-29 (1965).
24. Bezkorovainy A, Miller-Catchpole R. 1989. *Biochemistry and physiology of bifidobacteria.* CRC Press, London, United Kingdom.
25. Biavati B., Castagnoli P., Trovatelli L. D. *Species of the genus Bifidobacterium in the feces of human adults.* *Microbiologica*, 9: 39-45,(1986).
26. Biavati B., Mattarelli P.. The family *Bifidobacteriaceae*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K-H., Stackebrandt E. "*The Prokaryotes. An Evolving Electronic Resource for Microbiological Community*" Springer-Verlag, New York. (2001).
27. Thomas Schell, Andreas E Kulozik, and Matthias W Hentze "*Integration of splicing, transport and translation to achieve mRNA quality control by the nonsense-mediated decay pathway*": *Genome Biology* :1-6 (2002).
28. Crociani F, Matteuzzi D. *Urease activity in the genus Bifidobacterium.* *Ann Microbiol (Paris)*,133(3): 417-23 1982 May-Jun.
29. Bezkorovainy A, Miller-Catchpole R. *Biochemistry and physiology of bifidobacteria.* Boca-Raton, FL: CRC Press, (1989).
30. Y Benno, K Endo, T Mizutani, Y Namba, T Komori and T Mitsuoka "*Comparison of Fecal Microflora of Elderly Persons in Rural and Urban Areas of Japan*" Vol. 55, No. 5: 1100-1105.
31. Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M, Rowland I. *Functional food science and gastrointestinal physiology and function.* *Br. J. Nutr.* 80:S147-S171 (1998).

32. Tannock GV. Probiotics. *A critical review*. Horizon Scientific Press, Norfolk, UK. (1999).
33. Tannock GV. Probiotics and Prebiotics. *Where are we going?* Caister Academic Press, Norfolk, UK (2002).
34. Izmail N., Schraiber M., *Farmatsiya* (Mosca) 1938; 3: 1.7 (per la traduzione in lingua inglese: Pelick N., Bolliger H., Mangold H. *The history of thin-layer chromatography*. In: Giddings JC, Keller RA, eds *Advances in Chromatography*, vol. 3. New York : Marcel Dekker; 1966:85-118).
35. Consden R., Gordon AH., Martin AJP. *Partition chromatography with paper*. *Biochemistry J.* 38-224, (1944)
36. Snyder LR. *Principles of Adsorption Chromatography*. New York: Marcel Dekker; 1968
37. Soczewinski E. *Solvent composition effects in thin-layer chromatography system of the type silica gel-electron donor solvent*. *Anal. Chem.* ; 41: 179-182, (1969).
38. Scott RPW, Kucera P. *Solute-solvent interactions on the surface of silica gel*. *J. Chromatogr. A* ; 149: 93-110 (1978)
39. Conway WD. *Countercurrent Chromatography: Apparatus, Theory and Applications*. New York: VCH Publisher; (1990).
40. Horvath CS., Melander W., Molnar I. *Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phase*. *J. Chromatogr A*; 215: 129-156, (1976).
- 41.. Nyiredy S.Z., *Application of the "PRISMA" model for the selection of eluent-system in OverPressure Layer Chromatography (OPLC)*, 1987.
42. Burger K., Freusenius Z., *Anal. Chem.*, 318 229 (1984)K.
43. Bryson N., Papillard D., *An Introduction to OPLC*, 2004
44. Rossi M, Corradini C, Amaretti A, Nicolini M, Pompei A, Zanoni S, Matteuzzi D. *Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6150-6158, 2005.

45. Palframan RJ, Gibson GR, Rastall RA. *Carbohydrate preferences of Bifidobacterium species isolated from the human gut*. *Curr. Iss. Intest. Microbiol.* 4:71-75, 2003.
46. Wang X, Gibson GR.. *Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine*. *J Appl. Bacteriol.* 75:373-380,1993
47. Rada et al.; Rada V, Bartonova J, Vlkova E. 2002. *Specific growth rate of bifidobacteria cultured on different sugars*. *Folia Microbiol.* 47:477-480, 2002.
48. Hopkins et al. 1998; Hopkins MJ, Cummings JH, MacFarlane GT.. *Inter-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate sources*. *J. Appl. Microbiol.* 85:381-386, 1998.
49. Kim TB, Song SH, Kang SC, Oh DK.. *Quantitative comparison of lactose and glucose utilization in Bifidobacterium longum cultures*. *Biotechnol. Prog.* 19:672-675, 2003.
50. Perrin S, Warchol M, Grill JP, Schneider F. *Fermentation of fructooligosaccharides and their components by Bifidobacterium infantis ATCC 15697 on batch culture in semi-synthetic medium*. *J. Appl. Microbiol.* 90:859-865, 2001
51. Palframan RJ, Gibson GR, Rastall RA.. *Carbohydrate preferences of Bifidobacterium species isolated from the human gut*. *Curr. Iss. Intest. Microbiol.* 4:71-75, 2003.
52. Moller PL, Jorgensen F, Hansen OC, Madsen SM, Stougaard P. *Intra- and extracellular beta-galactosidases from Bifidobacterium bifidum and B. infantis: molecular cloning, heterologous expression, and comparative characterization*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2276-2283,2001.
53. Narang A, Konopka A, Ramkrishna D. *The dynamics of microbial growth on mixtures of substrates in batch reactors*. *J. Theor. Biol.* 184:301-317,1997.

