

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Biologia cellulare, molecolare e industriale: Progetto n. 3
“Microbiologia e biotecnologie industriali”

Ciclo XXIII

Settore/i scientifico-disciplinare/i di afferenza: CHIM11

TITOLO TESI

***SECONDARY CHEMICAL BUILDING BLOCKS
DA COPRODOTTI AGROALIMENTARI
TRAMITE PROCESSI DI BIORAFFINAZIONE***

Presentata da: Elena Ansaloni

Coordinatore Dottorato

Relatore

Alejandro Hochkoepler

Leonardo Setti

Esame finale anno 2011

SOMMARIO

1.INTRODUZIONE.....	1
Il concetto di bioraffineria come valorizzazione integrata per il recupero di chemicals ed energia	1
Concetto di <i>primary e secondary chemical building blocks</i>	3
Processi di <i>biorefinery</i>	6
Composizione delle biomasse	8
Biofenoli come <i>secondary chemical building blocks</i> da fonti rinnovabili.....	12
L'approccio tecnologico come soluzione alle limitazioni logistiche	16
La parete cellulare vegetale.....	20
<u>Funzioni e costituenti polisaccaridici</u>	<u>20</u>
<u>Costituenti non polisaccaridici: glicoproteine e lignina</u>	<u>25</u>
<u>Monocotiledoni e dicotiledoni</u>	<u>26</u>
Biocatalizzatori industriali per l'idrolisi dei tessuti vegetali	29
<u>Cellulasi</u>	<u>30</u>
<u>Emicellulasi.....</u>	<u>30</u>
<u>Pectinasi</u>	<u>31</u>
<u>Arilesterasi.....</u>	<u>32</u>
<u>Proteasi</u>	<u>34</u>
<u>Xilanasi</u>	<u>35</u>
<u>Amilasi</u>	<u>36</u>
2. PARTE SPERIMENTALE	37
Scarti agroalimentari liquidi: acque di vegetazione delle olive	38
<u>Separazione con filtrazione a membrana</u>	<u>42</u>
<u>Separazione cromatografica</u>	<u>44</u>
<u>Recupero della componente fenolica dalle AV.....</u>	<u>61</u>
<u>Scelta della miscela estraente ottimale per lo step di desorbimento</u>	<u>78</u>

<u>Scelta della quantità di HCl ottimale nella miscela estraente utilizzata per lo step di desorbimento</u>	79
<u>Recupero di idrossitirosole da OMW tramite processi di adsorbimento e desorbimento su resina</u>	81
<u>Trattamenti successivi delle acque di vegetazione</u>	82
<u>Conclusioni relative allo scarto liquido</u>	83
Scarti agroindustriali di tipo solido: crusca di grano	84
<u>Idrolisi enzimatica: caratterizzazione del preparato enzimatico Fungamyl Super AX</u>	88
<u>Idrolisi enzimatica: caratterizzazione del preparato enzimatico Celluclast BG</u>	96
<u>Separazione cromatografica</u>	103
<u>Recupero di acido ferulico dall'idrolizzato di crusca</u>	103
<u>Separazione con filtrazione a membrana</u>	109
<u>Stima delle dimensioni molecolari di preparati enzimatici</u>	109
<u>Stima delle dimensioni molecolari del substrato</u>	111
<u>Frazionamento dei prodotti derivanti dall'idrolisi di un substrato di xilano con diversi preparati enzimatici: Fungamyl Super AX e Celluclast BG</u>	113
<u>Valutazione dei parametri di ultrafiltrazione</u>	119
<u>Conclusioni relative allo scarto solido</u>	130
Utilizzo di prodotti di bioraffinazione di scarti liquidi (acque di vegetazione delle olive) e solidi (crusca di grano): i bioliquefatti per cosmesi funzionale	132
3. CONCLUSIONI	136
4. MATERIALI E METODI	142
Scarto agroalimentare liquido: acque di vegetazione delle olive	142
<u>Determinazione delle isoterme di adsorbimento relative a matrici polimeriche adsorbenti</u>	142
<u>Separazione cromatografica tramite processi di adsorbimento e desorbimento su matrici polimeriche di acque di vegetazione delle olive</u>	142
<u>Scelta della miscela estraente ottimale per lo step di desorbimento</u>	143
<u>Scelta della quantità ottimale di acido cloridrico nell'etanolo della miscela per lo step di desorbimento</u>	143
<u>Determinazione della quantità di polifenoli totali con il metodo del Folin-Ciocalteu</u>	144
<u>Determinazione del contenuto di idrossitirosole</u>	145

<u>Trattamenti successivi di adsorbimento e desorbimento su matrici polimeriche adsorbenti di acque di vegetazione derivanti da processi di filtrazione a membrana</u>	147
Scarto agroalimentare solido: crusca di grano	148
<u>Preparazione del substrato di xilano (from oat spelts, Fluka)</u>	148
<u>Detrminazione degli zuccheri riducenti (Metodo dell'ADNS)</u>	148
<u>Prove di attività xilanasica dei preparati enzimatici Fungamyl Super AX e Celluclast BG a diversi pH</u>	149
<u>Determinazione dell'attività xilanasica dei preparati enzimatici Fungamyl Super AX e Celluclast BG a diverse temperature</u>	150
<u>Prove di stabilità dei preparati Fungamyl Super AX e Celluclast BG a diverse temperature</u>	150
<u>Separazione cromatografica tramite adsorbimento e desorbimento su matrici polimeriche del bioliquefatto di crusca di grano</u>	151
<u>Determinazione del contenuto di carboidrati totali (Metodo del Fenolo)</u>	152
<u>Separazione per filtrazione a membrana</u>	154
<u>Determinazione del contenuto di proteine totali (Metodo Bradford)</u>	155
<u>Stima delle dimensioni molecolari dei preparati enzimatici Fungamyl Super AX e Celluclast BG</u>	156
<u>Stima delle dimensioni molecolari del substrato di xilano</u>	157
<u>Stima delle dimensioni molecolari del prodotto di idrolisi enzimatica in presenza di Celluclast BG e/o Fungamyl Super AX</u>	158
<u>Determinazione delle condizioni operative ottimali del processo di ultra e nano filtrazione</u>	158
5. BIBLIOGRAFIA	160

1. INTRODUZIONE

Il concetto di bioraffineria come valorizzazione integrata per il recupero di chemicals ed energia.

Negli ultimi anni si è andato sempre più affermando il concetto di “bioraffineria”; con tale termine si identificano tutta una serie di processi chimici, fisici e microbiologici, con i quali si è in grado di trasformare le biomasse, fonti di energia rinnovabile costituite da materiale organico, in bioenergia, biocombustibili, biomateriali e sostanze chimiche ad alto valore aggiunto. Il concetto appena descritto mostra come la bioraffineria sia sostanzialmente l’analogo della più classica raffineria del petrolio (Figura 1.1).

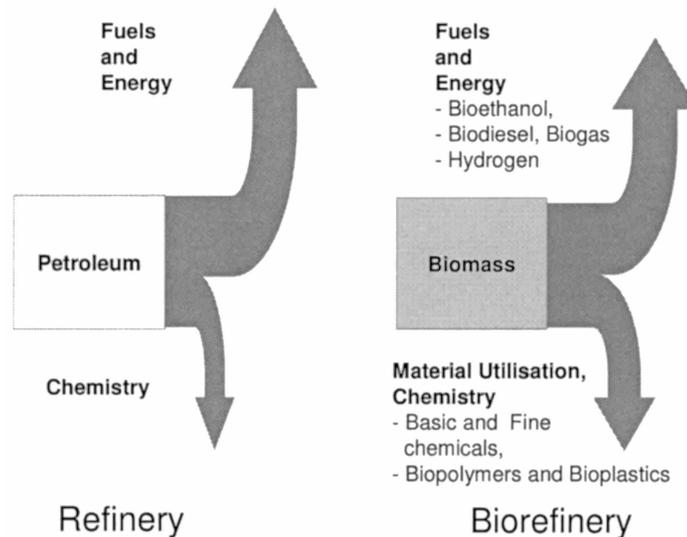


Figura 1.1. Confronto tra raffineria del petrolio e bioraffineria delle biomasse. (Fonte: *Biorefinery-Industrial Processes and Products: Status Quo and Future Directions*. Editors: B. Kamm, P.R. Gruber, M. Kamm. Copyright 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA)

Per quanto riguarda la classica raffineria, diventa subito evidente il problema relativo al reperimento delle fonti non rinnovabili di cui fanno parte, oltre al

petrolio, il gas naturale ed il carbone fossile, dato il continuo aumento del consumo energetico.

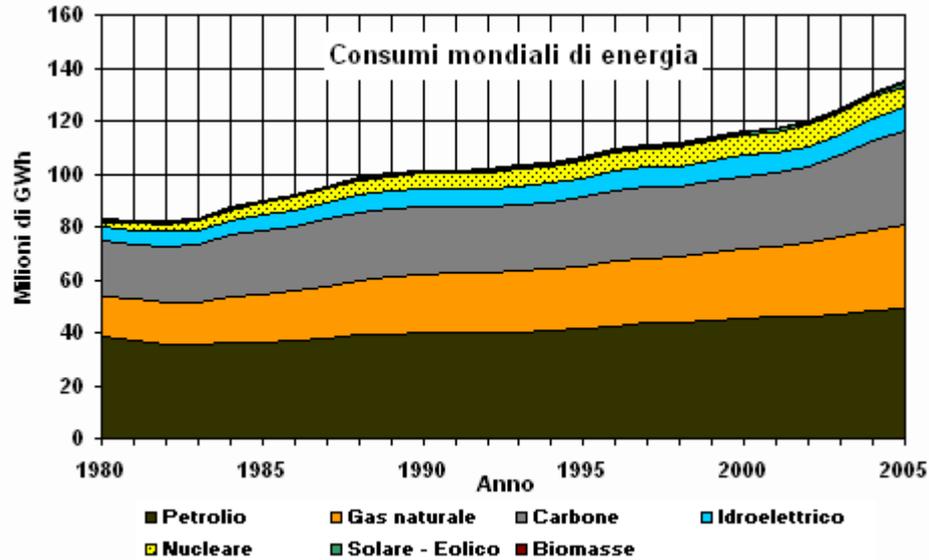


Figura 1.2. Consumo energetico mondiale (1980-2005) per tipo di fonte.

Al fine di rispondere alle problematiche correlate al crescente fabbisogno energetico mondiale si stanno mettendo in pratica, soprattutto in occidente, politiche volte alla riduzione dei consumi tramite risparmio energetico e al reperimento di fonti alternative rinnovabili anche grazie a forti investimenti in ricerca sia sul versante accademico che su quello industriale.

Negli ultimi anni si sta investendo non solo nelle ormai tradizionali energie rinnovabili (eolico, solare, geotermico), ma anche nelle tecnologie alternative, nei nuovi carburanti, nell'uso crescente di gas e in soluzioni ibride elettrico-diesel (in particolare nel campo dell'autotrazione). A questo insieme vanno aggiunte le ultime frontiere, quali il fotovoltaico a basso costo o il termoelettrico.

Il binomio ricerca-sviluppo e la forte spinta industriale hanno consentito di realizzare straordinari progressi. Secondo la International Energy Agency, le fonti rinnovabili potranno arrivare a soddisfare il 20% della richiesta di elettricità mondiale nel 2020, e il 50% della domanda energetica nel 2050¹.

Le fonti non rinnovabili, proprio grazie al fatto che attualmente soddisfano circa l'80% del fabbisogno energetico mondiale², risultano essere anche la primaria

fonte di produzione di materie prime per l'industria chimica nonostante il loro costo sia in costante aumento. È ovvio che passare attraverso moderni processi di bioraffinazione da fonti rinnovabili quali le biomasse per ottenere sostanze chimiche di base e prodotti ad alto valore aggiunto, porterebbe ad uno sviluppo economico più sostenibile. Un approccio economico più lungimirante deve prevedere la riduzione del consumo di fonti non rinnovabili, con quelle rinnovabili, come le biomasse al fine di ottenere non solo bioenergia e biocarburanti, ma anche biomolecole e biomateriali.

Il concetto di bioraffineria, che si è andato affermando in questi ultimi anni, tende proprio a superare il limite di una destinazione puramente energetica delle biomasse, proponendo un loro impiego potenzialmente integrale come base per la produzione di molecole chimiche e materiali a ridotto impatto ambientale. Questo approccio è potenzialmente in grado di consentire un deciso incremento del valore aggiunto dell'intera filiera agro-industriale sia in termini economici che ambientali.

Concetto di *primary e secondary chemical building blocks*

È importante a questo punto definire cosa si intende per “*chemicals*”: vengono definite *chemichal building blocks* quelle molecole di base sulla quale poggia la gran parte della chimica di sintesi, tali molecole hanno un relevantissimo valore strategico per l'industria chimica. Attualmente sono ottenute dalla raffinazione di idrocarburi fossili (petrolio, carbone e gas naturale), anche se sono in aumento i processi per il loro ottenimento dalle biomasse. Tale tendenza rappresenta uno degli obiettivi strategici per l'Unione Europea nel medio-lungo termine.

I *primary chemical building blocks* rappresentano prodotti chimici di base per la sintesi di una vasta gamma di componenti per l'industria chimica. Fenolo e cresoli rappresentano un buon esempio di *primary chemical building blocks*, di cui 2,8 milioni di tonnellate sono attualmente prodotti in Europa ogni anno. Consultando il database Sci Finder Scholar si possono trovare più di 30000 reazioni per il fenolo e più di 17000 reazioni per i cresoli.

1.Introduzione

Attualmente, i *primary chemical building blocks* sono prodotti da processi di raffinazione di idrocarburi fossili: il 5% della produzione mondiale proviene dal carbone (che contiene 0,2% di fenoli), attraverso la distillazione dei residui dopo la produzione di coke, mentre 95 % della produzione mondiale di fenolo si ottiene l'ossidazione di 1-metilelbenzene (cumene), che a sua volta è prodotto dalla reazione tra benzene e propene. Sia il benzene che il propene sono prodotti tramite cracking e distillazione del petrolio greggio. Il cumene è poi trasformato in fenolo ottenendo acetone come sottoprodotto. Il costo attuale di questi *primary chemical building blocks* è di circa 1-3 € / kg.

I *secondary chemical building blocks* rappresentano derivati chimici a medio valore aggiunto, che sono utilizzati come sostanze intermedie per la sintesi di sostanze chimiche ad alto valore. Attualmente, queste molecole sono ottenute attraverso la sintesi da *primary chemical building blocks*. Diversi derivati fenolici di origine naturale come il tirosolo, l'idrossitirosolo, l'acido ferulico, l'acido *p*-cumarico, la catechina, l'acido gallico, l'acido caffeico, l'acido vanillico e la vanillina sono noti come *secondary chemical building blocks*. Sci Finder Scholar riporta più di 300 reazioni per ognuna di queste molecole, per un totale di oltre 4000 reazioni. Questi derivati fenolici sono attualmente utilizzati a decine di migliaia di tonnellate per la produzione di prodotti ad elevato valore aggiunto (Figura 1.3), come gli additivi alimentari e aromi (vanillina³), prodotti della chimica fine (farmaci anti-infiammatori non steroidei come l'ibuprofene o flurbiprofen⁴) e polimeri (poli *p*-vinilfenolo, un polimero fotosensibile per applicazioni elettroniche e optoelettroniche⁵).

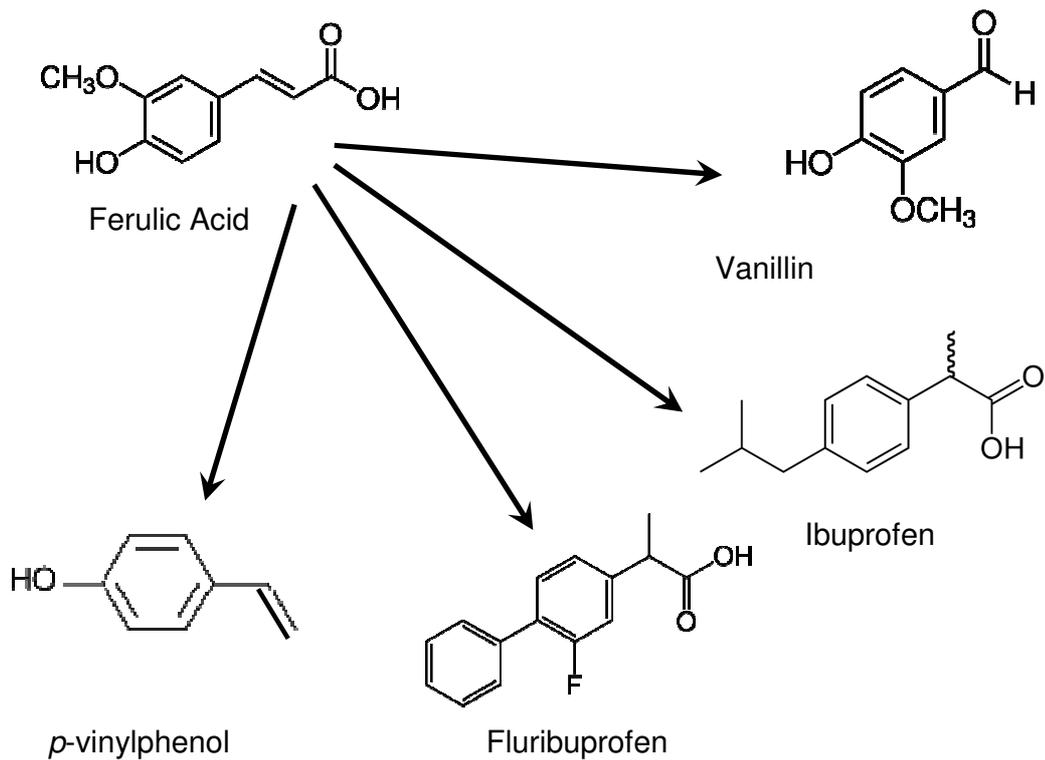


Figura 1.3. Possibili prodotti di sintesi che utilizzano acido ferulico come *secondary chemical building block*.

Il costo attuale dei *secondary chemical building blocks* di derivazione fenolica vanno dalle decine alle migliaia di €/kg (tabella 1.1.).

Tabella 1.1. Costo attuale dei *secondary chemical building blocks* di derivazione fenolica (QUOTAZIONI INTERNET)

Product Name (CAS n°)	Cost €/Kg
Vanillin (121-33-5)	32,54
Vanillic acid (121-34-6)	390
Chlorogenic acid (327-97-9)	12.880
Caffeic acid (331-39-5)	2.950
Epicatechin gallate(1257-08-5)	800
Syringic acid (530-57-4)	5.170
Gallic acid (149-91-7)	225
Catechin (154-23-4)	2871
p-coumaric acid (7400-08-0)	305
Ferulic Acid (1135-24-6)	238,35

Considerando la componente fenolica contenuta nei sottoprodotti del settore agroalimentare, il potenziale sfruttamento di questi intermedi chimici come *secondary chemical building blocks* apre la strada ad un gran numero di applicazioni potenziali, che vanno dai prodotti farmaceutici, ai prodotti fitosanitari, dal settore degli additivi alimentari a quello delle resine.

Processi di *biorefinery*

Ci sono attualmente molti progetti di ricerca e sviluppo che perseguono varie vie di approccio alla bioraffinazione a partire dalle biomasse, le quali grazie alla loro composizione chimica ben si prestano al recupero di *chemicals* di grande interesse. Lo scopo principale dei processi di bioraffinazione è quello di depolimerizzare e deossigenare le strutture polisaccaridiche, lignocellulosiche e lipidiche che costituiscono le biomasse; tutto ciò è possibile sostanzialmente tramite quattro diverse tipologie di processo: termochimico, biochimico, meccanico/fisico e chimico⁶.

Per quanto riguarda il processo termochimico ne esistono sostanzialmente di tre tipi: il primo e più vecchio è quello che prevede di bruciare la biomassa semplicemente per produrre calore⁶; il secondo processo è quello che prevede di portare la biomassa ad elevate temperature (superiori ai 700°C) in presenza di bassi livelli di ossigeno al fine di ottenere una miscela di H₂, CO, CO₂ e CH₄, detta *syngas*⁶, la quale può essere direttamente utilizzata come biocombustibile, oppure come intermedio per la produzione di fuels come isobutene, dimetil etere, etanolo, o per la produzione di prodotti chimici come metanolo, ammoniaca, acidi organici; l'ultimo processo di trattamento termochimico della biomassa prevede sempre l'utilizzo di elevate temperature (300-600°C), ma l'assenza di ossigeno, in modo da ottenere un liquido detto *bio-oil*, carbone e gas leggeri simili al *syngas*. Le percentuali dei diversi prodotti varia a seconda delle condizioni operative, anche se sono preferibili i processi nei quali la percentuale di *bio-oil* prodotto è predominante. Il suo utilizzo come carburante per i trasporti e come materia prima di base per prodotti chimici è ancora oggetto di studio⁶.

Altra tipologia di processi sono quelli biochimici che innanzitutto permettono di operare a temperature decisamente più basse dato che si tratta di fermentazioni e processi anaerobici. Nel primo caso si possono utilizzare microrganismi o enzimi al fine di produrre solitamente alcoli e acidi organici. L'etanolo⁶ è sicuramente il prodotto principale anche se sono sempre più in aumento i processi che permettono di ottenere idrogeno, metanolo, acido succinico, acido ferulico e molti altri prodotti di elevato interesse. Per quanto riguarda la digestione anaerobica delle biomasse, il prodotto che si ottiene è il biogas che contiene più del 97% di metano e può essere tranquillamente utilizzato per sostituire il gas naturale⁶.

Quelli meccanici, sono processi che non vanno a cambiare lo stato o la composizione della biomassa, ma operano una riduzione delle dimensioni o una separazione delle componenti delle materie prime che compongono la biomassa stessa. Di solito sono processi che vengono utilizzati prima del processo vero e proprio di bioraffinazione, che richiede appunto una riduzione delle dimensioni delle matrici di partenza. Sostanzialmente si tratta di processi che attraverso tagli meccanici riducono le dimensioni e cambiano la densità della biomassa da trattare, oppure si tratta di processi di separazione che tramite estrazione permettono di recuperare e concentrare i prodotti di interesse da una matrice di partenza non omogenea⁶.

Infine abbiamo processi di trattamento di tipo chimico, che prevedono il trattamento tramite reazione chimica che comporta un cambiamento nella composizione del substrato di partenza, tramite l'utilizzo di sostanze chimiche. Tali sostanze possono operare con un'idrolisi della matrice nel caso si tratti di acidi, basi o enzimi che depolimerizzano zuccheri e proteine nei loro monomeri o in prodotti chimici⁶ (es.: acido levulinico da glucosio). Altre reazioni sono le transesterificazioni che coinvolgono principalmente i trigliceridi contenuti nelle biomasse, e dai quali si ottiene il biodiesel e glicerina come coprodotto, la quale ha diversi usi⁶. Altre reazioni chimiche per la conversione delle biomasse sono la sintesi di Fisher-Tropsch, la metanizzazione, lo steam reforming, e tanti altri.

1.Introduzione

Da quanto descritto sinora sostanzialmente si ottengono due tipologie di prodotti dai processi di bioraffinazione delle biomasse, quelli destinati alla produzione di energia, e quelli destinati alle produzioni chimiche (Tabella 1.2).

Tabella 1.2. Maggiori prodotti ottenuti tramite i processi di bioraffinazione.

Prodotti per l'energia	Biocarburanti gassosi (biogas, <i>syngas</i> , idrogeno biometano)
	Biocarburanti solidi (<i>pellets</i> , lignina, carbone)
	Biocarburanti liquidi per il trasporto (bioetanolo, biodisel, <i>bio-oil</i> , FT-fuels)
Prodotti per la chimica	<i>Chemicals</i> (<i>building blocks</i> , prodotti di chimica fine, prodotti in bulk)
	Acidi organici (acido succinico, acido lattico, e altri derivati zuccherini)
	Resine e polimeri (plastiche da amido, resine fenoliche e furaniche)
	Biomateriali (carta, cellulosa, pannelli di legno)
	Mangimi
	Fertilizzanti

Composizione delle biomasse.

Il termine biomassa è stato introdotto per indicare tutti quei materiali di origine organica (vegetale o animale) che non hanno subito alcun processo di

1.Introduzione

fossilizzazione e che possono essere utilizzati per la produzione di energia e prodotti chimici. Pertanto tutti i combustibili fossili (petrolio, carbone, metano, ecc..) non possono essere considerati come biomassa. Le biomasse, come già detto in precedenza, rientrano fra le fonti rinnovabili in quanto la CO₂ emessa per la produzione di energia o prodotti chimici non rappresenta un incremento dell'anidride carbonica presente nell'ambiente, ma è la medesima che le piante hanno prima assorbito per svilupparsi e che alla morte di esse tornerebbe nell'atmosfera attraverso i normali processi degradativi della sostanza organica. Uno schema abbastanza esaustivo sulle diverse tipologie di biomasse è quello proposto in figura 1.4.

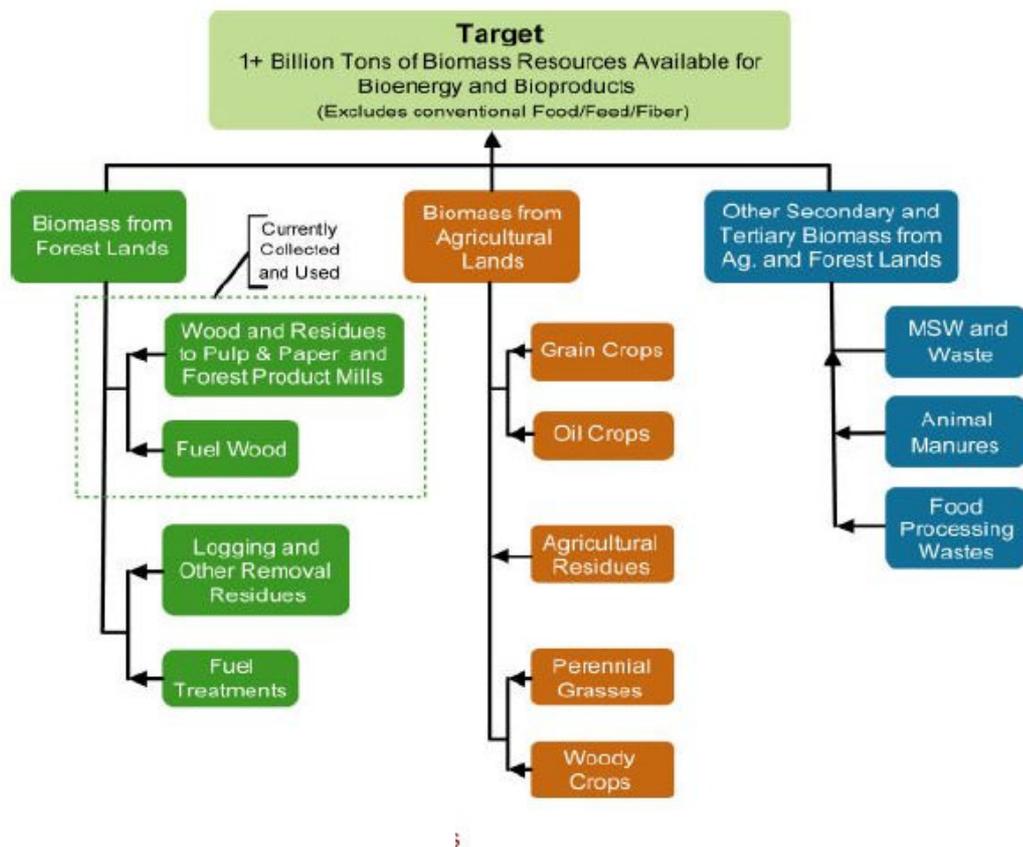


Figura 1.4. Categorie di fonti di biomasse.

I maggiori costituenti dal punto di vista chimico delle biomasse sono sostanzialmente di tre tipi⁶: carboidrati e lignina, trigliceridi.

I carboidrati sono rappresentati dai polisaccaridi che costituiscono le matrici vegetali:

1.Introduzione

- amido;
- pectine;
- cellulose;
- emicellulose.

Dall'idrolisi chimica o enzimatica è possibile ottenere i monomeri che costituiscono tali polimeri, i quali per via chimica o fermentativa sono in grado di produrre tutta una serie di interessanti prodotti di bioraffinazione sia per l'energia sia per l'industria chimica. Un buon esempio è quello dell'acido succinico ottenuto per fermentazione del glucosio (Figura 1.5).

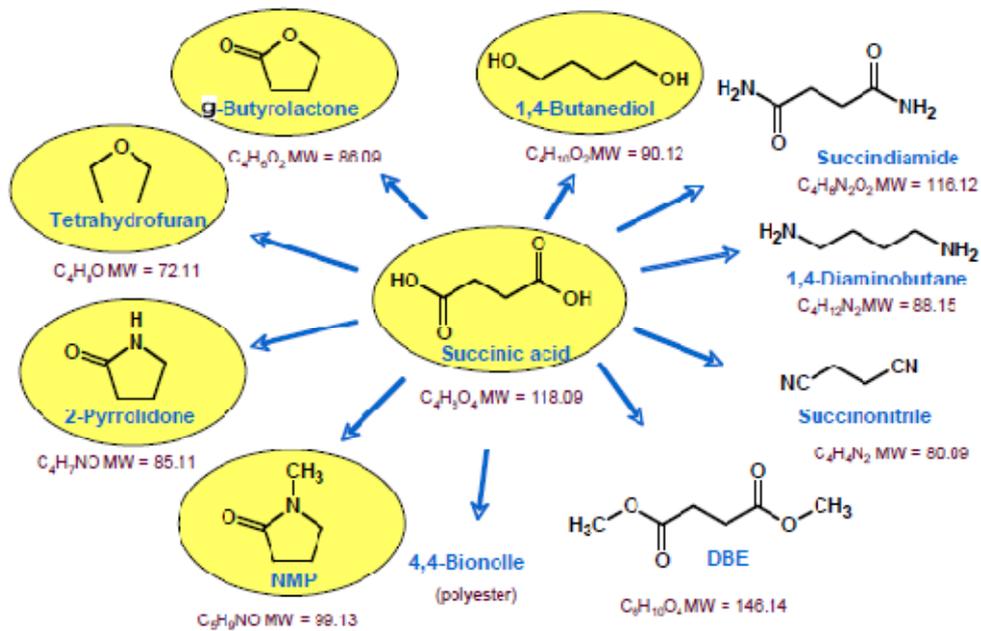


Figura 1.5. Prodotti ottenibili da acido succinico.

La biomassa ligninocellulosica è costituita da:

- cellulosa;
- emicellulosa;
- lignina.

Per i primi due polimeri vale il discorso fatto relativo ai polimeri di tipo zuccherino che li compongono, mentre per ciò che riguarda la lignina questa è una macromolecola sempre di tipo polimerico costituita da unità fenoliche legate tra di loro (Figura 1.6).

1.Introduzione

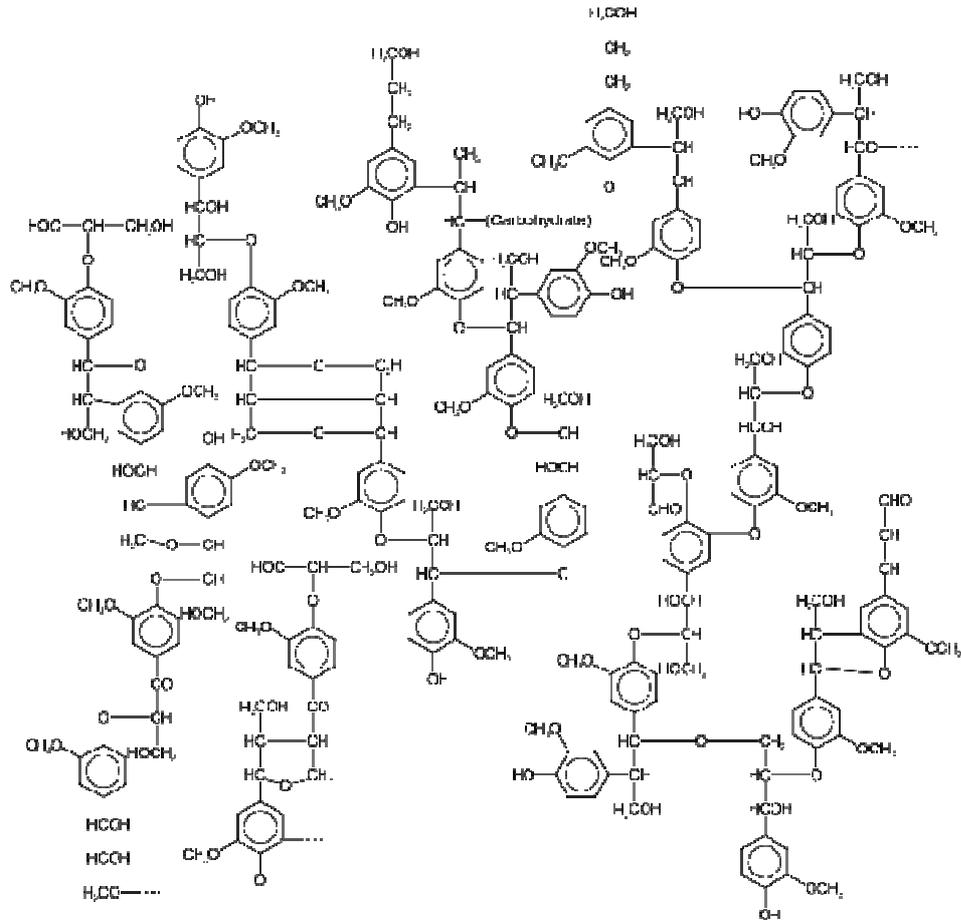


Figura 1.6. Struttura del polimero di lignina.

La lignina, che costituisce il 15-25% delle biomasse⁶, a differenza dei polisaccaridi che possono dare fermentazione, non può essere fermentata, ma può essere utilizzata per generare energia sottoforma di calore tramite processi termici, oppure può subire processi chimici per il recupero di componenti da utilizzare come *building blocks* (Figura 1.7).

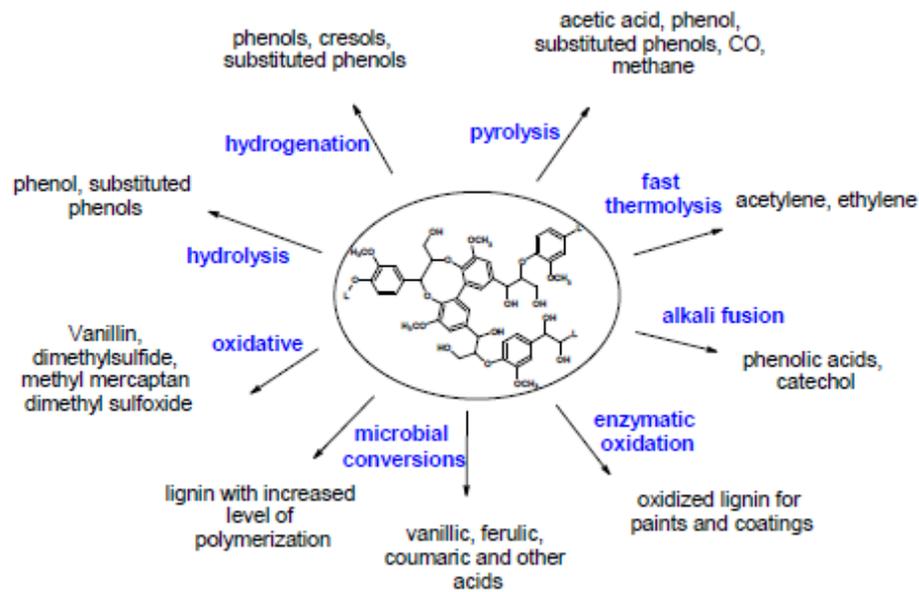


Figura 1.7. Building blocks ottenibili tramite trattamento chimico della lignina.

I trigliceridi sono molecole costituite da glicerina legata a tre molecole uguali o diverse di acidi grassi più o meno insaturi con catene di carbonio che contengono principalmente C₁₆, C₁₈ e C₂₀. Le fonti principali di questi trigliceridi sono materie prime di origine vegetale ed animale, mentre in piccola parte ritroviamo trigliceridi derivanti dagli scarti agroindustriali. Da questi oli è si ottiene principalmente il biodisel per reazione con metanolo, ma vengono utilizzati, data la presenza di siti molto reattivi come le insaturazioni presenti sulle catene di carbonio, anche come fonti rinnovabili di partenze per prodotti chimici.

L'ultimo tipo di biomassa da considerare sono gli scarti derivanti dalle frazioni solide dei rifiuti municipali (MSW) e dalle lavorazioni dell'agroindustria. Questa tipologia di biomassa contiene ancora un'elevata quantità di componenti potenzialmente interessanti ai fini energetici⁶ e ai fini del recupero di biomolecole, purtroppo ancora poco sfruttata.

Biofenoli come *secondary chemical building blocks* da fonti rinnovabili

In natura la biosintesi dei composti fenolici è uno dei tratti distintivi dei metabolismi secondari di piante superiori e felci mentre sono sostanzialmente

assente nei microrganismi e nel regno animale. Le biomasse vegetali derivanti dalle trasformazioni agroindustriali, che contengono il 3-8% p/p secco di fenoli, rappresentano una fonte rilevante di *secondary chemical building blocks* attualmente non sfruttate. Le classi di composti fenolici contenuti in queste matrici vegetali sono essenzialmente acidi fenolici, derivati cinnamici, flavonoidi e lignine. Attualmente i sottoprodotti del settore agroalimentare sono usati come materie prime per la produzione di mangimi o smaltiti come rifiuti speciali non pericolosi. In entrambi i casi la frazione fenolica contenuta in esse rappresenta un problema: riduce il potere nutrizionale dei mangimi e ostacola la decomposizione microbiologica negli impianti di trattamento. Come nel caso della produzione di coke, la rimozione del contenuto fenolico da biomasse può costituire una valida via di valorizzazione di tali matrici tramite recupero di sostanze chimiche.

Molte ricerche sono state dedicate all'estrazione di composti particolari che hanno diverse potenziali applicazioni anche se molto specifiche. E' stato dimostrato che questo approccio, laddove trovi applicazioni industriali, saturi rapidamente la domanda di mercato e, quindi, non rappresenta una valida soluzione generale per la valorizzazione di tutta la biomasse prodotta. Allo stesso modo, la produzione di biopolimeri ottenuti da amido, cellulosa e proteine è applicabile per applicazioni di nicchia, che hanno bisogno di essere supportata da politiche pubbliche, al fine di sostenere gli investimenti necessari per la produzione come conseguenza della minore qualità rispetto ai prodotti di derivazione petrolchimica.

Il settore agro-alimentare costituisce uno dei comparti produttivi a cui sono attribuite le più elevate produzioni di rifiuti speciali, in massima parte non pericolosi. A livello Europeo gli scarti agricoli si stimano nell'ordine di 250 milioni di tonnellate l'anno^{7,8}. I sottoprodotti del settore agroalimentare europeo rappresentano un'abbondante fonte di materie prime a basso costo, che non sottraggono territorio e risorse necessarie per la produzione alimentare. Questo consente di ovviare alla necessità per l'Europa di dedicare grandi superfici coltivabili per usi non alimentari a differenza di quanto succede negli Stati Uniti e in Brasile. I sottoprodotti delle diverse catene di produzione agro-alimentare contengono grandi quantità di specifici composti fenolici acidi idrossicinnamici nel settore dei cereali, tirosolo e idrossitirosolo nel settore della produzione dell'olio

d'oliva e catechine dalla trasformazione dell'uva, per considerare solo tre delle più importanti catene agro-alimentare in area mediterranea e centro Europa. A livello italiano i cereali costituiscono una produzione per il 2004 di circa 22,1 milioni di ton, la vite di 9 milioni di ton e l'olivo di 4,7 milioni di ton⁹. I residui dalla lavorazione dei cereali costituiscono circa 11 milioni di ton/anno su base secca di cui il 40-60% viene utilizzato come lettiera per animali e per la produzione della carta in vari comparti¹⁰. Negli altri tre comparti la quantità degli scarti è di rilevante entità e per quanto riguarda la produzione del vino e dell'olio di oliva si possono stimare dei quantitativi di sottoprodotti di lavorazione pari rispettivamente al 30% ed al 27,5%. Questo porta ad una produzione di circa 2,3 milioni di tonnellate l'anno di scarti enologici e 1,2 milioni di tonnellate l'anno di scarti oleari, dei quali solo il 25% viene riutilizzato. La gestione e lo smaltimento di questi scarti è un problema complesso, da affrontare in chiave sociale, economica e ambientale con l'obiettivo di un uso razionale e sostenibile delle risorse.

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

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

Un diverso approccio, basato su trattamenti sequenziali che consentano la valorizzazione delle diverse componenti della matrice vegetale, sebbene più complesso e oneroso, può consentire di massimizzare il recupero di valore aggiunto dallo scarto, ottimizzando al contempo le procedure di smaltimento. In figura 1.8 è riportato uno schema di approccio metodologico per la valorizzazione multistadio di scarti agroindustriali.

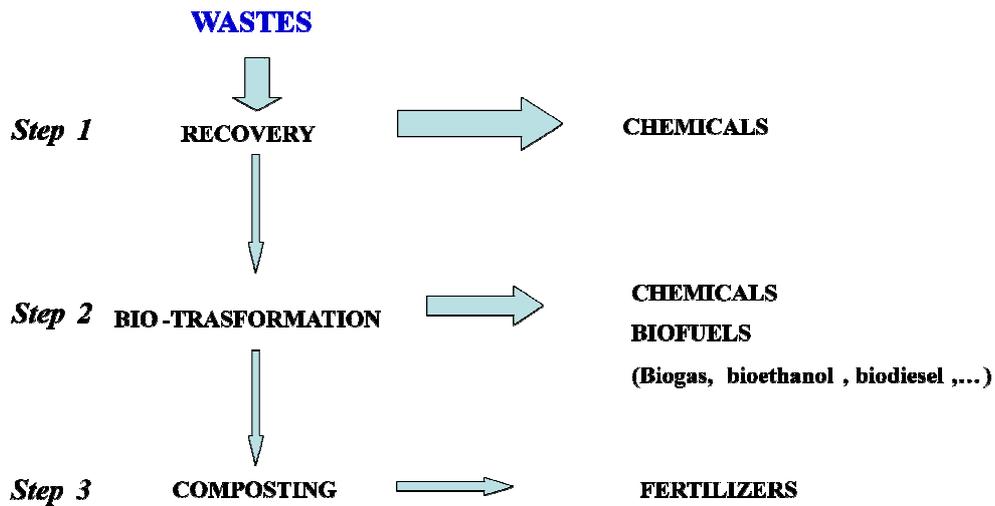


Figura 1.8. Schema di approccio metodologico per la valorizzazione multistadio degli scarti agroindustriali.

Gli scarti di origine vegetale sono caratterizzati da specifici fito-composti con attività antiossidante denominati biofenoli, i quali hanno recentemente trovato un grande interesse nel mercato come prodotti antiossidanti. Particolare interesse è legato alla loro applicazione nel mercato dei prodotti per la salute dell'uomo sia come nutraceutici che come cosmetoaceutici e, in prospettiva, anche in campo farmaceutico. Su questa base gli antiossidanti naturali rappresentano un mercato in crescita per lo sviluppo di prodotti *environmental friendly*.

Tabella 1.3. Quantità di sottoprodotti delle principali filiere agroalimentari Italiane e contenuto di biofenoli potenzialmente recuperabili da esse ogni anno.

Settore agroalimentare e tipologia di sottoprodotto	Quatità prodotta (Milioni di Ton)	Quantità e principali fenoli recuperabili (Ton)
Produzione di olio d'oliva Acque di vegetazione	4	40.000 oleuropeina idrossitirosole
Sfarinati di grano duro Crusca	1,7	11.200 acido ferulico acido cumarico
Trasformazioni enologiche Vinacce	0,9	30.000 catechine antocianine

Un efficiente processo di valorizzazione integrata degli scarti agro-industriali dovrebbe prevedere quindi anche uno stadio atto a recuperare selettivamente i biofenoli dalla matrice vegetale come *chemicals* ad alto valore aggiunto. Il recupero dei biofenoli è anche propedeutico ai successivi stadi fermentativi di trattamento della biomassa per la produzione di *biofuels*, infatti i processi di biotrasformazione microbica sono generalmente inibiti dalla presenza di polifenoli ed in particolare i batteri acetogenici e metanogenici sono sensibili a concentrazioni di acido caffeico $>0,25$ g/l e di acido *p*-cumarico $>0,12$ g/l. Queste caratteristiche anti-microbiche abbinate ad una nota fito-tossicità complica lo smaltimento di tali scarti che, quindi, costituiscono un costo per le diverse realtà produttive.

Un *waste management* sostenibile deve quindi necessariamente progredire di pari passo ad una adeguata valorizzazione commerciale dello stesso rifiuto trasformandolo in risorsa.

L'approccio tecnologico come soluzione alle limitazioni logistiche

La storia, il clima e le opportunità di mercato hanno portato ogni singolo paese Europeo a sviluppare diversi prodotti agricoli da cui si possono ricavare specifici *secondary chemical building blocks* fenolici. Uno dei principali obiettivi di questo progetto è quello di capire come diversificare e come individuare strategicamente piattaforme di bioraffinazione, in modo da impostare un sistema economicamente sostenibile per la produzione di fenoli a livello locale, nazionale ed Europeo.

Questo approccio propone soluzioni per i ben noti problemi di bio-raffinazione di biomassa. Si tiene in conto il fatto che i sottoprodotti del settore agroalimentare in genere sono: 1) liquidi o solidi; 2) prodotti con specifiche stagionalità; 3) capillarmente distribuiti su tutto il territorio, 4) microbiologicamente e chimicamente instabili. Questo nuovo sistema di bioraffinazione deve essere flessibile per garantire un efficiente funzionamento di tutto il sistema. Una rappresentazione schematica del sistema di gestione dei sottoprodotti agroalimentari è riportato in figura 1.9. A seconda della tipologia di sottoprodotto

e delle peculiari caratteristiche tecniche e tecnologiche necessarie per la completa valorizzazione chimica-energetica vengono studiati specifici accorgimenti logistici e processi tecnologici che possano massimizzare la sostenibilità del sistema.

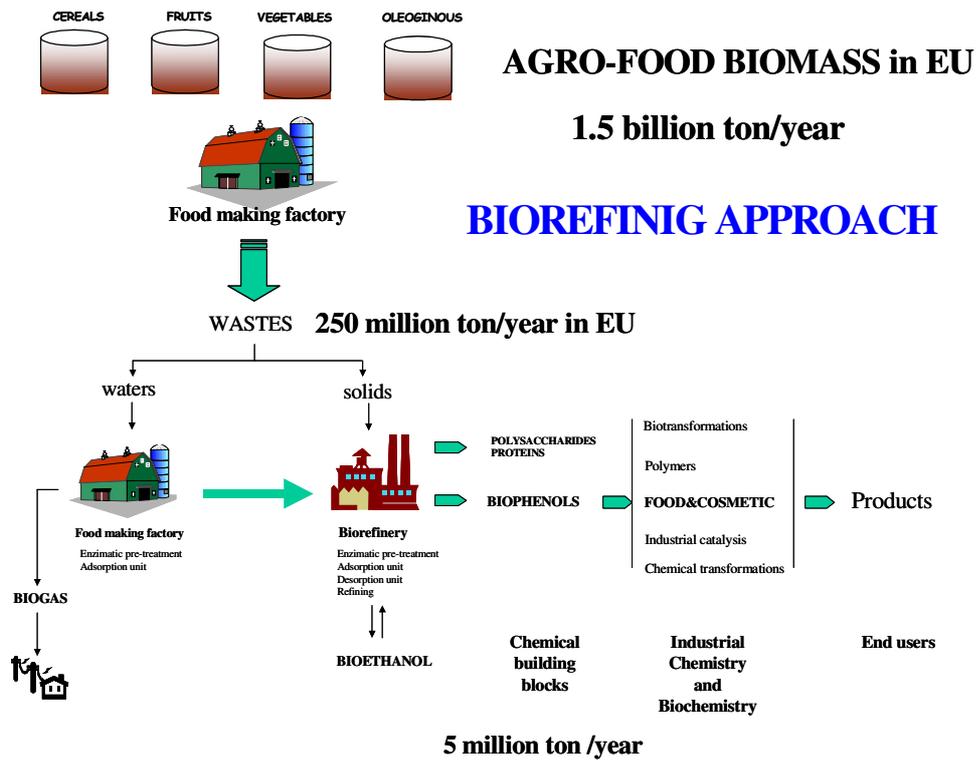


Figura 1.8. Schema di approccio integrato alla valorizzazione completa dei sottoprodotti dell'agroindustria tramite processi di bioraffinazione chimico-energetica.

Il primo problema da affrontare sono le caratteristiche fisiche del sottoprodotto da trattare all'interno di un processo di bioraffinazione; per le matrici solide, infatti, al fine di rendere le molecole d'interesse disponibili per gli step di recupero delle frazioni fenoliche dai diversi tessuti vegetali è necessario disgregare le matrici stesse. Le tecniche di disgregazione dei tessuti vegetali prevedono attualmente l'utilizzo di trattamenti chimici (acidi, basi, solfito), e quelle di estrazione della componente fenolica dalle matrici vegetali con solventi organici come metanolo, etanolo, acetone oppure attraverso tecniche costose come i fluidi supercritici.

Un buon esempio di biomassa solida è rappresentato dalla crusca di grano; in Italia COLDIRETTI ha stimato che la produzione di grano per il 2007 è stata di 7,4 milioni di tonnellate¹¹, il che considerando che la crusca rappresenta circa il 10-20% del chicco¹², ha portato ad avere una quantità di sottoprodotto pari a 0,74-1,48 milioni di tonnellate. Nel caso della crusca, processi di idrolisi acida o basica, consentono di ottenere il rilascio in soluzione acquosa di pentosani e sostanze fenoliche, ma tali processi presentano varie problematiche come l'utilizzo di sostanze pericolose, le alte concentrazioni di sali nei prodotti neutralizzati etc., e sono dunque difficilmente industrializzabili in impianti di facile gestione.

In seguito al processo di estrazione, inoltre, gli scarti devono essere trattati come rifiuti speciali, con conseguente elevato costo di smaltimento per l'estrattore, nonché elevate problematiche ambientali.

L'utilizzo di biocatalizzatori enzimatici per ottenere l'idrolisi delle strutture vegetali, al fine di recuperare la frazione fenolica, può costituire un'interessante alternativa rispetto ai processi chimici sia dal punto di vista economico che ambientale. Diverse specie microbiche, soprattutto fungine, producono normalmente enzimi idrolitici come xilanasi, pectinasi, aril-esterasi etc. al fine di aggredire le pareti cellulari vegetali piante.

Esistono ormai diversi prodotti commerciali utilizzati, per esempio, nell'industria della panificazione, della produzione di succhi e conserve, in enologia e nella produzione di birra, a base di enzimi idrolitici di diverso tipo. Questi di prodotti sono ottenuti per via fermentativa da diversa specie di funghi, tra i quali i più diffusi appartengono ai generi *Aspergillus* e *Trichoderma*. Prodotti con elevate attività xilanasiche, amilasiche e cellulasiche possono consentire di disgregare le strutture polisaccaridiche delle matrici vegetali rilasciando polifenoli in soluzione. Biocatalizzatori enzimatici altamente efficienti, a basso costo e sicuri in quanto di grado alimentare rappresentano la tecnologia più interessante al fine di implementare una tecnologia di idrolisi delle matrici vegetali e rilascio della componente fenolica efficiente e a basso impatto per processi di bioraffinazione.

Per ciò che riguarda i sottoprodotti di tipo liquido, se da un lato non si ha più il problema di dover disgregare la matrice che costituisce la biomassa avendo già in forma biodisponibile le componenti di interesse, dall'altra resta il problema della movimentazione di tali acque reflue; questa operazione estremamente dispendiosa dati gli ingenti volumi e la bassa concentrazione di biofenoli, consisterebbe nello spostare il sistema tecnologico in due diversi impianti di lavorazione:

1) nel luogo di produzione del refluo liquido saranno allestiti impianti di pretrattamento ed estrazione della componente fenolica tramite processi di adsorbimento su resine polimeriche (unità locali). Le acque reflue saranno ulteriormente trasformate *in situ* con la conversione in biogas per la fornitura di energia. Il recupero del biogas è la tecnologia generalmente utilizzata nelle piccole e medie aziende agroalimentari, sparse sul territorio;

2) all'interno dell'impianto centralizzato di bioraffinazione avvengono i processi di estrazione dalle resine che provengono dalle diverse unità locali sparse sul territorio. I fenoli estratti dai supporti solidi vengono poi inviati ad impianti di purificazione e finishing per l'ottenimento di *chemical building blocks* di purezza adeguata per i successivi utilizzi. All'interno della bioraffineria le resine saranno anche rigenerate e predisposte per il rinvio alle unità locali.

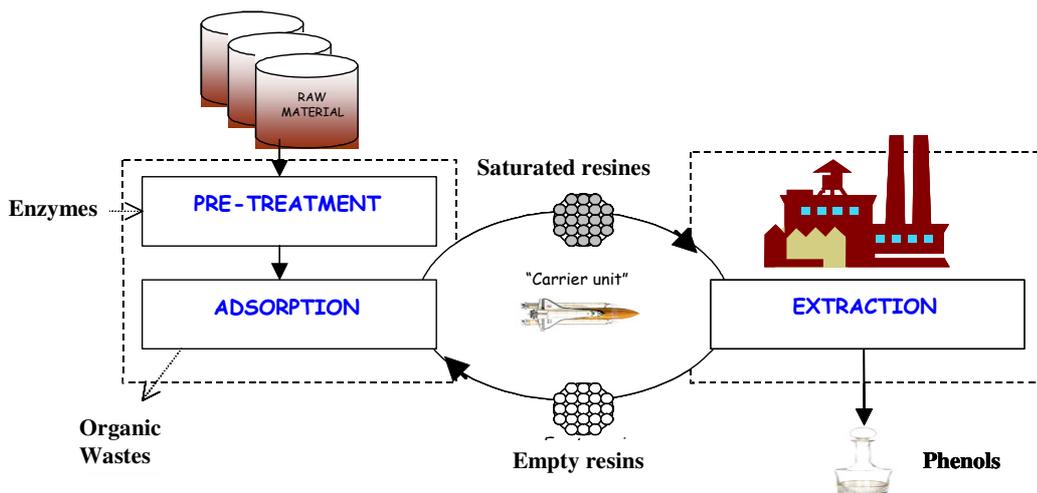


Figura 1.10. Schema del processo di recupero della frazione fenolica da reflui liquidi delle produzioni agroindustriali basato su processi di adsorbimento e desorbimento su resine polimeriche.

Un buon esempio di uno scarto agroindustriale di tipo liquido che ben si presta ad un processo integrato di questo tipo sono le acque di vegetazione provenienti dalle industrie olearie e che rappresentano il sottoprodotto principale della produzione dell'olio d'oliva.

Dopo il recupero dei fenoli, la produzione di biopolimeri, biogas e bio-etanolo, gli eventuali residui - in modo da chiudere completamente il ciclo di produzione - verranno definitivamente recuperati come rifiuti organici in appositi sistemi di raccolta e di trattamento (compostaggio tramite la digestione anaerobica), come fertilizzanti organici o ammendanti per uso agricolo.

La parete cellulare vegetale.

Funzioni e costituenti polisaccaridici.

Le cellule vegetali sono cellule eucariote che si differenziano da quelle animali, anch'esse eucariote, per la presenza di una parete cellulare.

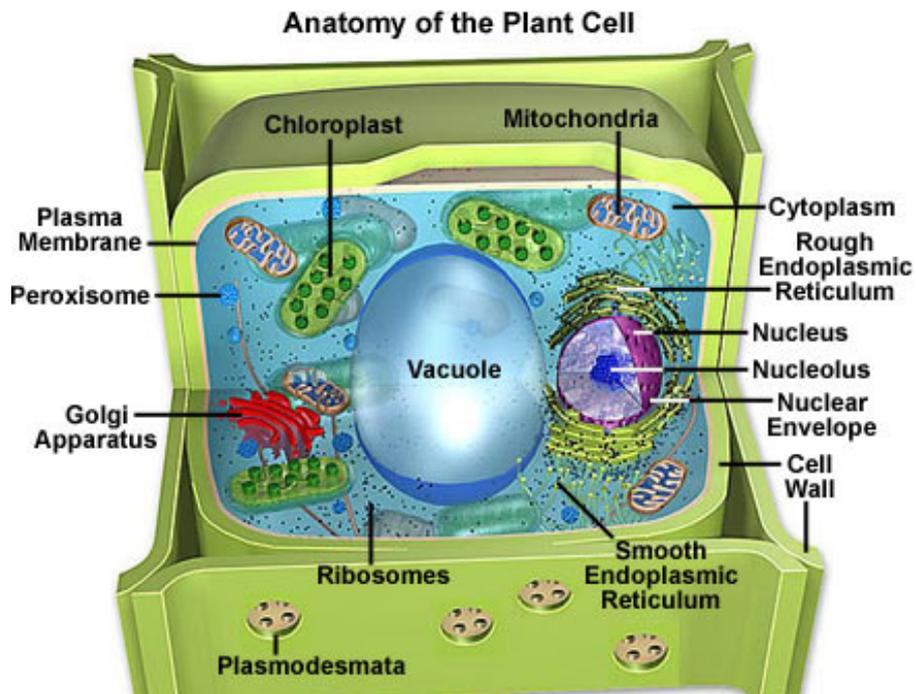


Figura 1.11. Rappresentazione di una cellula vegetale vista in sezione¹³.

1.Introduzione

La parete cellulare costituisce l'involucro esterno della cellula (figura 1.11), si sviluppa attorno alla plasma membrana ed adempie a numerose funzioni, prima tra tutte quella di fungere da barriera fisica tra il contenuto della cellula e l'ambiente circostante.

Le funzioni principali della parete cellulare sono:

- conferire alla cellula una determinata forma;
- supporto strutturale e meccanico;
- regolazione della diffusione di materiale attraverso la cellula;
- protezione contro gli agenti patogeni mediante il rilascio di metaboliti che ne inibiscono la crescita, e in generale contro l'ambiente circostante;
- controbilanciare la pressione interna della cellula;
- permettere interazioni tra cellula e cellula.

La parete cellulare ha una struttura molto complessa che cambia man mano che la cellula cresce, nelle cellule giovani è più elastica e sottile mentre in quelle più adulte risulta più robusta.

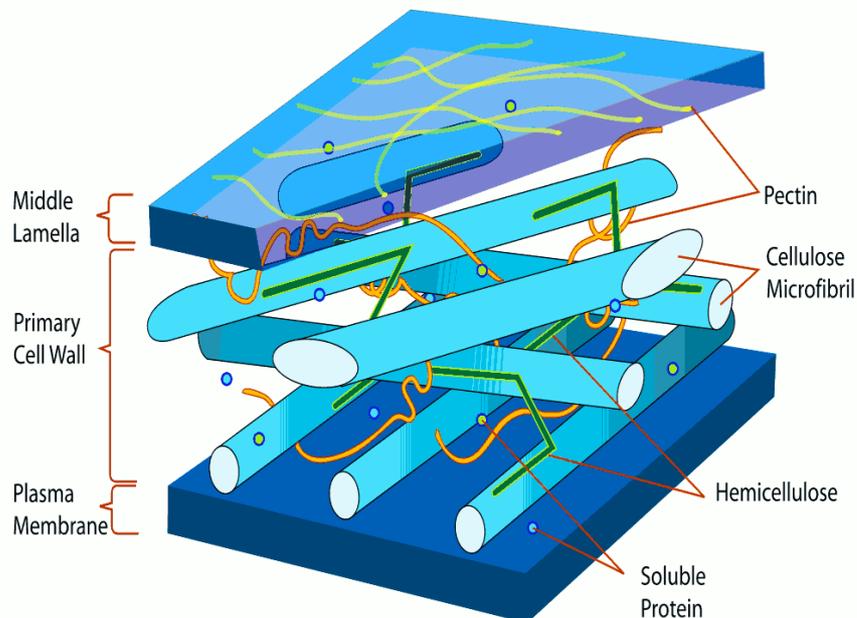


Figura 1.12. Struttura della parete cellulare¹³.

La parete cellulare delle cellule vegetali è costituita principalmente da polisaccaridi e in misura minore da glicoproteine, esteri fenolici, minerali ed enzimi. I principali polisaccaridi che costituiscono la parete cellulare sono:

- cellulosa;
- emicellulosa;
- pectina.

La cellulosa (Figura 1.13) è un polimero lineare costituito da unità di D-glucosio legate tra loro da legami β -1,4 glicosidici; questo polisaccaride è usato in natura principalmente come materiale strutturale per conferire forza e rigidità alle piante.

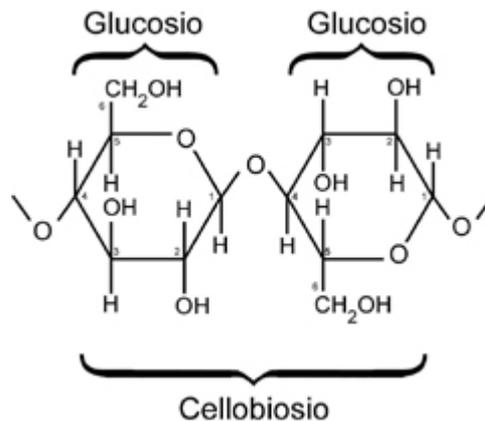


Figura 1.13. Struttura del cellobiosio, unità costituente il polimero di cellulosa.

L'emicellulosa è un gruppo di polisaccaridi ramificati di varia struttura, ma omologhi alla cellulosa in quanto possiedono una catena principale i cui monomeri presenti in quantità maggiori sono alcuni zuccheri esosi (glucosio, mannosio e galattosio) e pentosi (arabinosio e xilosio) policondensati in modo analogo al glucosio nella cellulosa, ovvero mediante legami β -1,4. L'emicellulosa predominante in molte pareti cellulari è lo xiloglucano; altre emicellulose sono il glucuronoxilano, l'arabinoxilano, il glucomannano e il galattomannano.

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

1.Introduzione

La pectina è una famiglia di complessi polisaccaridi ad elevato peso molecolare (tra i 20 e i 400 KDa) e di natura acida, che contribuiscono largamente alla formazione dei tessuti specialmente dei frutti e delle parti vegetali eduli.

Da un punto di vista chimico, l'unità monometrica del polisaccaride è costituita dall'acido D-galatturonico che polimerizza mediante legami α -1,4; questa catena è intervallata da residui di 1,2-L-ramnosio. Nella struttura sono presenti anche altri carboidrati come D-galattosio, L-arabinosio, D-xilosio e L-fucosio che formano ramificazioni nella molecola.

Fino ad oggi sono state caratterizzate tre classi di polisaccaridi pectici:

- omogalatturonano (HG);
- ramnogalatturonano (RGI);
- galatturonani sostituiti (SG).

L'omogalatturonano (figura 1.14) è una catena lineare la cui unità monometrica è l'acido D-galatturonico che polimerizza mediante legami α -1,4, nella quale alcuni gruppi carbossilici sono esterificati con metanolo. L'omogalatturonano costituisce il 60% dei polisaccaridi peptici nella parete cellulare. Molti organismi patogeni possiedono enzimi (endo ed eso galatturonasi e liasi) in grado di frammentare le catene di omogalatturonano.

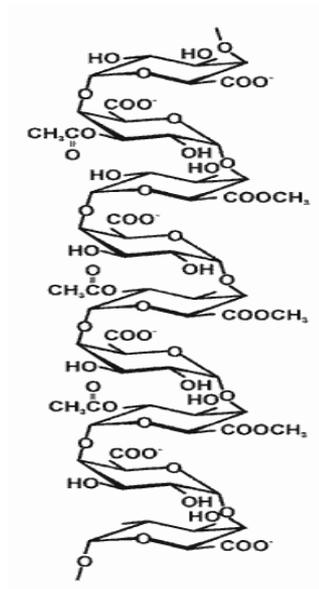


Figura 1.14. Struttura dell'omogalatturonano.

Il ramnagalatturonano (rappresentato in figura 1.15) è un polisaccaride la cui unità monometrica è il disaccaride 4- α -D-Galp-(1,2)- α -L-Rhap1, dove “Gal” sta per acido D-galatturonico e “Rha” per L-ramnosio. Sono poi presenti vari gruppi laterali, principalmente arabinani e galattani.

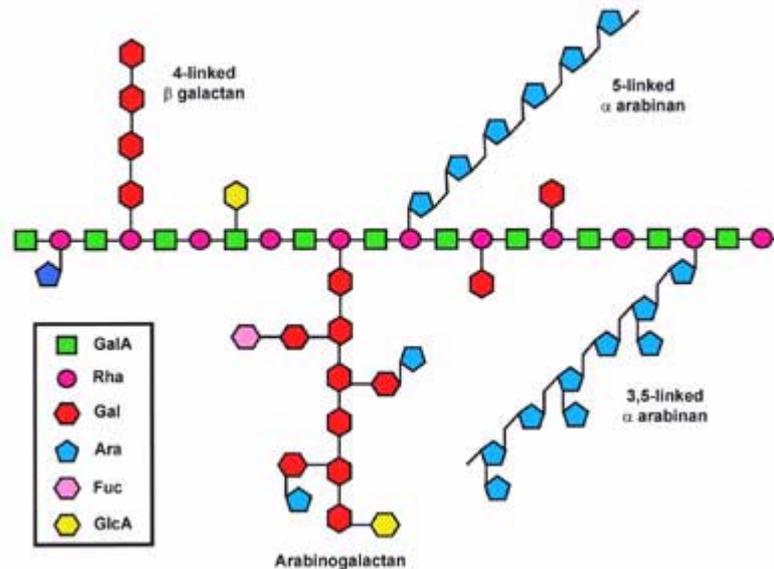


Figura 1.15. La rappresentazione del ramnagalatturonano (RGI)

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

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

Costituenti non polisaccaridici: glicoproteine e lignina.

Le glicoproteine non enzimatiche della parete cellulare vegetale sono un componente minoritario di queste strutture vegetali e generalmente non eccedono il 10% del peso secco della parete cellulare primaria. Questa componente per lungo tempo è stata considerata poco più che una struttura addizionale e di rinforzo della parete cellulare vegetale. Le interconnessioni tra proteine e polisaccaridi infatti rinforzano le interazioni tra i polimeri che costituiscono parete cellulare. Sono inoltre presenti interazioni tra proteine di parete e strutture ligniniche in alcune piante. Esistono legami tra le catene laterali fenoliche dei residui di tirosina nelle proteine ricche in glicina che sembrano essere coinvolti anche nella deposizione della lignina e i gruppi tirosina migliorano il cross-linking delle proteine nella lignina.

Recentemente il ruolo meramente strutturale delle glicoproteine non enzimatiche di membrana è stato ampiamente rivalutato. Tali strutture sembrano essere infatti coinvolte in diversi importantissimi processi del metabolismo e della crescita della cellula vegetale. Alcune proteine come l'estensina sono coinvolte nei meccanismi assemblaggio e di crescita della parete cellulare, altre proteine ricche in prolina, sono coinvolte nei meccanismi di difesa innescati dalle aggressioni dei patogeni. Queste ed altre complesse funzioni, la maggior parte delle quali ancora da chiarire, ricoperte dalle proteine della parete cellulare dimostrano che il loro ruolo non è esclusivamente quello meramente strutturale ma anche quello di interconnettere le diverse strutture cellulari creando un continuum tra plasmamembrana e parete cellulare, funzione essenziale per il recepimento dei segnali che alla cellula arrivano dall'ambiente esterno¹⁴.

La lignina è un polimero fenolico estremamente resistente presente in piante legnose e non, associato strettamente alla parete cellulare. La lignina è il secondo più abbondante composto organico naturale dopo la cellulosa. È sintetizzata dai vegetali a partire da monomeri di alcoli fenolici (*para*-cumaroil, coniferil e sinapil alcoli) tramite deidrogenazione mediata da perossidasi. Le principali funzioni della lignina sono quelle di conferire resistenza meccanica e chimica a protezione

della pianta dalle aggressioni dei patogeni, e di mantenimento del giusto grado di idratazione viste le proprietà di impermeabilizzante.

Monocotiledoni e dicotiledoni.

I vegetali possono essere suddivise in due grandi famiglie, che si differenziano tra l'altro per quella che è la composizione della parete cellulare: le monocotiledoni e le dicotiledoni.

Una tipica cellula di monocotiledone (figura 1.18) possiede una parete cellulare costituita al 25% da cellulosa, al 55% da emicellulosa e da solo un 10% di pectina.

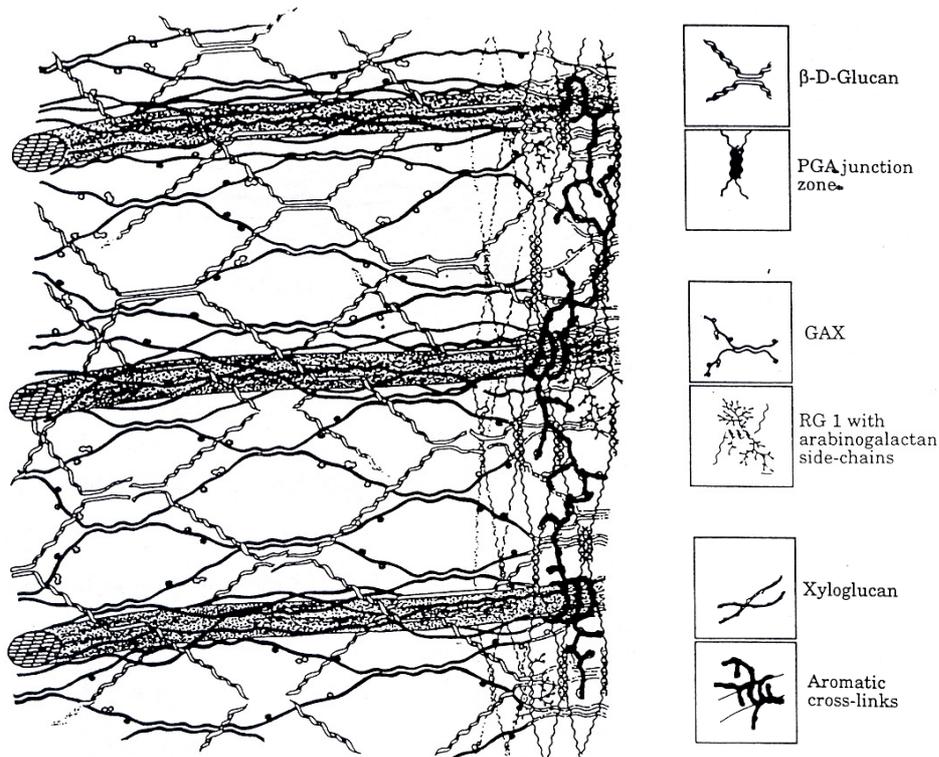


Figura 1.18. La rappresentazione schematica di una parete cellulare di monocotiledone¹⁵

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

1.Introduzione

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

Una tipica cellula di dicotiledone (figura 1.19) invece possiede una parete cellulare costituita al 30% da cellulosa, al 30% da emicellulosa, al 35% di pectina e da un 1-5% di proteine strutturali.

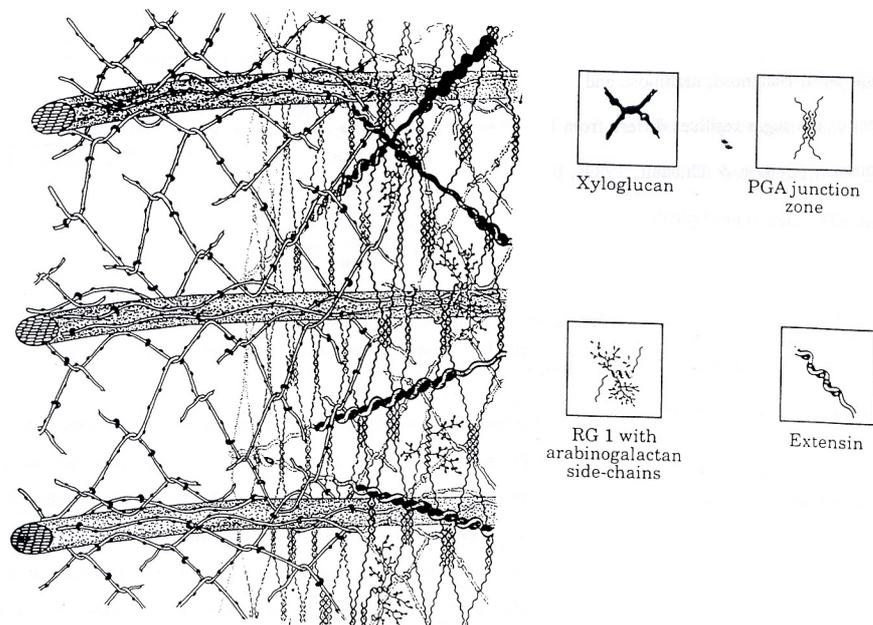


Figura 1.19. La rappresentazione schematica di una parete cellulare di dicotiledone

Fanno parte di questa famiglia numerose piante tra le quali il pesco, l'albicocco, il ciliegio, il pero, il melo e il pomodoro.

Si conosce ancora poco per quel che riguarda l'organizzazione e l'interazione fra i vari costituenti le pareti cellulari vegetali. A questo proposito sono stati proposti vari modelli in cui si ipotizzano gli assemblaggi e le interazioni tra le diverse strutture macromolecolari delle pareti cellulari. Un modello, in cui si ipotizza l'organizzazione dei polisaccaridi nella parete cellulare di una pianta dicotiledone è stato proposto da Jean-Paul Vincken *et al.*¹⁶ 2004 è rappresentato in figura 1.20. Gli autori ritengono che le catene di cellulosa siano legate tra loro con legami a

idrogeno e a formare un materiale cristallino insolubile e anelastico. Le fibre di cellulosa dovrebbero poi essere interconnesse a macromolecole emicellulosiche con legami a idrogeno a loro volta sono incluse in una matrice complessa costituita da pectina.

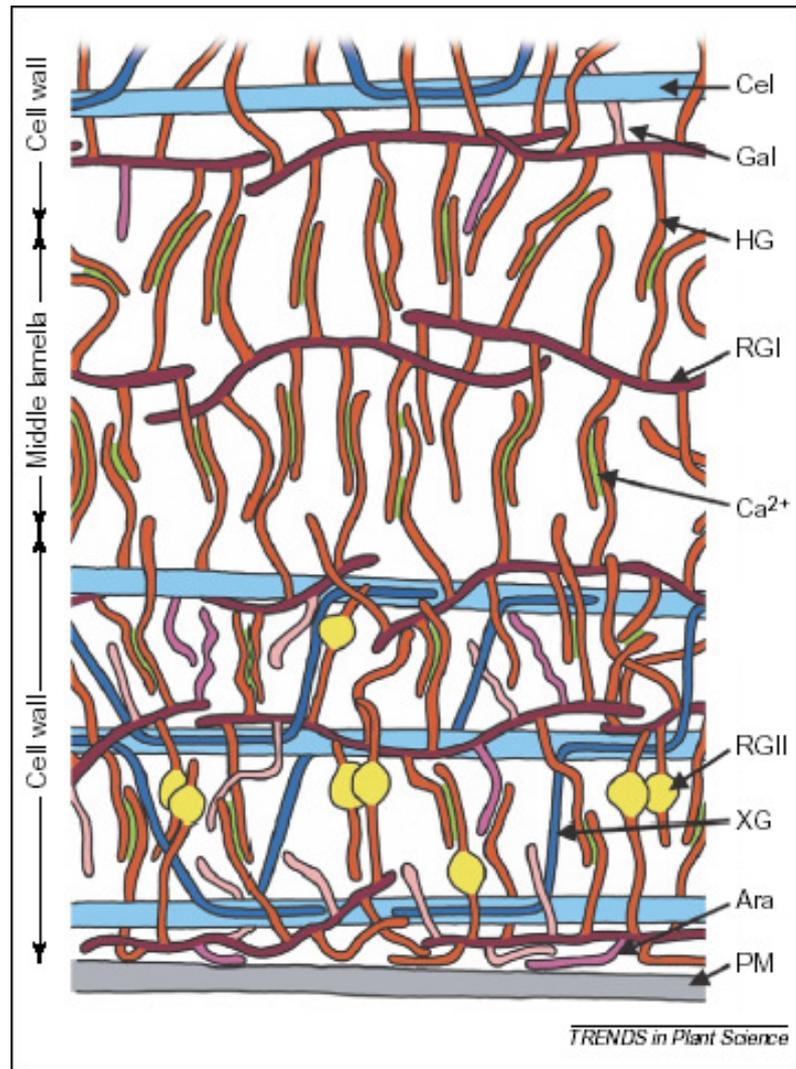


Figura 1.20. Rappresentazione del modello di organizzazione dei polisaccaridi all'interno di una parete cellulare di una cellula dicotiledone, proposto da Jean-Paul Vincken. (PM=plasma membrana; Ara=Arabinani; XG=xiloglucano; RGII=ramnogalatturonano II; RGI=ramnogalatturonano I; HG=omogalatturonano; Gal=galattani; Cel=cellulosa)

Biocatalizzatori industriali per l'idrolisi dei tessuti vegetali.

I biocatalizzatori enzimatici sono sempre più largamente impiegati in molti settori dell'industria chimico-farmaceutica e della e trasformazioni agroalimentari a causa della loro intrinseca regio e stereo-selettività, nonché per il loro potenziale come efficienti catalizzatori alternativi per la chimica verde. I principali vantaggi tecnologici dell'impiego dei biocatalizzatori consiste nella possibilità di effettuare processi ad elevata efficienza in ambiente acquoso e in condizioni operative (pH, temperatura, pressione etc.) generalmente blande.

Il settore delle trasformazioni alimentari, da svariati anni ormai, fa largo uso di preparati enzimatici come additivi tecnologici in moltissimi processi. Dall'utilizzo di lipasi, libere o immobilizzate, nelle trasformazioni degli acidi grassi¹⁷, all'impiego di proteasi per la trasformazione delle carni¹⁸ sino all'impiego dell'amplessima classe delle carboidrasi, sfruttate in moltissimi settori, dalla produzione di succhi e puree a quella dei prodotti da forno, la stragrande maggioranza dei prodotti enzimatici commerciali è deriva da fermentazioni di funghi, lieviti e batteri. Molti microrganismi utilizzano infatti questi biocatalizzatori come strumenti per "aggredire" tessuti vegetali o animali al fine di procurarsi i substrati di crescita di cui necessitano per il proprio sostentamento.

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

Cellulasi¹⁹.

Le cellulasi (EC:3.2.1.4.) sono una classe di enzimi in grado di idrolizzare il legame β 1-4 glucosidico delle fibre di cellulosa. Industrialmente sono ampiamente utilizzate nelle industrie tessili e della produzione della pasta di cellulosa in cartiere. Industrialmente sono ottenute prettamente da funghi e muffe delle specie *Pleorotus*, *Aspergillus* e *Trichoderma*.

Le cellulasi si dividono in tre classi principali:

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

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

Emicellulasi²⁰.

Sono genericamente definite emicellulasi quella grande categoria di enzimi in grado di idrolizzare i legami glucosidici delle diverse strutture polisaccaridiche che compongono le emicellulose. Data la grande complessità e diversità delle emicellulose presenti in natura è ovvio che la stessa complessità e differenziazione si ritrovi anche nei biocatalizzatori naturalmente selezionati per l'idrolisi di tali strutture che sono genericamente classificati come EC 3.2.1.X.. Le emicellulasi sono enzimi in grado di idrolizzare polisaccaridi ramificati di varia struttura, costituiti una catena principale di zuccheri esosi (glucosio, mannosio e galattosio) e pentosi (arabiosio e xilosio) policondensati mediante legami β -1,4. Le

emicellulosa così come le emicellulasi sono usualmente classificate in base alle tipologie di zuccheri che le compongono principalmente. In natura, tra le più diffuse nelle pareti cellulari vegetali, troviamo gli xilani, i mannani, gli arabani e i galattani rispettivamente idrolizzati da xilanasi (EC:3.2.1.8.), mannanasi (EC:3.2.1.78), arabinasi (EC:3.2.1.99.) e galatturonasi (EC:3.2.1.15.).

Anche questi enzimi sono generalmente prodotti da funghi e muffe (*Trichoderma sp.*) e sono estremamente importanti in diverse applicazioni industriali come coadiuvanti delle cellulasi nelle applicazioni precedentemente descritte o in altri importanti processi come la produzione di birra.

Pectinasi²¹.

Le pectinasi sono una vasta famiglia di enzimi in grado di aggredire le diverse e complicatissime strutture poligalatturoniche dei vegetali. Questi biocatalizzatori sono tra i più diffusi per applicazioni industriali soprattutto nei settori di produzione di succhi e alimenti in generale. Si stima che questi preparati costituiscano il 25% del mercato globale degli enzimi e la più comune fonte dal quale vengono estratti e *Aspergillus niger*²².

Le pectinasi sono classificate in base al tipo di legame che idrolizzano nella struttura pectica (figura 1.21):

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

Le pectinesterasi (EC 3.1.1.11) rimuovono il gruppo metile delle pectine idrolizzando il legame estere, ove presente, del carbossile del galatturone;

Le pectin liasi (EC 4.2.2.10) idrolizzano i legami α -1,4 tra le unità di acido galatturonico tramite un meccanismo di trans eliminazione inusuale per le carboidrasi che produce dei galatturonati o metilgalatturonati insaturi.

1.Introduzione

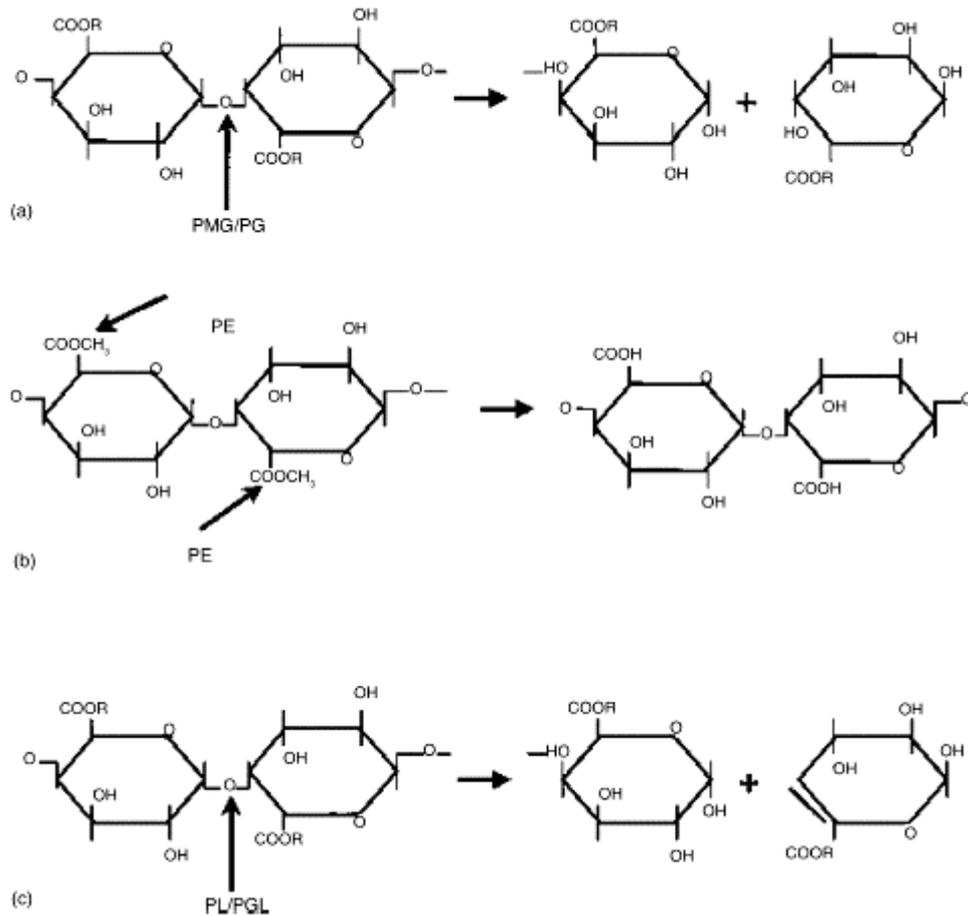


Figura 1.21. Modo d'azione delle pectinasi: (a) R = H per PG e CH₃ per PMG; (b) PE; e (c) R=H per PGL e CH₃ per PL. La freccia indica il legame idrolizzato dalla pectinasi. PMG, polimetilgalatturonasi; PG, poligalatturonasi (EC 3.2.1.15); PE, pectinesterasi (EC 3.1.1.11); PL, pectin liasi (EC-4.2.2.10) (Da Jayani *et al.* 2005).

Aril esterasi²³

Le aril esterasi sono enzimi in grado di idrolizzare i legami estere tra la funzionalità carbossilica di un fenolo acido e una funzionalità idrossile di un carboidrato facente parte delle strutture polisaccaridiche della parete cellulare vegetale. I fenoli esterificati principalmente presenti nelle pareti cellulari vegetali sono l'acido cumarico, l'acido cinnamico e l'acido ferulico. Quest'ultimo è soprattutto presente anche grazie alla sua capacità di formare diverse tipologie di dimeri che consentono di creare strutture a ponte tra due catene polisaccaridiche conferendo alla struttura una maggiore stabilità e resistenza meccanica. In piante

dicotiledoni come gli spinaci e la barbabietola da zucchero, l'acido ferulico è generalmente legato al gruppo idrossile C-6 dei β -1,4-galattani e al gruppo idrossile C-2 degli α -1,5-L arabinani. In piante monocotiledone ed erbe, come bambù, canna da zucchero, grano e granturco l'acido ferulico esterifica i gruppi idrossile C-4 dello xilosio degli xiloglucani e i gruppi idrossile C-5 dell'arabinosio degli arabinoxilani.

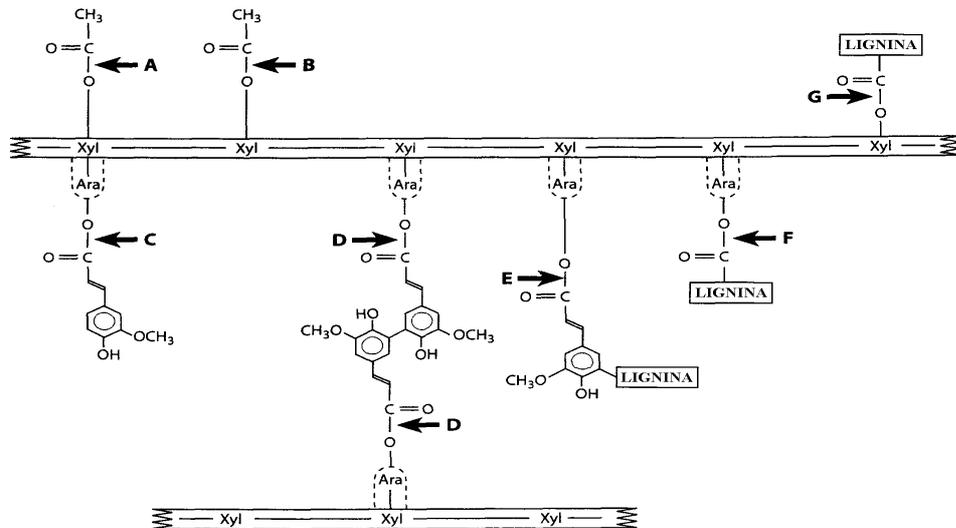


Figura 1.22. Struttura generale e semplificata dell'arabinoxilano. Dalle catene xiliche partono delle ramificazioni di arabinosio. I legami esterei substrato delle aril esterasi sono: A) gruppo 2-O-acetilico; B) gruppo 3-O-acetilico; C) gruppo 5-O-ferulico; D) gruppi 5-O-diferulici (dimero con legami 5-5'); E) 5-O-feruloil-lignina; F) arabinosio-lignina; G) xilosio-lignina²⁴.

Le feruloil esterasi (EC 3.1.1.73) sono state recentemente suddivise in famiglie, A-D, in base alle proprie affinità per diverse tipologie di substrati (tabella 1.4)²⁵.

Tabella 1.4. Classificazione delle feruloil esterasi basata sulla capacità di idrolizzare metil esteri di diversi fenoli acidi (MFA: metil ferulato, MSA: Metil senapato, MpCA: metil para cumarato, MCA: metil caffeato), rilasciare dimeri ferulici 5-5' da substrati modello e complessi e in base alle identità della sequenza amminoacidica primaria con altri enzimi.

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

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

Proteasi³⁰

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

Le proteasi³¹ sono classificate in quattro gruppi principali a seconda del loro meccanismo di azione:

serin-proteasi (chimotripsina, tripsina, elastasi etc.) tutte inibite dal diisopropilfosforofluoridato, contengono dei residui di serina e istidina coinvolti nel meccanismo di idrolisi al sito catalitico; esse basano il loro meccanismo di catalizzazione alla presenza della serina, un' amminoacido polare;

sulfidril-protesi (papaina, bromelaina, etc.) inibite da reagenti sulfidrilici, contenenti residui cisteinici e istidinici al sito catalitico;

metallo proteasi (carbossipeptidasi A e B) esopeptidasi che richiedono un cofattore metallico;

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

Xilanasi.

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

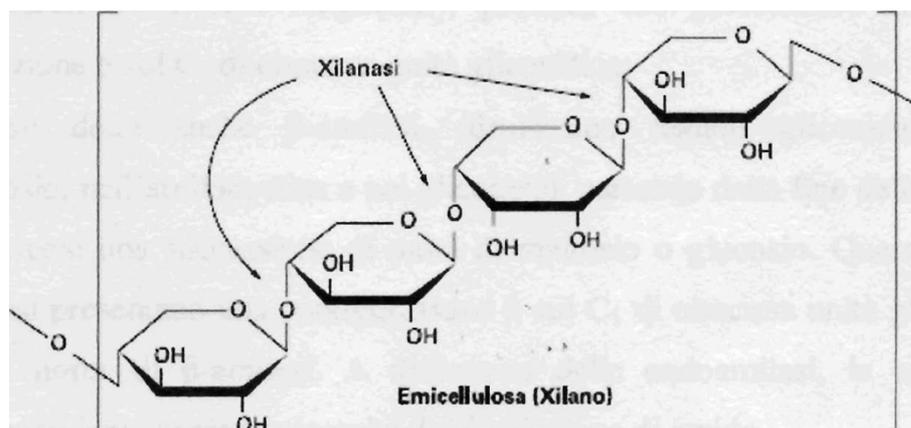


Figura 1.23. Rappresentazione dello xilano e dei legami che vengono idrolizzati dalle xilanasi

Lo xilano è il polisaccaride non celluloso più abbondante, presente nella parete secondaria delle cellule vegetali il quale forma una sorta di interfase tra la lignina

e gli altri polisaccaridi. Le molecole di xilano sono legate covalentemente alla lignina attraverso residui fenolici, e interagiscono con gli altri polisaccaridi come la pectina e il glucano. Lo xilano costituisce il composto polimerico più importante dell'emicellulosa³².

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

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

Amilasi³³.

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

- Endamilasi: sono piccole proteine enzimatiche di basso peso molecolare (20-25 kDa), dette anche α -amilasi, che catalizzano l'endoidrolisi dei legami 1,4- α -D-glucosidici di oligosaccaridi e polisaccaridi contenenti tre o più residui. L'enzima agisce in maniera casuale su amido, glicogeno e molecole ad esse correlate. Il termine α non si riferisce al tipo di legame glicosidico che viene idrolizzato, ma alla configurazione degli zuccheri prodotti che, infatti, presentano una configurazione α sul C₁ di ciascuna unità glicosidica;
- Esoamilasi: dette anche β -amilasi le quali idrolizzano i legami glicosidici α 1,4 nell'amilosio, nell'amilopectina e nel glicogeno, partendo dalla fine della catena e formando così una successione di unità di maltosio o glucosio. Questi prodotti dell'idrolisi presentano una configurazione β sul C₁ di ciascuna unità glicosidica, da qui il nome di β -amilasi. A differenza delle endoamilasi, le esoamilasi diminuiscono lentamente la viscosità della soluzione di amido;
- Gamma-amilasi.

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

2. PARTE SPERIMENTALE

Dalle produzioni agroindustriali si possono ottenere sottoprodotti di tipo liquido, un classico esempio sono le acque di vegetazione olearie che derivano dagli impianti di produzione dell'olio d'oliva ricche in polifenoli tra cui oleuropeina ed idrossitirosole noti per le loro benefiche proprietà antiossidanti²⁶, oppure solido, come nel caso della lavorazione del grano dal quale si ottengono elevate quantità di crusca la quale contiene all'interno della sua struttura molecole di acido ferulico, anch'esso fenolo di grande interesse.

È ovvio che l'approccio in termini di processo di bioraffinazione sarà diverso a seconda dello stato fisico della biomassa considerata.

Scarti agroalimentari liquidi: acque di vegetazione delle olive.

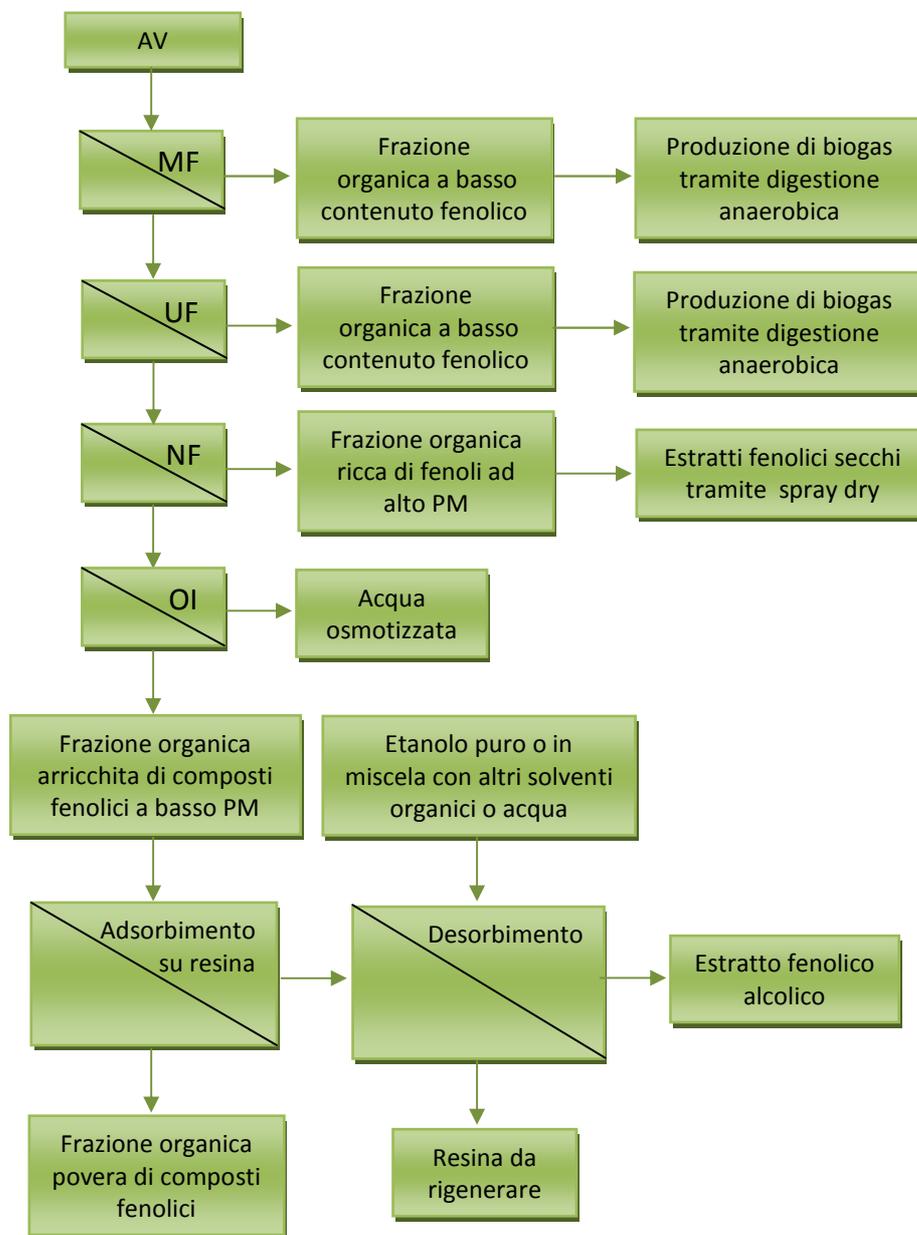


Figura 2.1. Processo di bioraffinazione di acque di vegetazione tramite filtrazione a membrana²⁷ e successiva purificazione cromatografica²⁸.

Le acque di vegetazione costituiscono il sottoprodotto che può derivare da impianti per la molitura delle olive e produzione dell'olio di tipo bifasico oppure trifasico. Il loro smaltimento è uno dei maggiori problemi dell'agro-industria visto l'elevato

2. Parte sperimentale

contenuto di COD, di polifenoli (molecole antiossidanti con spiccate proprietà biologiche), molecole fitotossiche e batteriostatiche e per il pH^{27,29,30}. Un refluo di questo tipo non può essere sparso tal quale sui terreni agricoli senza dare luogo nel breve termine a problemi di inquinamento delle falde acquifere ma questo fenomeno non si può escludere nel lungo termine per effetto della lisciviazione delle componenti più recalcitranti che si possono accumulare nel terreno come conseguenza dei continui spandimenti. Le ricerche fino ad oggi hanno puntato alla depurazione di questo scarto tramite l'ossidazione dei polifenoli con processi chimico-fisici o tecniche di fermentazione aerobica o anaerobica per la produzione di biogas o bioetanolo^{27,31}.

Nel caso di uno scarto liquido, come le acque di vegetazione (AV) si possono avere due diversi processi di valorizzazione a seconda dell'impianto oleario schematizzati come nei flow sheets riportati in figura 2.1: esistono infatti impianti in cui vengono effettuati a valle della produzione olearia degli step successivi di filtrazione a membrana^{27,29,32} (Figura 2.1), che possono essere seguiti da processi di separazione cromatografica^{27,33,34,35}, oppure processi diretti di separazione cromatografica che hanno già dimostrato una loro sostenibilità tecnica ed economica (Figura 2.2).

Un nuovo sistema di valorizzazione integrata delle AV è quello descritto in figura 2.1. Nel processo di bioraffinazione schematizzato, sono state inserite unità di filtrazione a membrana, grazie alle quali è possibile valorizzare le AV in tre modi distinti^{2,4}: recupero di energia dopo le prime unità di micro ed ultrafiltrazione (MF, UF) tramite l'invio della frazione organica a basso contenuto fenolico a digestione anaerobica per la produzione di biogas; recupero di parte dell'acqua utilizzata nell'impianto oleario all'uscita dell'unità di osmosi inversa (OI); recupero, a valle delle unità di nanofiltrazione (NF) e OI, di una frazione organica ricca in componenti fenoliche a basso peso molecolare tra cui idrossitirosole, molecole di elevato interesse. Il recupero di queste molecole attive può essere effettuato tramite una successiva separazione cromatografica con specifiche matrici polimeriche assorbenti²⁹.

La microfiltrazione, l'ultrafiltrazione, la nano filtrazione e l'osmosi inversa sono processi di filtrazione che permettono di separare diverse frazioni chimiche

contenute in matrici complesse come quelle di scarto agro-alimentare attraverso la scelta di opportuni tagli molecolari. Questa tecnologia si presta molto bene ad essere applicata all'interno dei processi di bioraffinazione descritti in precedenza per in quanto arrivando ad effettuare separazioni dell'ordine di 10^{-2} - 10^{-3} micron consentono di ottenere delle frazioni acquose altamente concentrate in termini di polifenoli, molecole che caratterizzano le acque di vegetazione delle olive.

Operativamente le diverse tecniche di filtrazione poste in sequenza permettono di eseguire una vera e propria raffinazione della matrice allo stesso modo di una distillazione petrolchimica, infatti:

- **la microfiltrazione** - permette di separare la frazione sospesa di solidi, colloidali, proteine e microrganismi,
- **l'ultrafiltrazione** - separa macromolecole di diverso peso molecolare di alto-medio peso molecolare,
- **la nano filtrazione** - opera una separazione dei monomeri come zuccheri e molecole a bassi pesi molecolari,
- **l'osmosi inversa** - separa la parte salina e permette così di recuperare l'acqua.

La filtrazione di tipo tangenziale utilizzando membrane tubulari o fibra cava ha consentito di applicare questa tecnologia in continuo riducendo enormemente il fenomeno di clogging delle membrane³⁶.

Esistono diversi processi che utilizzano questo tipo di filtrazione a membrana³⁷; negli USA tali tecnologie vengono attualmente utilizzate per diverse applicazioni³⁷, mentre in Italia sono ancora poco sfruttate e si fermano al trattamento di acque reflue, alla potabilizzazione dell'acqua di mare, anche se sono in continuo aumento i brevetti per l'applicazione in diversi campi della tecnologia di filtrazione a membrana³⁷.

Naturalmente sul mercato esistono diversi tipi di membrana (es: a spirale avvolta, tubolari, a fibra cava e piane³⁸) che si differenziano non solo per la loro struttura, ma anche per il materiale di cui sono costituite, caratteristica fondamentale dal momento che si deve evitare che si instaurino interazioni tra i soluti che si vogliono recuperare e la membrana filtrante³⁷.

2. Parte sperimentale

Le membrane tubolari hanno una buona tolleranza ai solidi sospesi, risentono poco degli effetti di fouling, cioè intasamento della membrana, sono facilmente pulibili, hanno un basso rapporto superficie/volume trattato, il che si traduce in impianti relativamente poco ingombranti per il trattamento di grossi volumi di liquidi, ma a differenza delle altre membrane hanno un costo medio-alto. Tra queste ne esistono alcune in ceramica³⁹, materiale che risulta essere inerte alla presenza di fenoli nei liquidi da trattare, come nel caso della bioraffinazione di biomasse agroindustriali.

Per quanto riguarda la purificazione cromatografica della frazione fenolica arricchita in polifenoli a basso PM ottenuta all'uscita dell'unità di OI, è necessario porre in contatto la matrice solida costituita dalla resina polimerica, con il liquido, in un rapporto costi-benefici che permetta un ottimo recupero a bassi costi di *chemicals* ad alto valore aggiunto. Una volta adsorbiti sulla matrice polimerica i polifenoli devono essere rilasciati utilizzando un solvente opportuno rappresentato da una miscela di etanolo acido per acido cloridrico, ottenendo così a valle dell'intero processo di bioraffinazione un estratto fenolico alcolico che verrà poi trattato al fine di poter utilizzare l'intero pool di molecole recuperate assieme o singolarmente^{27,28}.

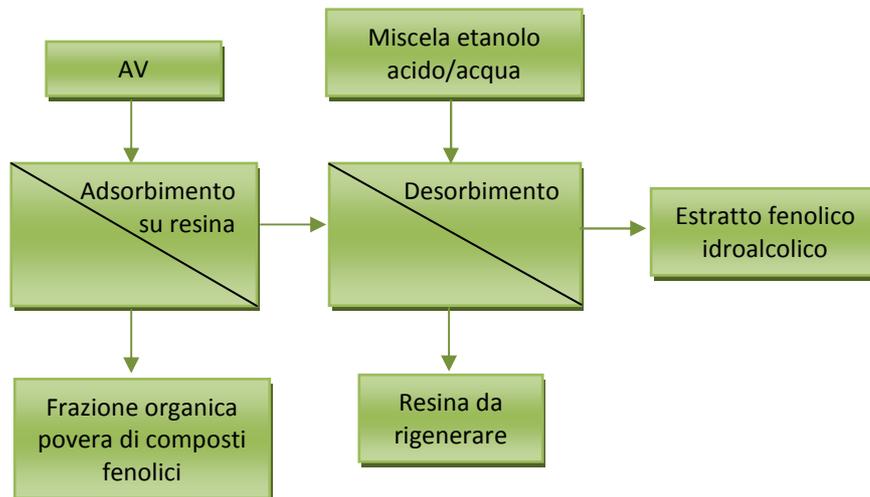


Figura 2.2. Processo di bioraffinazione di acque di vegetazione delle olive tramite purificazione cromatografica.

Nel secondo processo di bioraffinazione schematizzato, mancando le varie unità di filtrazione a membrana, che di fatto vanno a concentrare le acque di

vegetazione, verrà direttamente inviato alla fase di purificazione cromatografica lo scarto dell'impianto di produzione dell'olio che avrà quindi una minor concentrazione di *chemicals* fenolici. Anche in questo caso comunque a valle del processo di recupero, avremo comunque un estratto alcolico arricchito in polifenoli.

Separazione con filtrazione a membrana.

Le acque di vegetazione delle olive sono sostanzialmente caratterizzate da polpa di olive, mucillagini, pectine, olio e sostanze organiche tra cui zuccheri, proteine, acidi grassi, acidi organici e polifenoli²⁶; rappresentano quindi una biomassa molto ricca di *chemicals* che possono essere recuperati con processi di bioraffinazione ed utilizzati per gli usi più diversi. Tra questi *chemicals* il ruolo sicuramente più interessante da un punto di vista commerciale lo gioca la frazione polifenoli (biofenoli). La distribuzione di biofenolo nell'acque di vegetazione è significativamente variabile a seconda della *cultivar* e dello stato di ossidazione del refluo. Bianco *et al.*⁴⁰ sono riusciti ad identificare 20 differenti biopolifenoli tra cui l'idrossitirosole risulta essere certamente il più abbondante ed il più interessante dal punto di vista nutrizionale e della salute umana dimostrando spiccate proprietà antiossidanti⁴¹ in grado di inibire l'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL)⁴² e l'aggregazione delle piastrine⁴³ così come ha mostrato in-vitro attività antimicrobica⁴⁴.

Nel presente studio sono state considerate due differenti tipologie di acque di vegetazione: le prime, indicate successivamente con AV1, provengono da un impianto oleario trifasico sito in Marocco, dotato di un processo di ultrafiltrazione ed osmosi inversa al fine di recuperare l'acqua depurata per poterla riutilizzare all'interno dell'impianto oleario per la separazione dell'olio dopo molitura delle olive (Figura 2.3); le seconde, di seguito indicate con AV2, derivano invece da un impianto oleario sempre di tipo trifasico sito in provincia di Pesaro, per il quale non è previsto nessun trattamento delle acque se non lo smaltimento finale come ammendante agricolo.

2. Parte sperimentale

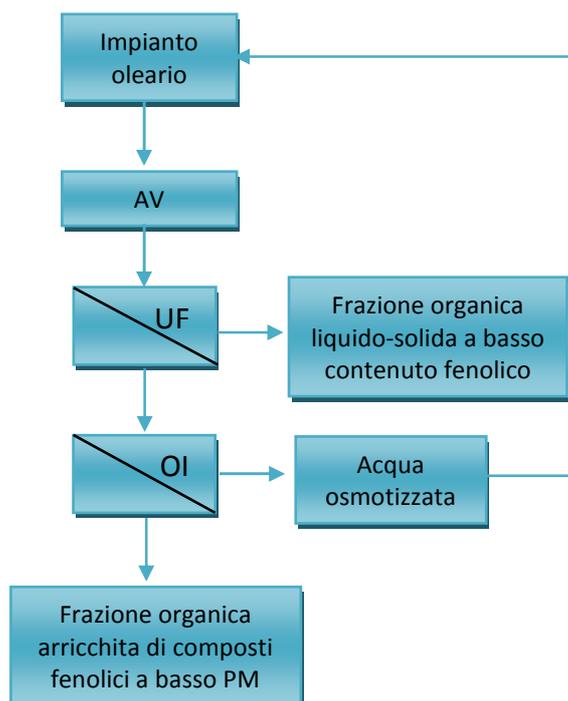


Figura 2.3. Processo di trattamento di acque di vegetazione provenienti da un impianto oleario marocchino in cui sono previsti step di ultrafiltrazione ed osmosi inversa.

In tabella 2.1, vengono riportate le caratteristiche chimico-fisiche delle due diverse tipologie di acque considerate.

Tabella 2.1. Contenuto di carboidrati e polifenoli totali, e valori di pH relativi a campioni di acque di vegetazione provenienti da impianti oleari.

	AV1	AV2
Carboidrati totali (g/l)	22,4±1,3	20,4±1,2
Polifenoli totali (mg/l)	7000±400	700±40
Idrossitirosole (mg/l)	3700±7	387±19
pH	4,6	4,4

2. Parte sperimentale

Non si hanno sostanziali differenze tra il contenuto di zuccheri ed il valore di pH nei due campioni di acque considerate, mentre il contenuto di polifenoli totali e di idrossitirosolo nelle AV1 è decisamente più elevato rispetto a quello riscontrato nelle AV2; tale differenza è ovviamente da imputarsi agli step di filtrazione a membrana inseriti a valle dell'impianto oleario, che vanno a concentrare i fenoli contenuti nello scarto in una specifica frazione a basso peso molecolare. L'effetto di concentrazione dovuta all'impianto di ultrafiltrazione è di circa 10 volte per cui queste acque di vegetazione presentano un contenuto di biofenoli abbastanza basso seppure coerente con l'ordine di grandezza riportato in letteratura di 1,5 a 10,2 g/l^{26,45}.

Il contenuto di idrossitirosolo, il cui valore medio riportato in letteratura è di 20 - 131 mg/l^{26,46}, risulta particolarmente elevato. Siccome alcuni studi, effettuati su acque di vegetazione analizzate dopo alcuni mesi dalla loro raccolta, hanno dimostrato come la concentrazione di idrossitirosolo tenda ad aumentare per effetto della trasformazione del suo precursore, l'oleuropeina⁴⁷, fino ad arrivare a valori pari a circa 3500 mg/l dopo 5 mesi di stoccaggio, allora il basso contenuto di biofenoli totali e l'alta concentrazione di idrossitirosolo, è imputabile ad una lunga gestazione dei reflui considerati. L'oleuropeina, infatti, risulta piuttosto instabile e facilmente idrolizzabile da enzimi ad attività β -glucosidasi^{48,49} dando proprio idrossitirolo come prodotto di reazione (Figura 2.4). Le esterasi sono tipici enzimi che compaiono durante la maturazione dei frutti o durante il loro deperimento.

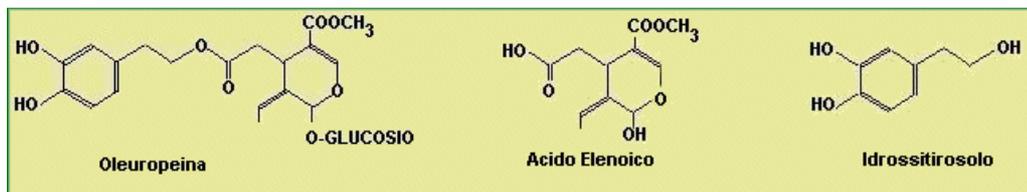


Figura 2.4. Formula di struttura di oleuropeina, acido elenolico ed idrossitirosolo.

Separazione cromatografica.

La fase di separazione cromatografica ha preso in esame diversi adsorbenti concentrandosi principalmente su alcune resine polimeriche in quanto facilmente

2. Parte sperimentale

reperibili sul mercato a costi industriali come quelle fornite da Rhom and Haas, leader mondiale nelle tecniche di separazione cromatografica (Tabella 2.2):

- Amberlite IRA 402. Resina scambiatrice anionica forte costituita da un polimero di stirene divinilbenzene funzionalizzato con trimetilammonio, con ioni cloruro come ione scambiatore. È indicata per l'adsorbimento di sostanze acide e basiche forti, e generalmente viene suggerita per diversi trattamenti delle acque;
- Amberlite FPA 51. Resina scambiatrice anionica debole costituita da un polimero di stirene divinilbenzene funzionalizzato con un'ammina terziaria, con ioni cloruro come ione scambiatore. È indicata per l'adsorbimento di sostanze organiche e colorate, e generalmente viene suggerita per essere utilizzata in processi alimentari per la decolorazione del glucosio, fruttosio e amido e in processi biofarmaceutici;
- Amberlite FPX 66. Resina neutra costituita da un polimero aromatico macroreticolare di stirene non funzionalizzato. È utilizzata in processi per la produzione di succhi e in altri processi alimentari per il recupero di materiali ad elevato valore e per purificare e decolorare gli alimenti e gli additivi alimentari. Ha inoltre un'elevata resistenza termica e fisica;
- Amberlite XAD 4. Resina neutra costituita da un polimero aromatico macroreticolare crosslinkato. È indicata per l'adsorbimento di sostanze organiche con un peso molecolare relativamente basso;
- Amberlite XAD 16. Resina neutra costituita da un polimero alifatico macroreticolare crosslinkato. È indicata per l'adsorbimento di sostanze idrofobiche da solventi polari e composti organici volatili da vapore; la sua porosità permette di adsorbire molecole organiche con un peso molecolare da relativamente basso a medio;
- Amberlite XAD 1180. Resina neutra costituita da un polimero aromatico macroreticolare crosslinkato. È indicata per l'adsorbimento di molecole organiche da soluzioni acquose o solventi polari come estratti di piante, antibiotici, e prodotti di fermentazione;
- Amberlite XAD 761. Resina a scambio ionico costituita da un polimero condensato fenolo-formaldeide crosslinkato. È funzionalizzata principalmente

2. Parte sperimentale

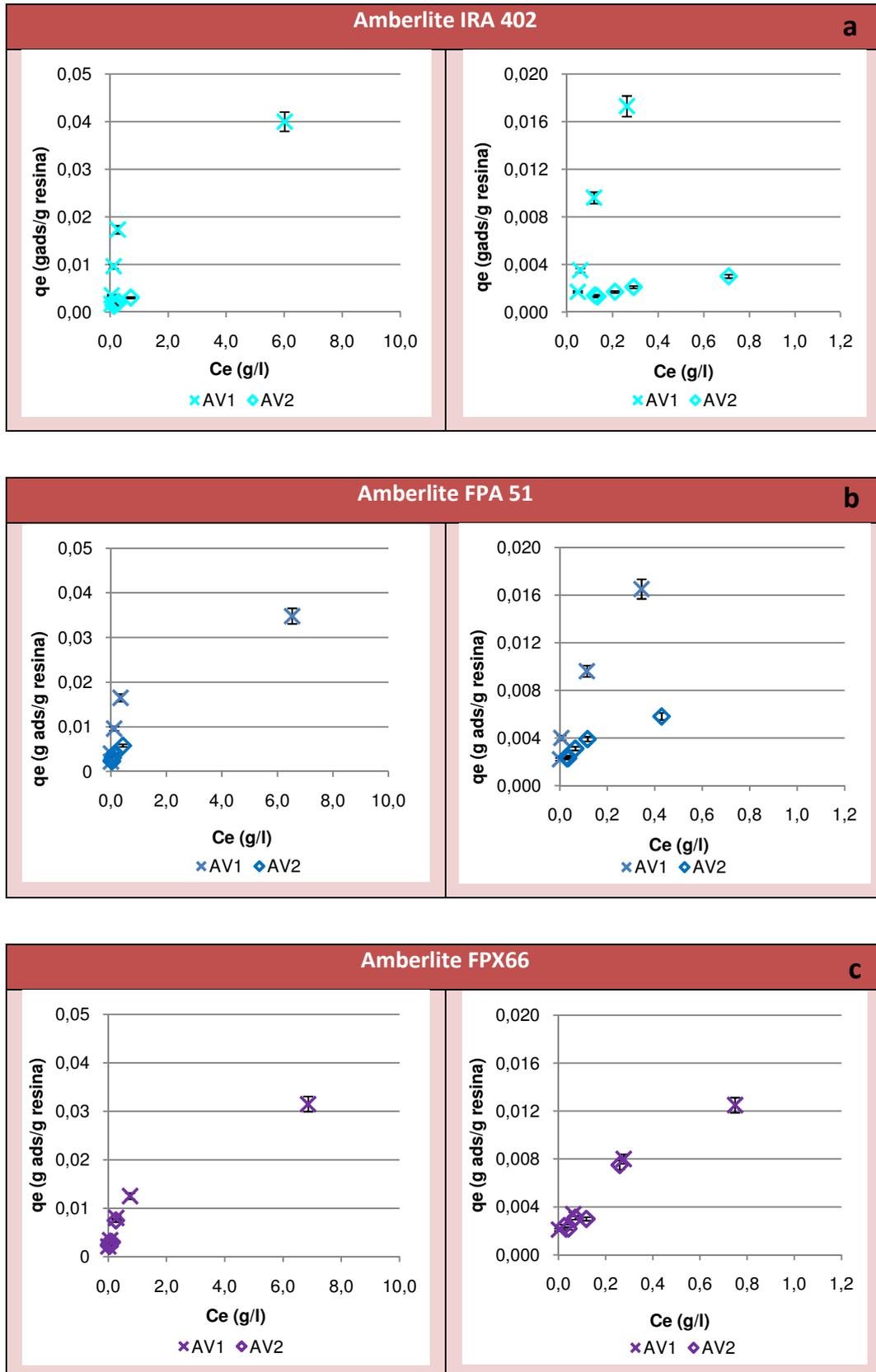
con gruppi fenolici ed utilizzata per rimuovere le impurezze organiche da soluzioni. I gruppi idrossifenolici e metiloli le conferiscono carattere idrofilico. È indicata per la rimozione di composti organici ad elevato peso molecolare solubili in acqua e contenenti sostituenti ad elevata polarità. Presenta più affinità per i composti aromatici rispetto agli alifatici; adsorbe acidi (preferibilmente) e basi ionizzati, ma non sali neutri o composti non polari.

Tabella 2.2. Caratteristiche fisiche delle matrici adsorbenti utilizzate.

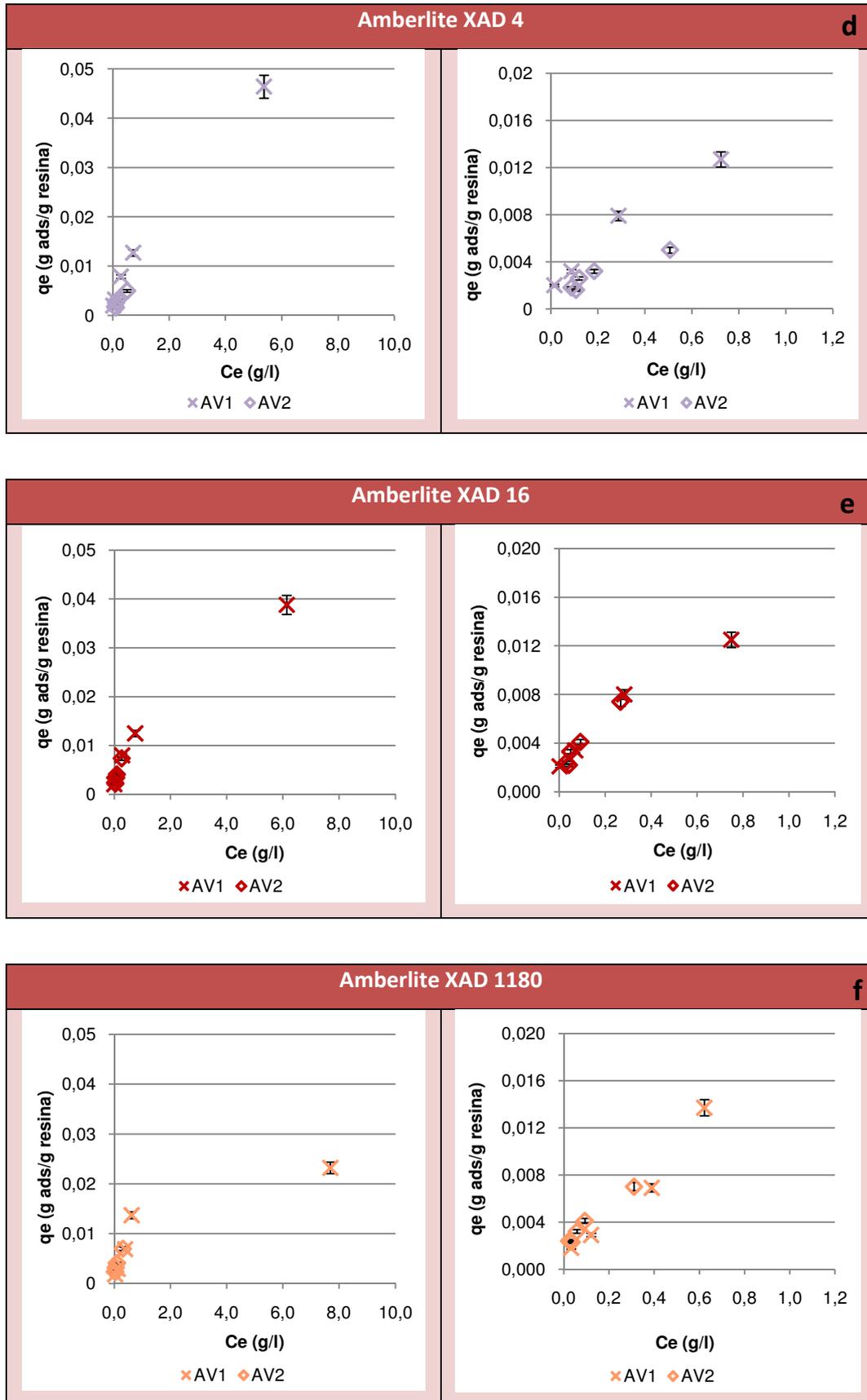
Resina	Dimensioni delle particelle (mm)	Area superficiale (m²/g)	Porosità (ml/g)
Amberlite IRA 402	0,600-0,750	--	--
Amberlite FPA 51	0,490-0,690	--	--
Amberlite FPX 66	0,600-0,750	≥700	≥1,40
Amberlite XAD 4	0,490-0,690	≥750	≥0,50
Amberlite XAD 16	0,560-0,710	≥800	≥0,55
Amberlite XAD 1180	0,200-1,900	500	≥0,60
Amberlite XAD 761	0,560-0,760	150-250	0,95-1,18

La capacità adsorbente delle diverse matrici rispetto alla rimozione della frazione fenolica, è stata valutata attraverso lo studio delle isoterme di adsorbimento sulle acque di vegetazione derivanti dall'impianto di ultrafiltrazione ed osmosi inversa, AV1, e su quelle tal quali AV2.

2. Parte sperimentale



2. Parte sperimentale



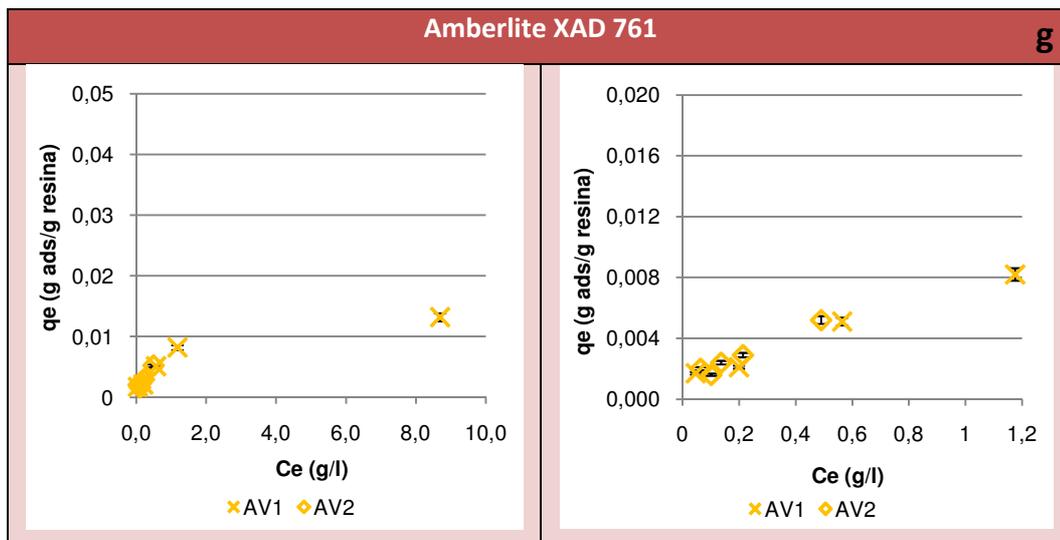


Figura 2.5. Isotherme di adsorbimento delle diverse matrici adsorbenti considerate: Amberlite IRA 402 (a), Amberlite FPA 51 (b), Amberlite FPX 66 (c), Amberlite XAD 4 (d), Amberlite XAD 16 (e), Amberlite XAD 1180 (f), Amberlite XAD 761 (g). Le matrici polimeriche sono state utilizzate ad una concentrazione pari al 10% p/p di refluo.

Tutte le isoterme realizzate utilizzando AV1 e AV2 presentano gli stessi andamenti, eccetto quelle determinate con le resine a scambio anionico dove a parità di concentrazione all'equilibrio si osserva una minore capacità adsorbente delle AV2.

Tutte le curve riportate riportano il cosiddetto andamento di tipo “L”⁵⁰, il quale è tipico dei sistemi in cui non si ha una proporzionalità diretta tra adsorbimento specifico e concentrazione di adsorbato all'equilibrio residua in soluzione. Questo suggerisce una progressiva saturazione del substrato rappresentato dalla resina polimerica da parte dell'adsorbato rappresentato dalle componenti fenoliche delle AV⁵⁰.

Gli andamenti sono stati elaborati secondo i due diversi modelli: Langmuir e Freundlich⁵¹.

Il modello di Langmuir è quello più semplice e descrive l'adsorbimento di tipo monostrato, cioè l'adsorbimento di una determinata sostanza su una superficie con un numero ben determinato di siti attivi uguali tra loro. Inizialmente sviluppato per spiegare l'adsorbimento dei gas sui solidi, può essere comunque applicato a

2. Parte sperimentale

qualsiasi sistema in cui si ha un adsorbimento di tipo omogeneo; è basato sulle seguenti ipotesi:

- le molecole di adsorbato vengono adsorbite in numero fisso su un ben definito numero di siti attivi;
- ogni sito può adsorbire una molecola di adsorbato;
- tutti i siti sono energeticamente equivalenti;
- non ci sono interazioni tra molecole adsorbite su siti vicini.

L'equazione generale che descrive il modello di Langmuir è la seguente:

$$q_e = \frac{q_{\max} C_e}{K_L + C_e} \quad (1)$$

dove:

q_e è l'adsorbimento specifico

C_e è la concentrazione all'equilibrio

q_{\max} è la massima quantità adsorbibile da parte dell'adsorbente

K_L è la costante di equilibrio dell'equazione di Langmuir e tiene conto dell'affinità tra adsorbato ed adsorbente.

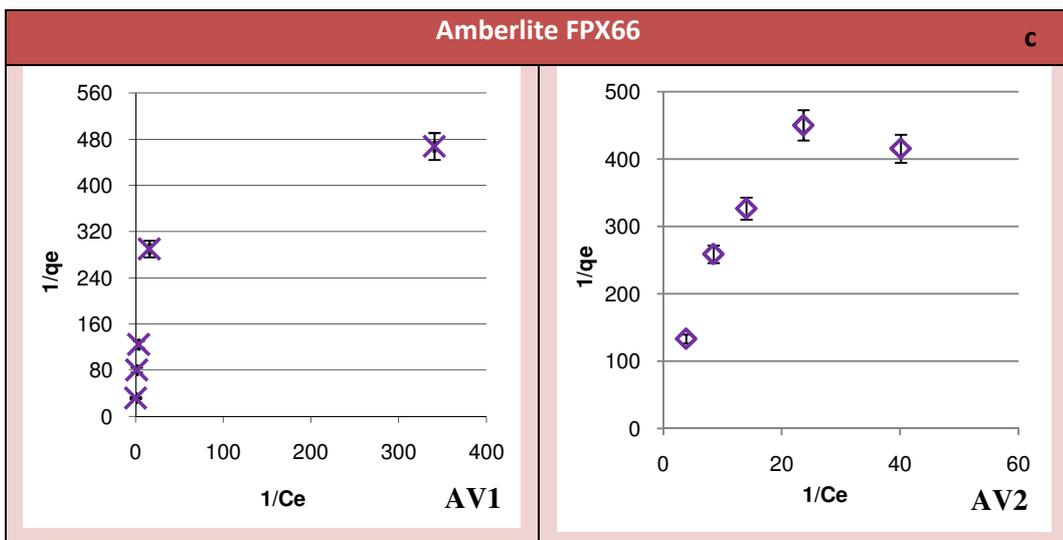
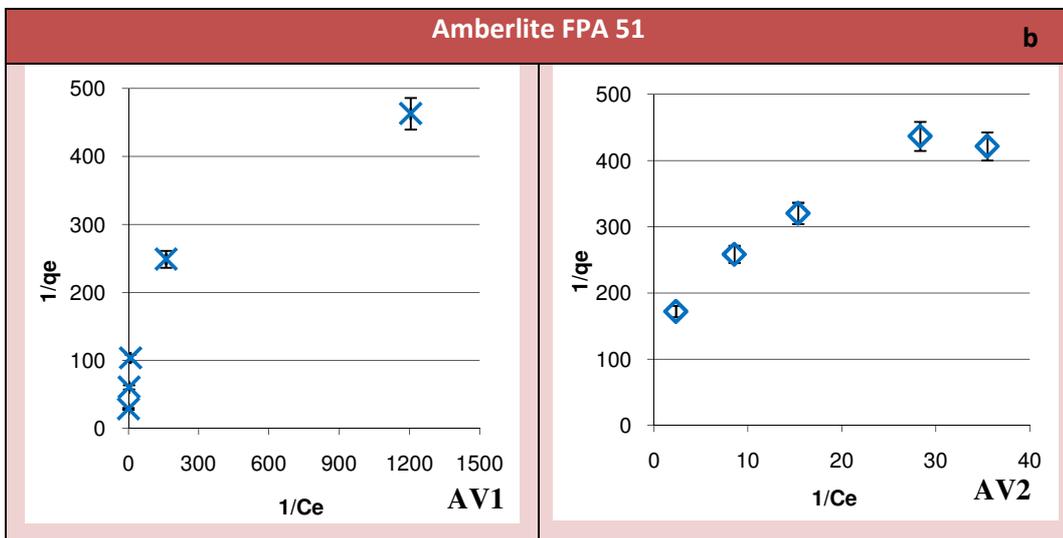
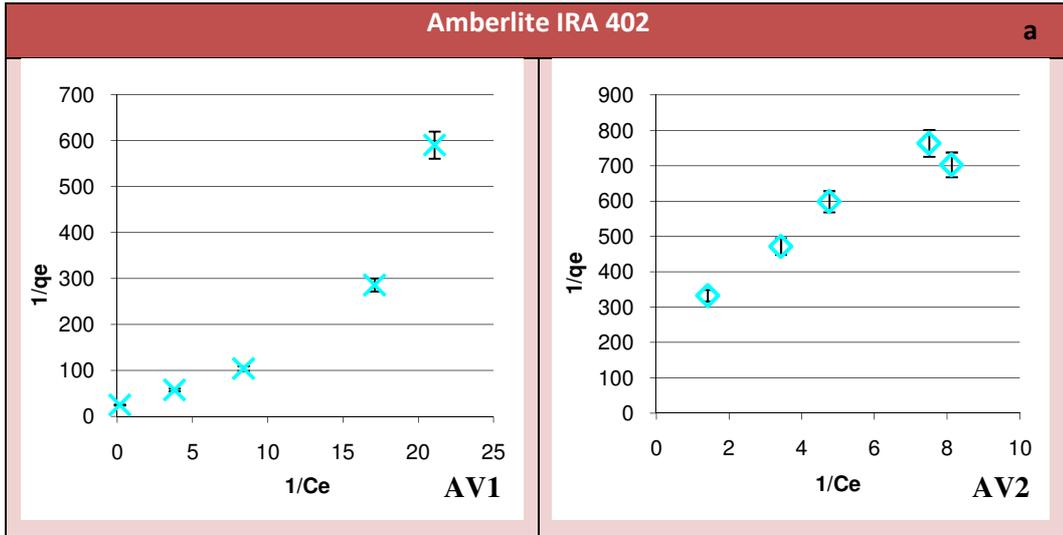
Linearizzando la (1) si ottiene:

$$\frac{1}{q_e} = \frac{K_L + C_e}{q_{\max} C_e} \quad (2)$$

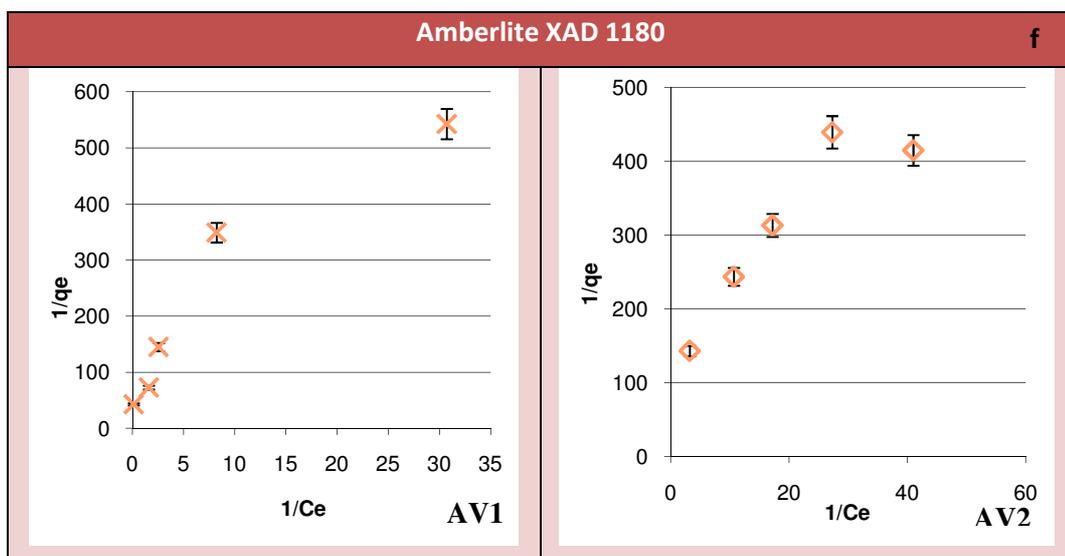
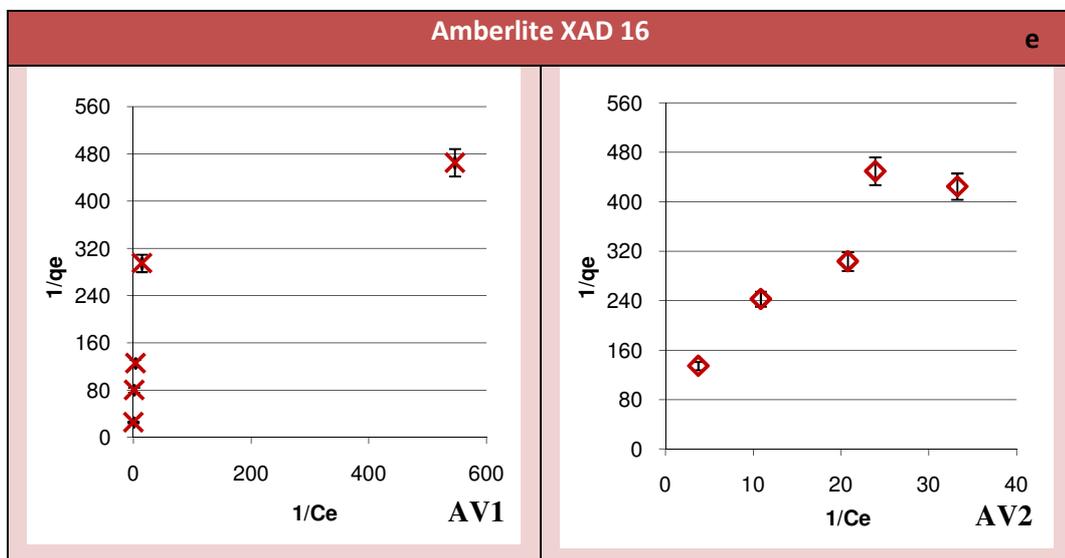
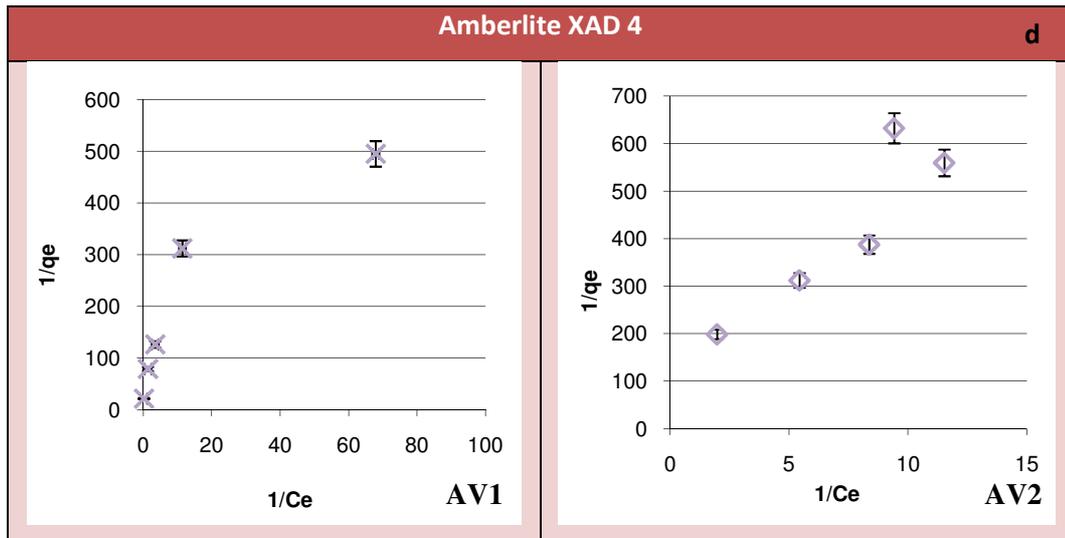
$$\frac{1}{q_e} = \frac{K_L}{q_{\max} C_e} + \frac{1}{q_{\max}} \quad (3)$$

Portando in grafico $1/q_e$ contro $1/C_e$, si ha una retta la cui intercetta è K_L/q_{\max} e la pendenza è $1/q_{\max}$, che rappresenta la capacità teorica di saturazione del monostrato (Figura 2.6).

2. Parte sperimentale



2. Parte sperimentale



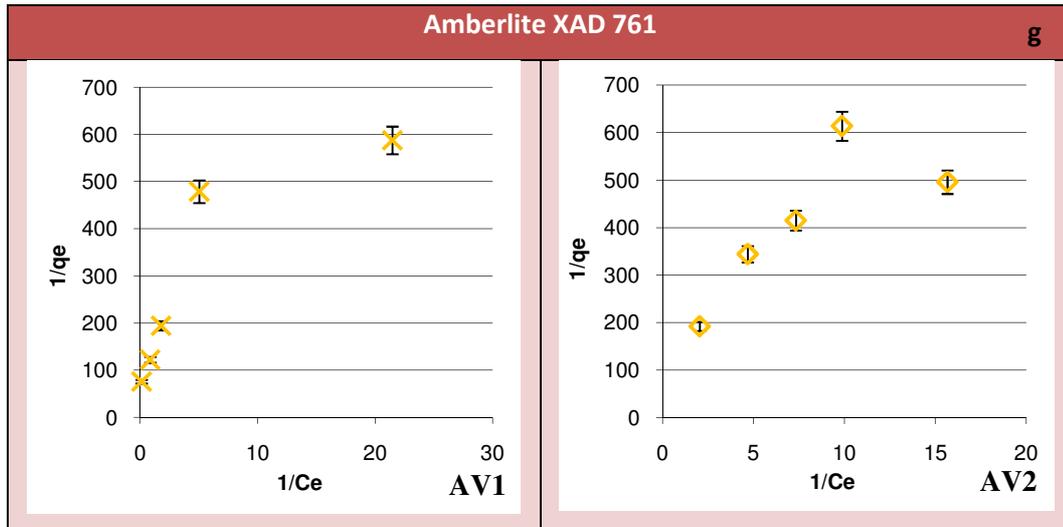


Figura 2.6. Linearizzazione delle isoterme di adsorbimento secondo il modello di Langmuir, per le diverse matrici adsorbenti considerate: Amberlite IRA 402 (a); Amberlite FPA 51 (b); Amberlite FPX 6 (c); Amberlite XAD 4 (d); Amberlite XAD 16 (e); Amberlite XAD 1180 (f); Amberlite XAD 761 (g).

Dagli andamenti sopra riportati è possibile osservare come nessuna delle matrici polimeriche considerate segua il modello dell'adsorbimento di tipo monostrato proposto da Langmuir, infatti, nessuna isoterma presenta una correlazione di tipo lineare tra i reciproci dei dati relativi alle concentrazioni di equilibrio ed i corrispondenti adsorbimenti specifici.

Il modello di Freundlich, è invece applicabile ai sistemi che danno adsorbimento di tipo multistrato non omogeneo su una superficie eterogena. In particolare, il modello di Freundlich cosiddetto semplice, si applica alle isoterme di tipo "L" che non raggiungono un plateau⁵⁰, come nel caso delle curve relative alle AV descritte in figura 2.4.

L'equazione che descrive tale modello è:

$$q_e = K_f C_e^{1/n} \quad (4)$$

dove:

q_e è l'adsorbimento specifico

C_e è la concentrazione all'equilibrio

2. Parte sperimentale

$1/n$ dà un'indicazione dell'energia o dell'intensità della reazione e quindi se il sistema adsorbente/adsorbato è favorito (sistema favorito per $n > 1$)

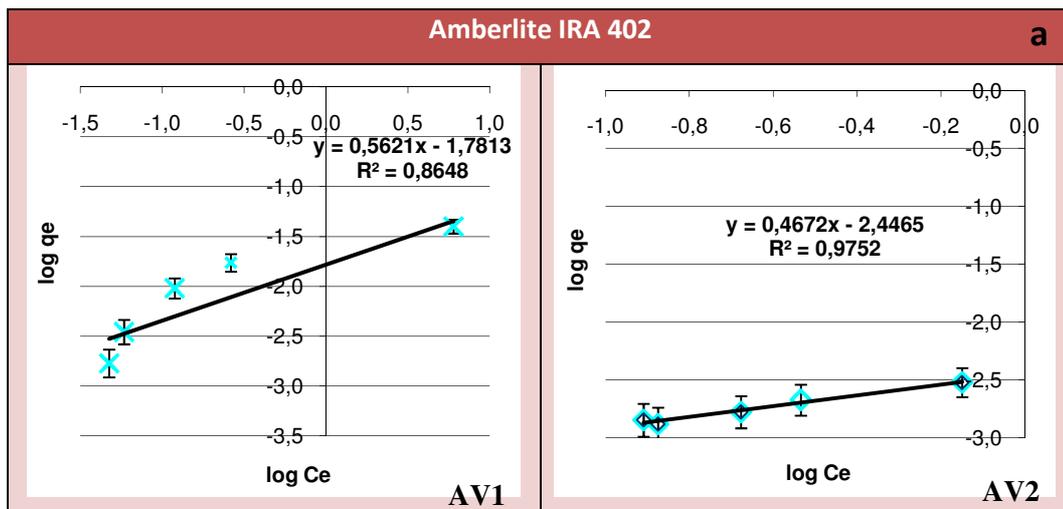
K_F è la costante di equilibrio del modello di Freundlich, ed indica la capacità di adsorbimento

Linearizzando la (4) attraverso l'espressione dei logaritmi, si ottiene:

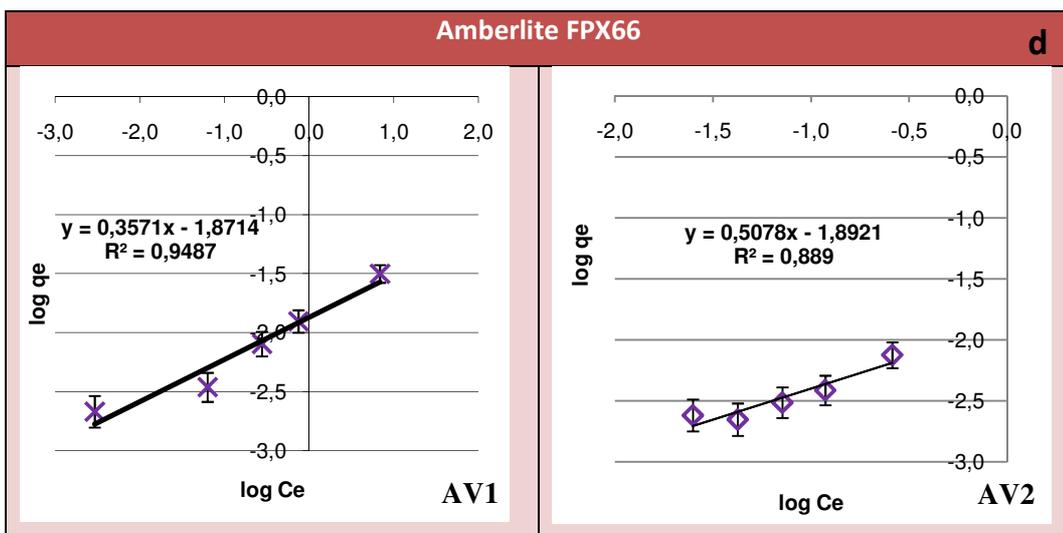
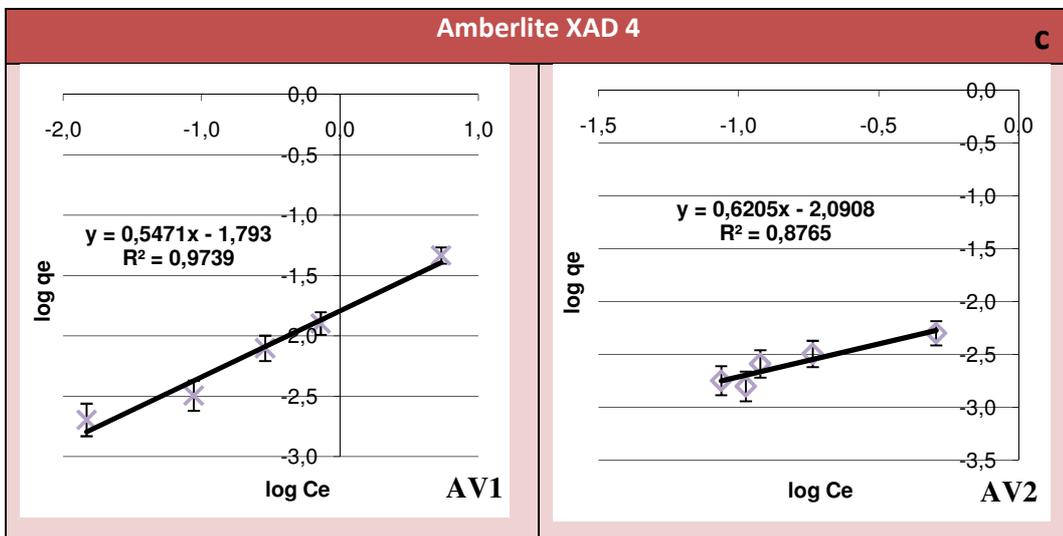
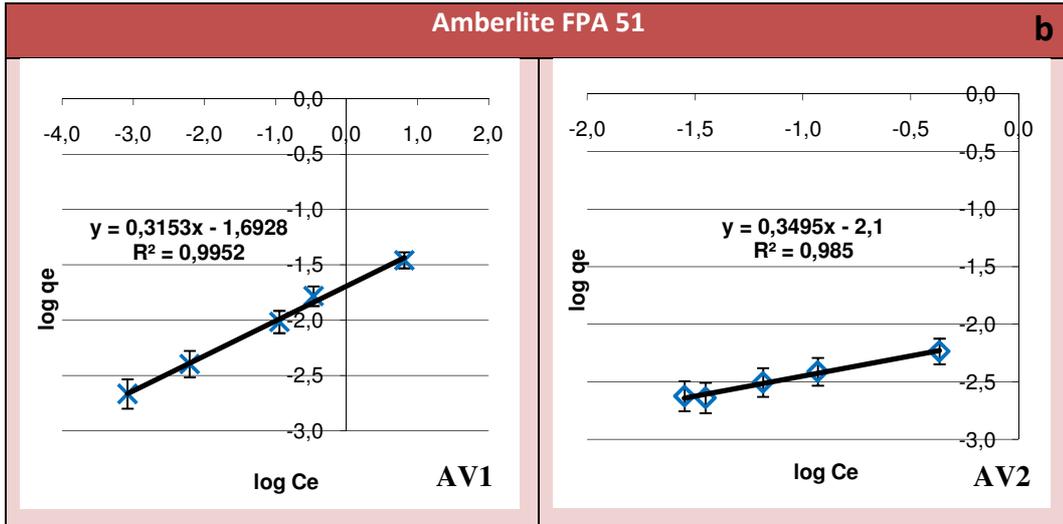
$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad (5)$$

Riportando in grafico il $\log q_e$ contro il \log di C_e , è possibile calcolare i valori di n e K_F .

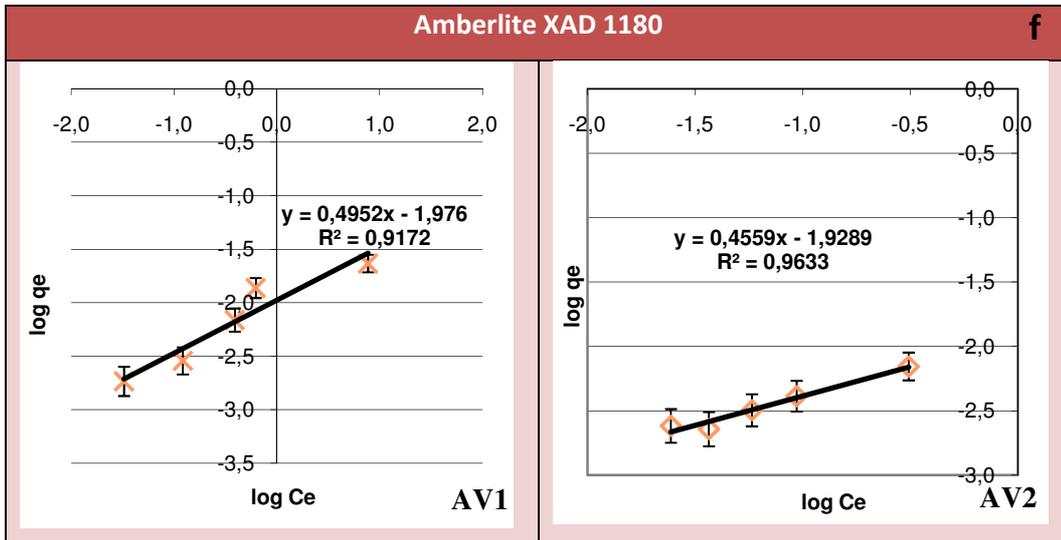
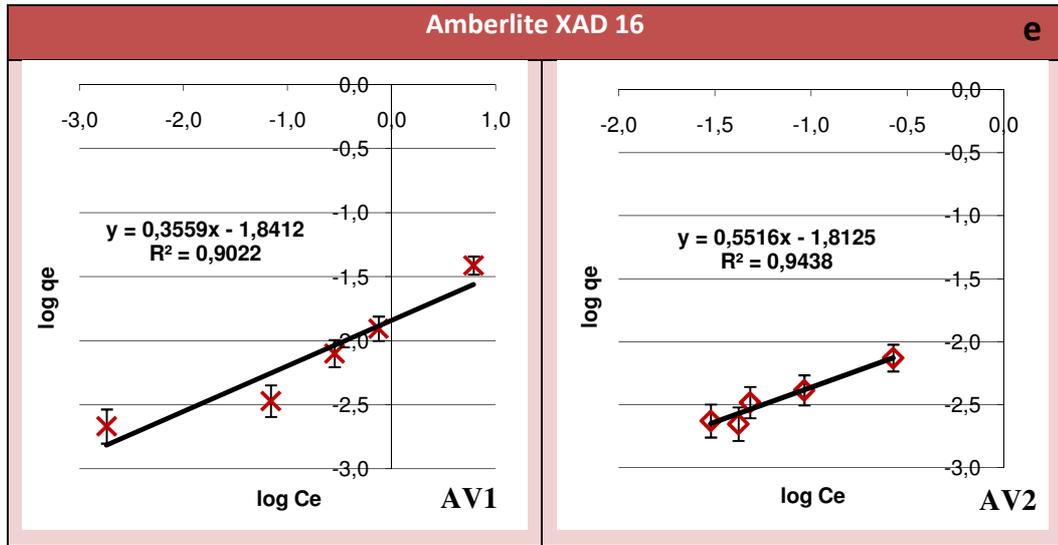
Le figure sottostanti mostrano gli andamenti delle isoterme di adsorbimento sulle resine ottenuti seguendo i due modelli appena descritti.



2. Parte sperimentale



2. Parte sperimentale



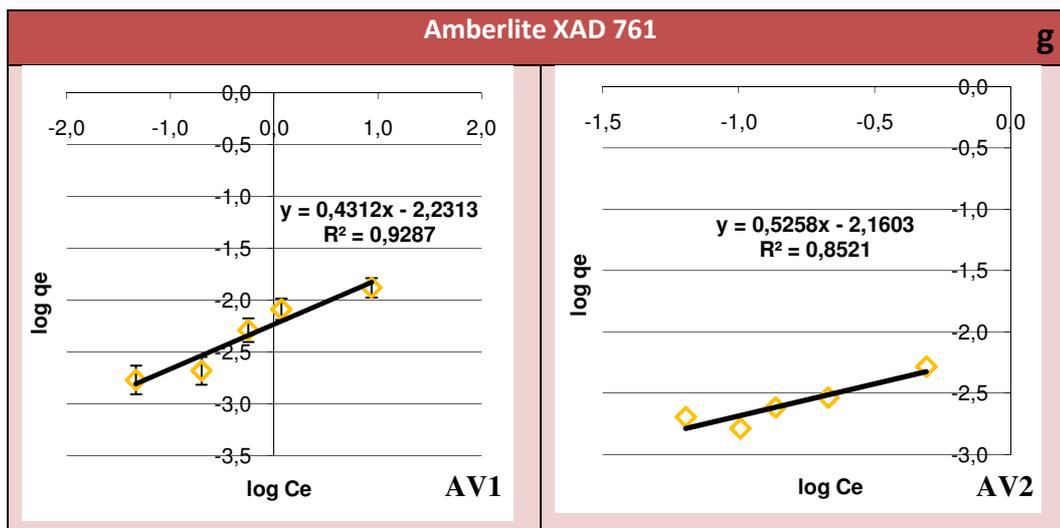


Figura 2.7. Linearizzazione delle isoterme di adsorbimento secondo il modello di Freundlich, per le diverse matrici adsorbenti considerate: Amberlite IRA 402 (a); Amberlite FPA 51 (b); Amberlite XAD 4 (c); Amberlite FPX 66 (d); Amberlite XAD 1180 (e); Amberlite XAD 16 (f); Amberlite XAD 761 (g).

Dagli andamenti ottenuti con la linearizzazione del modello multistrato di Freundlich, è possibile osservare come, in questo caso, la correlazione lineare tra la concentrazione di polifenoli in soluzione all'equilibrio, ed i rispettivi adsorbimenti specifici, sia decisamente migliore rispetto ai casi del modello di Langmuir mostrati in precedenza, visti i valori di R^2 prossimi ad 1.

2. Parte sperimentale

Tabella 2.3. Valori di n e Kf relativi alle diverse matrici adsorbenti considerate per le due diverse tipologie di acque di vegetazione.

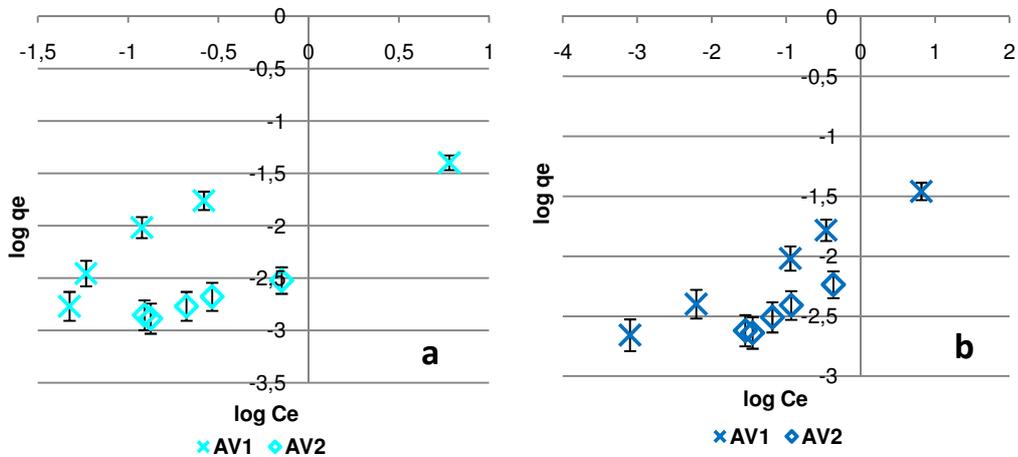
Matrice polimerica	AV1	AV2	Kf AV1/kf AV2
IRA 402	n=1,7	n=2,1	4,7
	$Kf=1,7 \cdot 10^{-2}$	$Kf=3,6 \cdot 10^{-3}$	
FPA 51	n=3,2	n=2,9	2,5
	$Kf=2,0 \cdot 10^{-2}$	$Kf=7,9 \cdot 10^{-3}$	
FPX 66	n=2,8	n=2,0	1,0
	$Kf=1,3 \cdot 10^{-2}$	$Kf=1,3 \cdot 10^{-2}$	
XAD 4	n=1,8	n=1,6	2,0
	$Kf=1,6 \cdot 10^{-2}$	$Kf=8,1 \cdot 10^{-3}$	
XAD 16	n=2,8	n=1,8	0,9
	$Kf=1,4 \cdot 10^{-2}$	$Kf=1,5 \cdot 10^{-2}$	
XAD 1180	n=2,0	n=2,2	0,9
	$Kf=1,1 \cdot 10^{-2}$	$Kf=1,2 \cdot 10^{-2}$	
XAD 761	n=2,3	n=1,9	0,9
	$Kf=5,9 \cdot 10^{-3}$	$Kf=6,9 \cdot 10^{-3}$	

I valori n, risultanti dalle linearizzazioni, sono tutti maggiori di 1 ad indicare una forte energia di formazione dello stato adsorbente (Tabella 2.3). Interessanti differenze si notano nella determinazione dei valori di Kf; infatti, le resine a scambio anionico mostrano maggiori valori di Kf in presenza delle AV1 rispetto alle AV2 che presentano valori mediamente in linea con gli altri adsorbenti in cui non si osservano significative differenze dipendenti dal refluo (Figura 2.8). Il rapporto tra le Kf per le differenti resine sembra indicare quindi una maggiore capacità adsorbente nelle resine a scambio anionico in presenza delle acque di vegetazione concentrate. Questo fenomeno potrebbe essere strettamente dipendente dalla presenza di frazioni polisaccaridiche a diversi pesi molecolari, infatti a parità di concentrazione degli zuccheri in AV1 e AV2 si può ritenere che, per effetto del processo di filtrazione, in AV1 sia mediamente presente una frazione di zuccheri a basso peso molecolare. Le resine a scambio anionico presentano un buon assorbimento degli zuccheri che potrebbe portare velocemente la capacità adsorbente della resina a saturazione in presenza di frazioni

2. Parte sperimentale

polisaccaridiche ad alto peso molecolare come nel caso delle AV2. Questo spiegherebbe il motivo di una minore capacità adsorbente delle resine a scambio anionico con AV2. Ciò che si può ragionevolmente pensare, è la formazione di uno strato polisaccaridico di molecole affini alla resina che ne vanno a saturare i siti attivi. Se da una parte questo effetto può limitare l'adsorbimento diretto dei biofenoli sull'adsorbente, dall'altra può succedere che questo strato polisaccaridico possa diventare a sua volta siti attivi per l'adsorbimento o il co-adsorbimento di altre specie presenti in soluzione, per esempio aggregati polifenolo-polifenolo⁵².

Le matrici di tipo Amberlite XAD non presentano significative dipendenze dalla tipologia di reflujo tanto che i valori di K_f risultano mediamente costanti. Questo significa che risentono meno dell'interferenza delle frazioni polisaccaridiche e si dimostrano quindi ottime matrici adsorbenti per la rimozione di fenolo, composti fenolici e coloranti naturali dalle acque^{53,54,55}.



2. Parte sperimentale

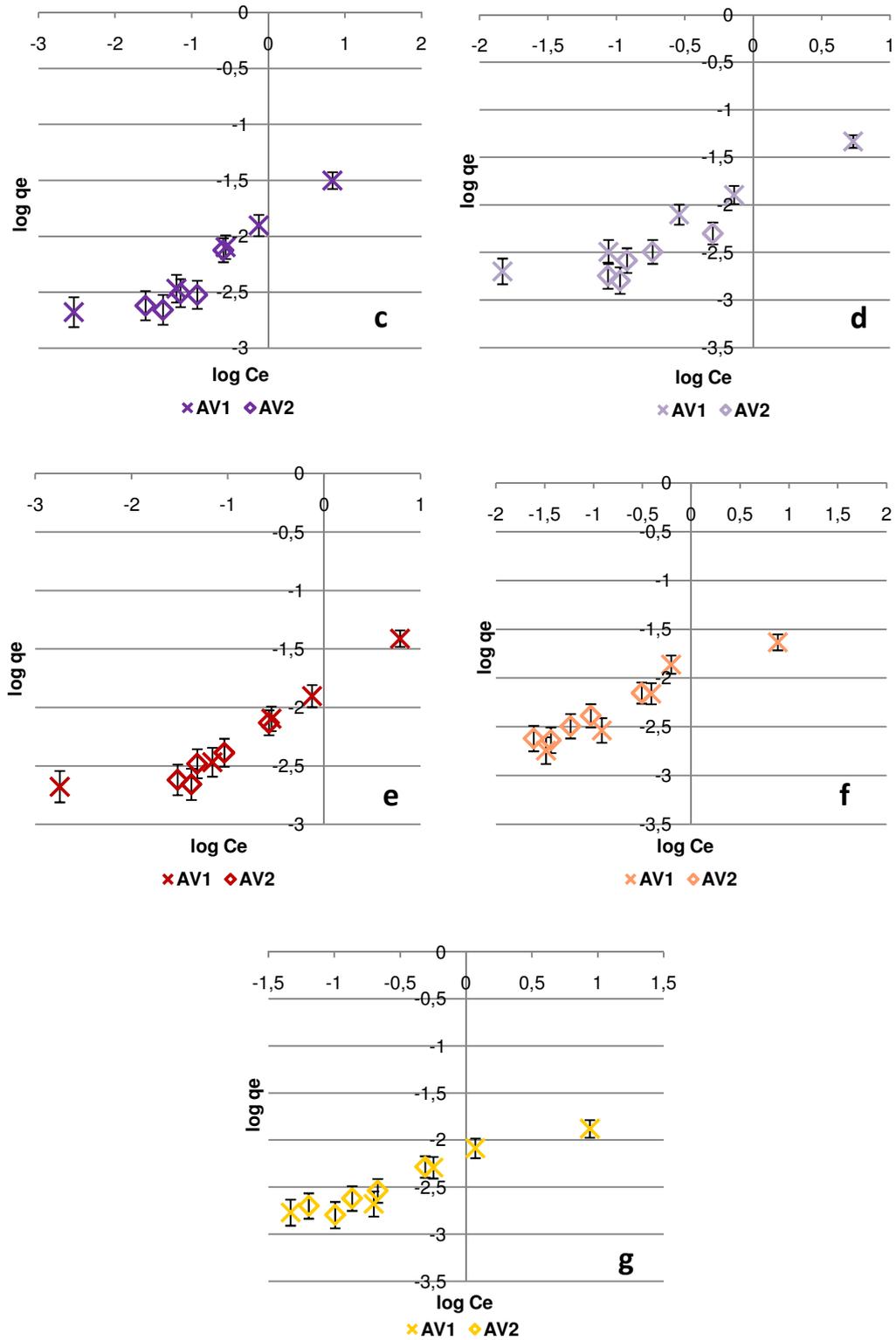


Figura 2.8. Sovrapposizione delle linearizzazioni delle isoterme di adsorbimento secondo il modello di Freundlich, per le due tipologie di acque e le diverse matrici adsorbenti considerate: Amberlite IRA 402 (a); Amberlite FPA 51 (b); Amberlite FPX 6 (c); Amberlite XAD 4 (d); Amberlite XAD 1180 (e); Amberlite XAD 16 (f); Amberlite XAD 761 (g).

Sovrapponendo le rette ottenute per linearizzazione del modello proposto da Freundlich, è possibile osservare quanto appena descritto: per le matrici a scambio, infatti, si ha una sorta di effetto negativo relativo alle AV2, che si traduce in un minor adsorbimento specifico (q_e) a parità di concentrazione all'equilibrio (C_e). Tale comportamento è imputabile alle componenti polisaccaridiche presenti tipiche delle matrici vegetali, pectine, cellulose, emicellulose ed amidi. In particolare la pectina, costituita anche da unità zuccherine di acido galatturonico, ad un pH relativamente basso come quello riscontrato per le AV (4,4-4,6), è in grado di dare interazioni di tipo elettronico^{56,57} con substrati carichi come le resine a scambio anionico Amberlite IRA 402 e Amberlite FPA 51, le quali contengono sul polimero di stirene-divinilbenzene gruppi trimetilamminici e ammine terziarie rispettivamente. Le macromolecole di pectina, andando ad interagire con i siti carichi della matrice polimerica, potrebbero causare una minor efficienza della resina in termini di adsorbimento di polifenoli a causa di ingombri sterici che possono ridurre la superficie utile all'adsorbimento dei polifenoli stessi.

Recupero della componente fenolica dalle AV

In Figura 2.9a e 2.9b sono riportati i comportamenti relativi alla resina scambiatrice anionica forte, l'Amberlite IRA 402 in cui si osserva che aumentando la percentuale di adsorbente a parità di concentrazione di soluto all'equilibrio, si ha una diminuzione dei grammi di polifenoli adsorbiti per grammo di adsorbente di tipo non proporzionale.

2. Parte sperimentale

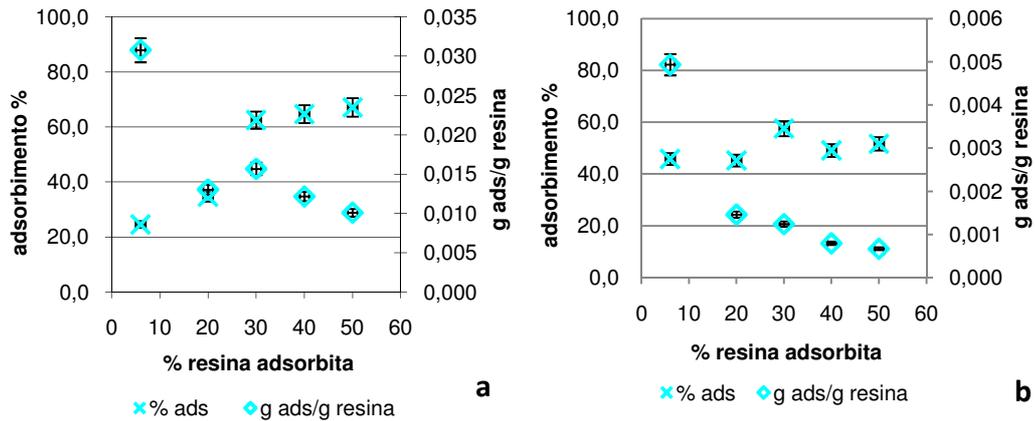


Figura 2.9. Rese percentuali di adsorbimento e relativi adsorbimenti specifici in funzione della percentuale di matrice adsorbente Amberlite IRA 402 adsorbita per la AV1 (a) e le AV2 (b).

L'entità dell'adsorbimento specifico è maggiore nel caso delle AV1 contemporaneamente più ricche di polifenoli ed esenti da polisaccaridi che come abbiamo visto influiscono su questo parametro in maniera negativa, rendono la matrice adsorbente meno disponibile al recupero delle componenti fenoliche, seppur presenti in minor concentrazione nelle acque tal quali AV2.

In termini di adsorbimento percentuale nel caso delle AV1, non si osservano aumenti particolari passando da un 30 ad un 50% di matrice adsorbente, e per le AV2, si osservano valori praticamente costanti a tutte le concentrazioni di adsorbente considerate. In entrambe i casi la resina Amberlite IRA 402 non riesce a recuperare la totalità delle componenti fenoliche in soluzione, non perché si arrivi a saturazione dell'adsorbente, ma probabilmente perché risulta essere affine solo ad alcune classi fenoliche presenti in soluzione nelle acque di vegetazione.

2. Parte sperimentale

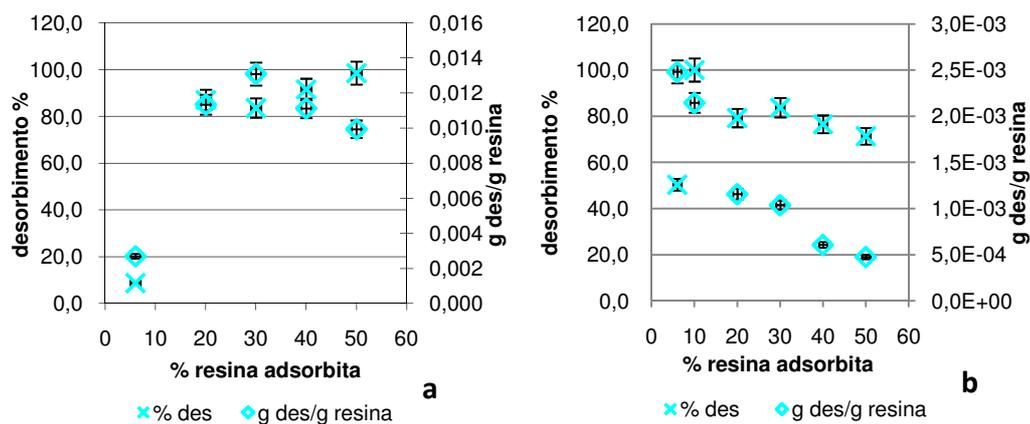


Figura 2.10. Rese percentuali di desorbimento e relativi desorbimenti specifici in funzione della percentuale di matrice adsorbente Amberlite IRA 402 adsorbita per la AV1 (a) e le AV2 (b).

In termini di desorbimento, la matrice utilizzata a più bassa concentrazione in fase di adsorbimento, più carica di polifenoli, risulta dare rese di desorbimento e desorbimenti specifici decisamente più bassi rispetto alle altre concentrazioni, dove abbiamo rese di desorbimento piuttosto alte che vanno dall'80% circa fino ad un recupero quantitativo della fase fenolica adsorbita.

Si può ragionevolmente pensare che la matrice Amberlite IRA 402, favorendo un co-adsorbimento, possa consentire al solvente desorbente utilizzato, etanolo acido per un'aggiunta di HCl al 4%, di recuperare le molecole fenoliche degli strati più esterni, mentre si ha una certa difficoltà a recuperare quelle più intimamente legate alla sua superficie del polimero di stirene-divinilbenze che costituisce la struttura della resina.

Un andamento simile è stato riscontrato anche nelle prove di adsorbimento e desorbimento condotte sulla matrice a scambio debole (Amberlite FPA 51).

2. Parte sperimentale

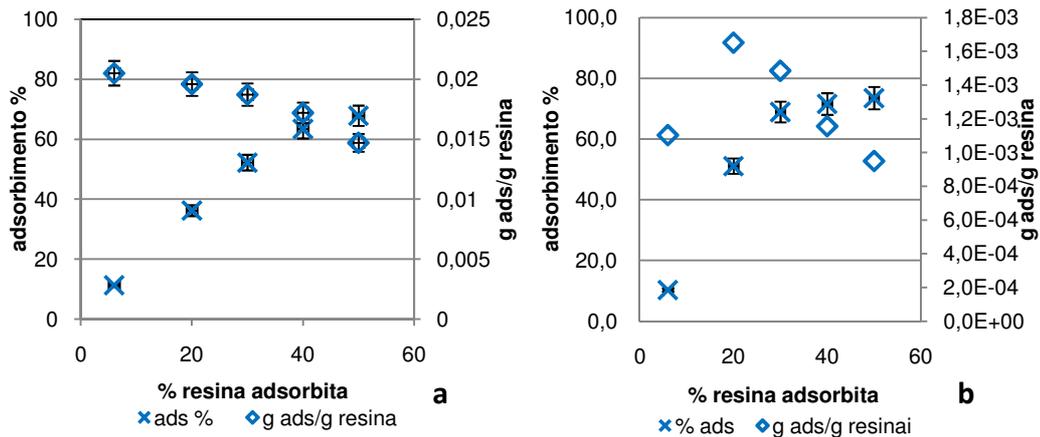


Figura 2.11. Rese percentuali di adsorbimento e relativi adsorbimenti specifici in funzione della percentuale di matrice adsorbente Amberlite FPA 51 adsorbita per la AV1 (a) e le AV2 (b).

La resina scambiatrice anionica debole, mostra migliori performances rispetto a quella anionica forte sia in presenza di acque di vegetazione concentrate, AV1, che di acque di vegetazione tal quali, AV2. Nel primo caso l'andamento sembra mostrare problemi di saturazione del sistema, perché ad un aumento di matrice corrisponde sempre un aumento di adsorbimento percentuale, mentre nel secondo caso la matrice sembra arrivare ad un massimo di adsorbimento a concentrazioni pari al 30% circa dal momento che un ulteriore aumento di adsorbente non è accompagnato da sostanziali variazioni di adsorbimento percentuale.

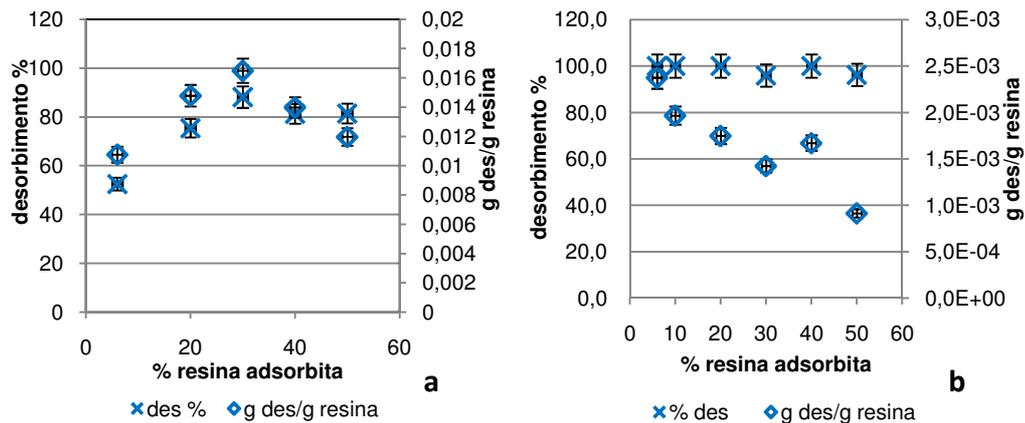


Figura 2.12. Rese percentuali di desorbimento e relativi desorbimenti specifici in funzione della percentuale di matrice adsorbente Amberlite FPA 51 adsorbita per la AV1 (a) e le AV2 (b).

2. Parte sperimentale

Mentre per le AV1, più concentrate in termini di polifenoli, passando da una anionica scambiatrice forte ad una scambiatrice debole, non si osservano sostanziali cambiamenti in termini di desorbimento, nelle AV2, acque di vegetazioni tal quali, con etanolo acido si riesce a recuperare la totalità delle diverse componenti fenoliche adsorbite. L'Amberlite FPA 51, segue sempre un modello di co-adsorbimento, in questo caso però avendo una soluzione meno concentrata, non si ha la formazione preponderante di interazioni tra molecole di adsorbato, ma solo tra adsorbente ed adsorbato.

La matrice neutra Amberlite FPX 66, è costituita da un polimero aromatico non funzionalizzato.

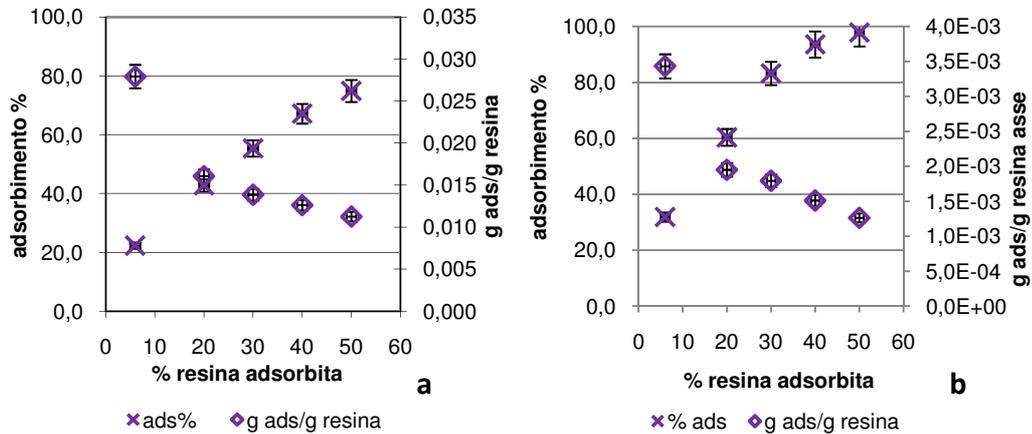


Figura 2.13. Rese percentuali di adsorbimento e relativi adsorbimenti specifici in funzione della percentuale di matrice adsorbente Amberlite FPX 66 adsorbita per la AV1 (a) e le AV2 (b).

Dagli andamenti riportati si osserva che a parità di concentrazione di resina si ottengono percentuali di adsorbimento maggiore nel caso delle acque tal quali dove si ritrova una minor concentrazione di componenti fenoliche.

Nel caso delle AV1, sembra esserci come nel caso precedente un problema di saturazione del substrato, mentre nel caso delle acque tal quali al 50% di matrice adsorbente si riesce ad avere un recupero totale della frazione fenolica presente in soluzione.

2. Parte sperimentale

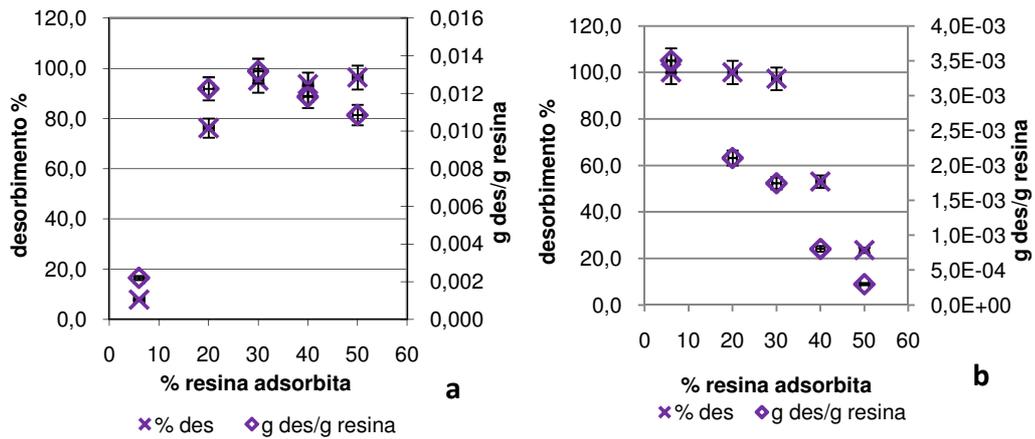


Figura 2.13. Rese percentuali di desorbimento e relativi desorbimenti specifici in funzione della percentuale di matrice adsorbente Amberlite FPX 66 adsorbita per la AV1 (a) e le AV2 (b).

Per quanto riguarda il desorbimento, l'andamento a seconda del tipo di AV è completamente diverso. Per le AV1, più concentrate, si osservano basse rese di rilascio delle frazioni fenoliche adsorbite per un rapporto matrice-fenolo basso in fase di adsorbimento, mentre per le AV2, è proprio per questo rapporto che si hanno i rilasci maggiori, addirittura quantitativi, delle frazioni fenoliche adsorbite. Altra resina a carattere neutro è l'Amberlite XAD 4, costituita da un macropolimero crosslinkato di stirene-divinilbenzene, la quale ha un comportamento del tutto analogo alla precedente.

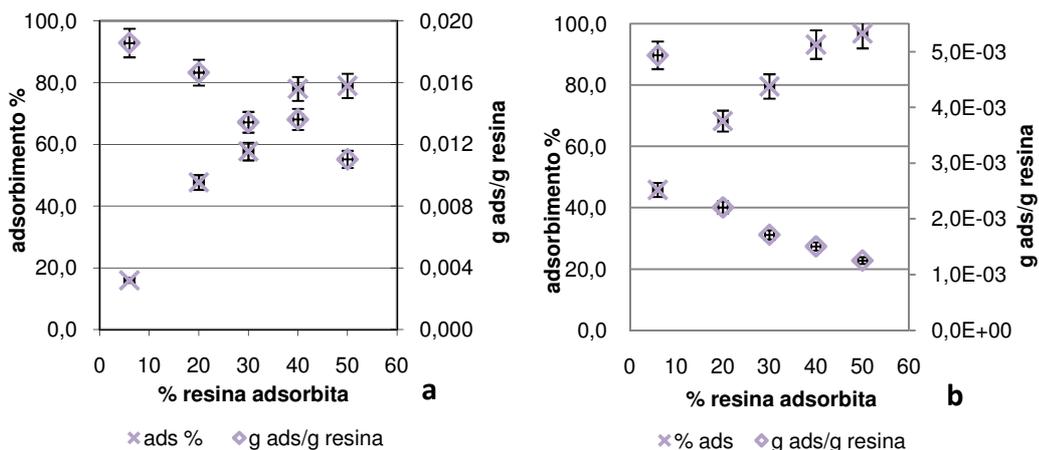


Figura 2.14. Rese percentuali di adsorbimento e relativi adsorbimenti specifici in funzione della percentuale di matrice adsorbente Amberlite XAD 4 adsorbita per la AV1 (a) e le AV2 (b).

2. Parte sperimentale

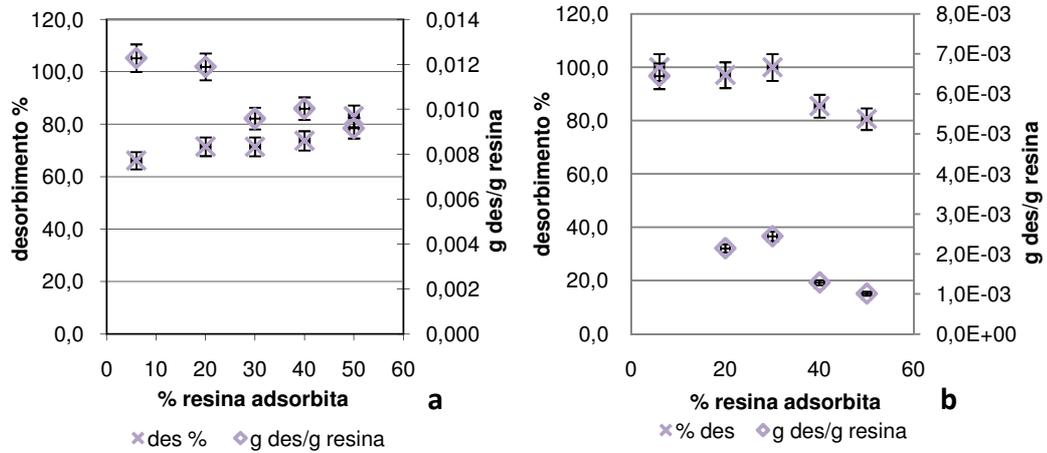


Figura 2.15. Rese percentuali di desorbimento e relativi desorbimenti specifici in funzione della percentuale di matrice adsorbente Amberlite XAD 4 adsorbita per la AV1 (a) e le AV2 (b).

Per quanto riguarda il processo di desorbimento, si hanno buone rese di recupero, per entrambe le tipologie di AV, i recuperi sono maggiori nel caso delle AV2 perché si ha a che fare con uno scarto tal quale contenente meno concentrato.

Nei grafici riportati in figura 2.16 e 2.17 viene messo in evidenza il comportamento della resina XAD 16, anch'essa resina neutra adatta a molecole organiche di basso e medio peso molecolare, e che si differenzia dalla precedente solo per quanto riguarda le caratteristiche fisiche (Tabella 2.2).

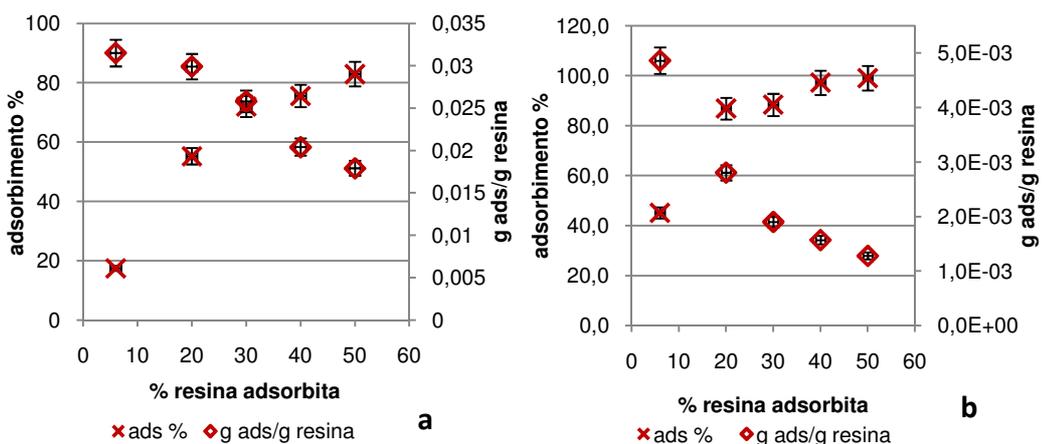


Figura 2.16. Rese percentuali di adsorbimento e relativi adsorbimenti specifici in funzione della percentuale di matrice adsorbente Amberlite XAD 16 adsorbita per la AV1 (a) e le AV2 (b).

2. Parte sperimentale

Il comportamento per Amberlite XAD 16 conferma ancora una volta una migliore affinità delle componenti fenoliche in soluzione nelle acque di vegetazione, per le matrici a carattere neutro rispetto a quelle a scambio anionico.

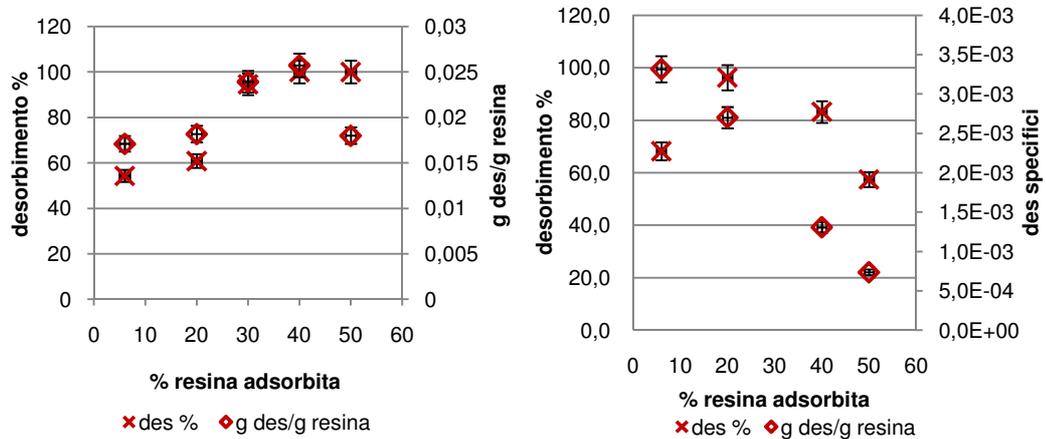


Figura 2.17. Rese percentuali di desorbimento e relativi desorbimenti specifici in funzione della percentuale di matrice adsorbente Amberlite XAD 16 adsorbita per la AV1 (a) e le AV2 (b).

Considerando il processo di desorbimento, abbiamo gli stessi andamenti già riscontrati per le altre due resine neutre.

Amberlite XAD 1180, resina neutra, si distingue dalle precedenti per l'ampio range di dimensioni delle particelle di cui è costituita e per la bassa area superficiale.

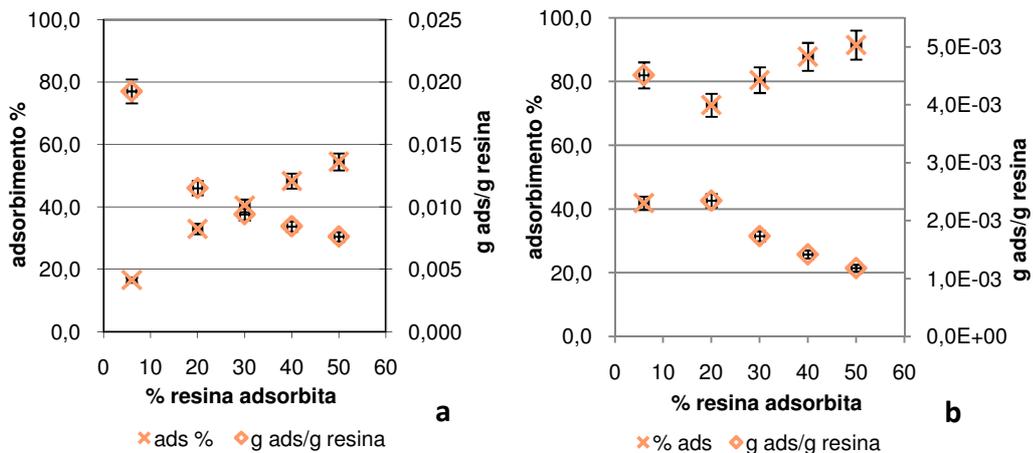


Figura 2.18. Rese percentuali di adsorbimento e relativi adsorbimenti specifici in funzione della percentuale di matrice adsorbente Amberlite XAD 1180 adsorbita per la AV1 (a) e le AV2 (b).

2. Parte sperimentale

In presenza delle acque più concentrate, gli andamenti sembrano simili alle resine precedenti, sebbene la resina Amberlite XAD 1180 mostri performances decisamente inferiori alle precedenti sia in termini di adsorbimento percentuale che di quello assoluto. Anche nel caso delle acque tal quali dove si riusciva ad ottenere un recupero totale della frazione fenolica al 50% di matrice adsorbente in soluzione, abbiamo rese minori. Sembra che in entrambi i casi ci sia un problema di saturazione di substrato, la concentrazione di matrice non è sufficiente ad adsorbire tutte le componenti fenoliche presenti. Questo probabilmente è dovuto al fatto che, a parità di quantità di matrice, Amberlite XAD 1180 possiede una minor area superficiale e quindi offre una minor superficie di contatto alle molecole fenoliche rispetto alle precedenti matrici neutre.

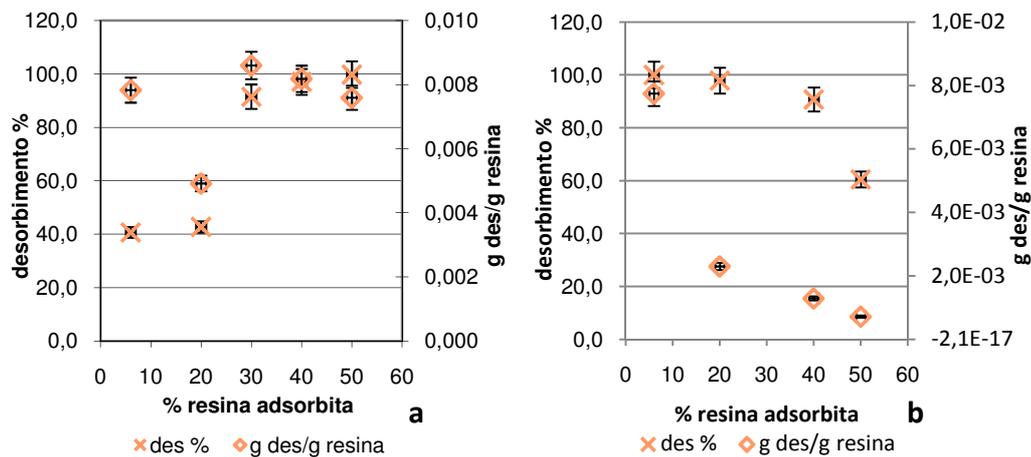


Figura 2.19. Rese percentuali di desorbimento e relativi desorbimenti specifici in funzione della percentuale di matrice adsorbente Amberlite XAD 1180 adsorbita per la AV1 (a) e le AV2 (b).

Nel caso del processo di desorbimento ritroviamo lo stesso andamento riscontrato per le altre resine neutre.

L'Amberlite XAD 761 è un polimero funzionalizzato per dare scambio di tipo ionico commercializzato per il recupero di sostanze acide o basiche ionizzate e di composti organici, in particolare aromatici contenenti sostituenti ad elevata polarità.

2. Parte sperimentale

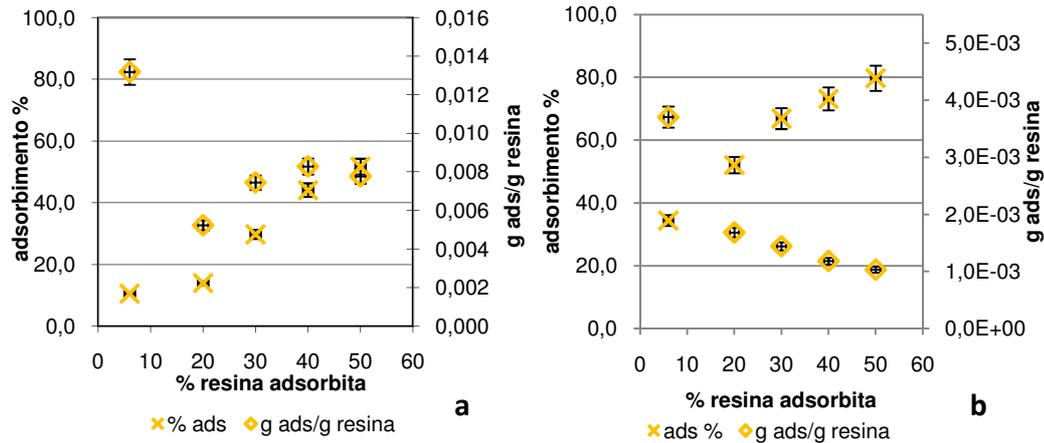


Figura 2.20. Rese percentuali di adsorbimento e relativi adsorbimenti specifici in funzione della percentuale di matrice adsorbente Amberlite XAD 761 adsorbita per la AV1 (a) e le AV2 (b).

Le rese di recupero in fase di adsorbimento non superano il 50% in presenza di AV1 e dell'80% nel caso delle AV2. Tale risultato sembra essere in netto contrasto con le peculiarità strutturali di questa matrice dato il suo carattere aromatico, e la sua presunta capacità di adsorbire preferibilmente composti aromatici e sostanze ioniche, strutture che dovrebbero rappresentare proprio i fenoli contenuti nelle AV per il fatto che il loro pH risulta tra l'altro essere intorno al 4,6, valore molto vicino alla costante di dissociazione di diversi polifenoli acidi. In entrambe i casi, sembra che la concentrazione di matrice adsorbente in soluzione non sia sufficiente al recupero della frazione fenolica presente in entrambe le tipologie di acque considerate.

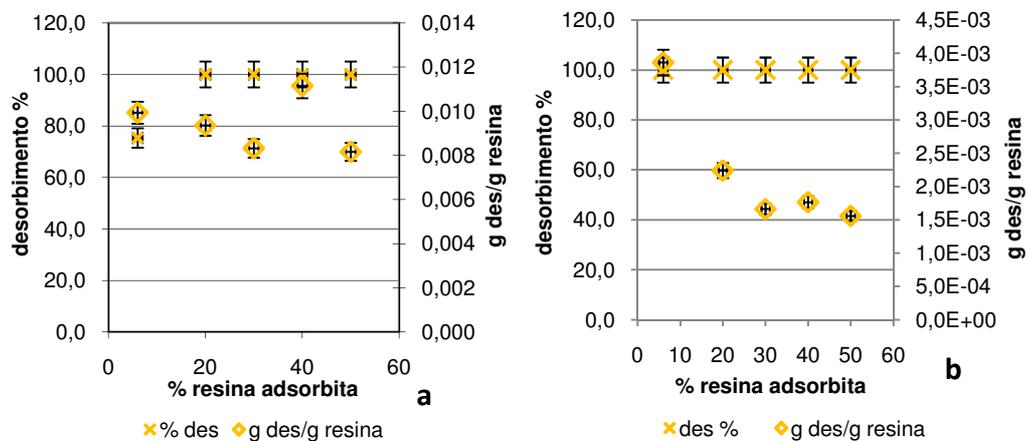


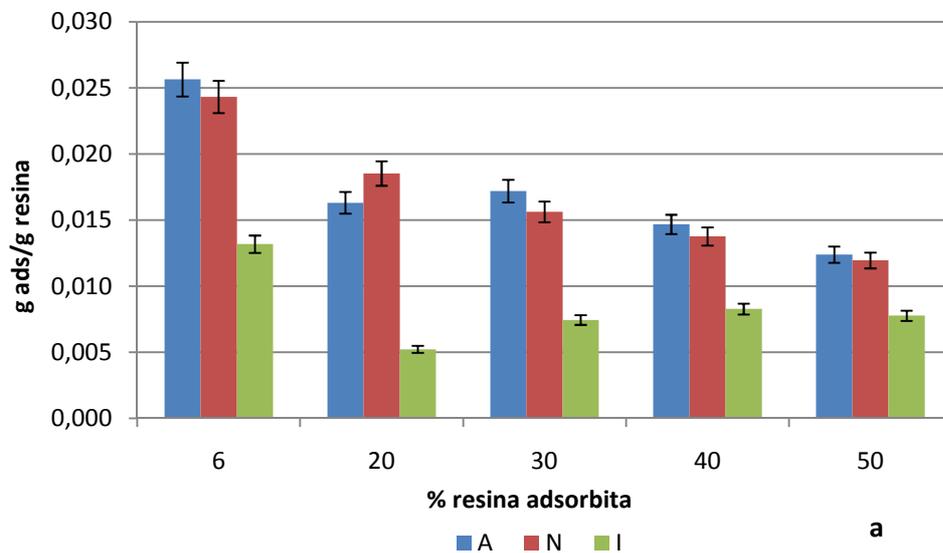
Figura 2.21. Rese percentuali di desorbimento e relativi desorbimenti specifici in funzione della percentuale di matrice adsorbente Amberlite XAD 761 adsorbita per la AV1 (a) e le AV2 (b).

2. Parte sperimentale

Se l'adsorbimento sembra sfavorevole, lo stesso non si può dire per il processo di desorbimento: per tutte le concentrazioni di matrice, il recupero dei polifenoli è praticamente totale per entrambe le AV considerate. Questi valori così alti, soprattutto per le acque di vegetazione più concentrate, sono sicuramente dovuti al fatto che in fase di adsorbimento la quantità di componenti fenoliche recuperate con l'adsorbente è bassa e quindi facile da recuperare in fase di desorbimento.

Da tutti i dati raccolti, è possibile fare un confronto tra tutte le classi di adsorbenti utilizzati; nei grafici successivi vengono riportate le medie dei valori ottenuti per le diverse classi di adsorbenti suddivisi in base alla tipologia di scambio:

- A: adsorbenti scambiatori anionici;
- N: adsorbenti neutri;
- I: adsorbenti scambiatrici ionici; in quest'ultimo caso i valori si riferiscono alla sola matrice Amberlite XAD 761.



2. Parte sperimentale

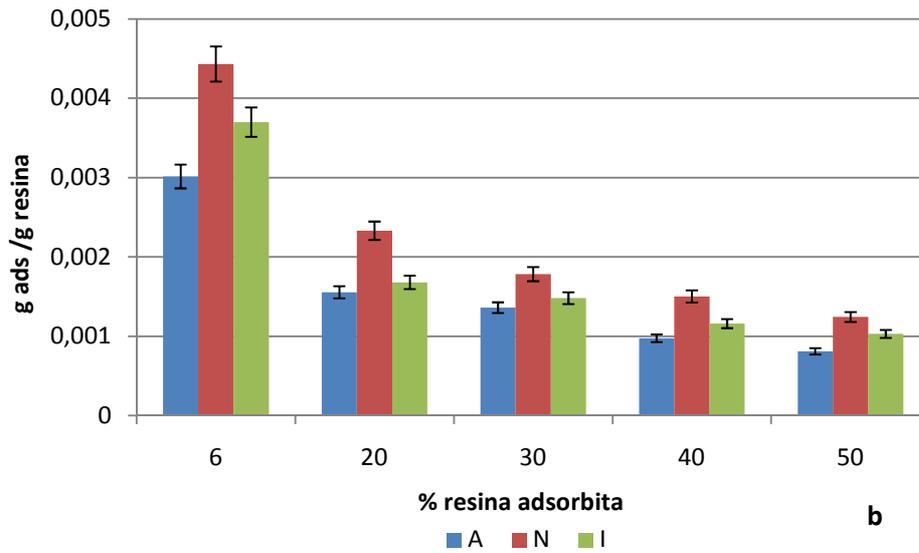


Figura 2.22. Adsorbimenti specifici in funzione della percentuale di matrice adsorbente suddivise per tipo di adsorbimento in presenza di AV1 (a) e di AV2 (b) in cui A = adsorbenti scambiatori anionici, N = adsorbenti neutri, I = adsorbente scambiatore ionico.

In termini di adsorbimenti specifici, la prima differenza che si nota dai dati riportati in grafico è che a parità di concentrazione di resina si hanno adsorbimenti specifici maggiori in presenza di acque di vegetazioni derivanti da processi di filtrazione a membrana in quanto più concentrate in frazioni fenoliche. Tale andamento si traduce in un recupero di *chemicals* maggiore dalla biomassa.

Per queste acque più concentrate, è possibile osservare come all'interno dell'errore, non si abbiano significative differenze tra le classi di adsorbenti a scambio anionico e quelli a carattere neutro; gli andamenti sono del tutto analoghi dal momento che aumentando la concentrazione di adsorbente e quindi l'area superficiale disponibile, abbiamo una diminuzione della quantità di componenti fenoliche adsorbite per unità di matrice. La matrice ionica risulta essere l'adsorbente con le performances peggiori.

Per quanto riguarda invece le acque tal quali, AV2, si osserva sempre un calo dell'adsorbimento specifico all'aumentare della concentrazione di matrice adsorbente per tutte le resine, ma la classe con le performances peggiori, risulta essere quella delle scambiatrici anioniche. Tale risultato è da imputarsi all'effetto negativo dovuto alla presenza di polisaccaridi presenti nelle acque di vegetazioni,

2. Parte sperimentale

che danno interazioni con i siti attivi amminici degli adsorbenti a scambio diminuendo la superficie disponibile all'adsorbimento delle frazioni fenoliche^{52,53}.

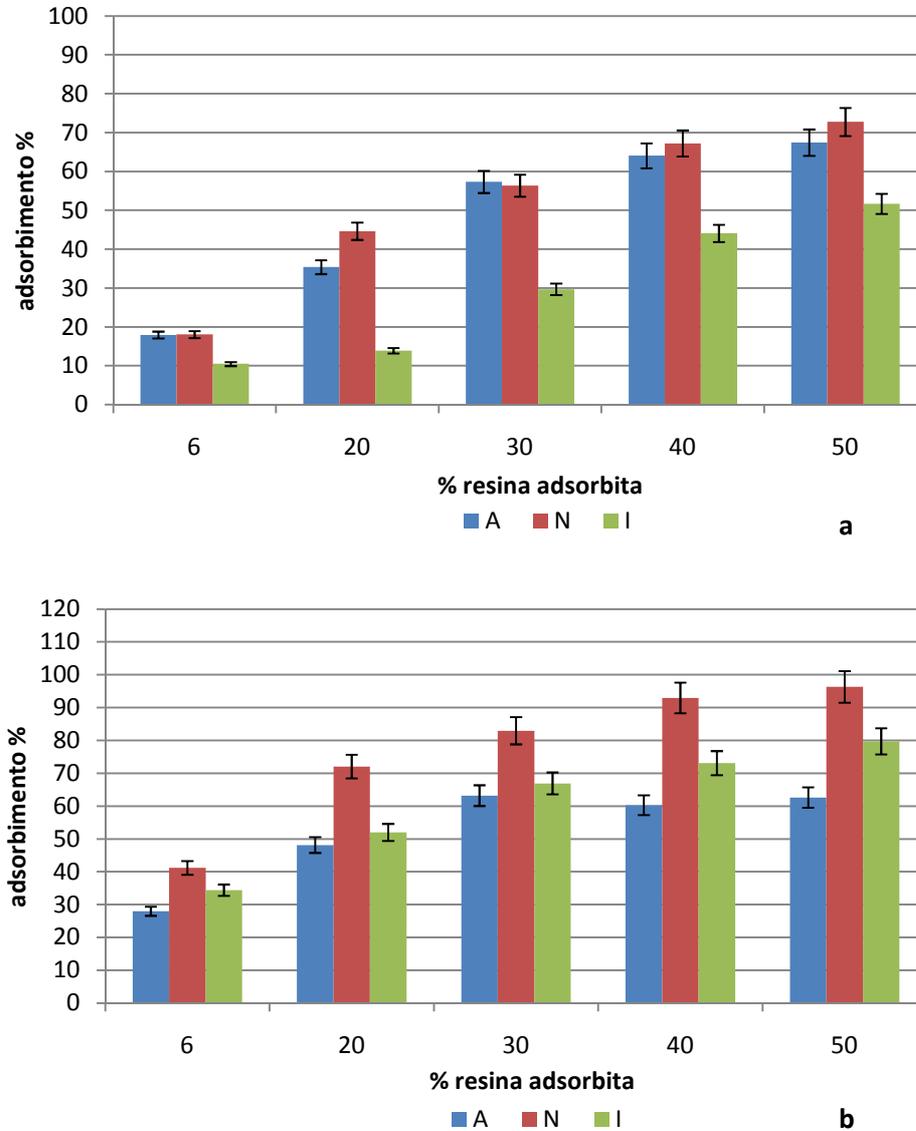
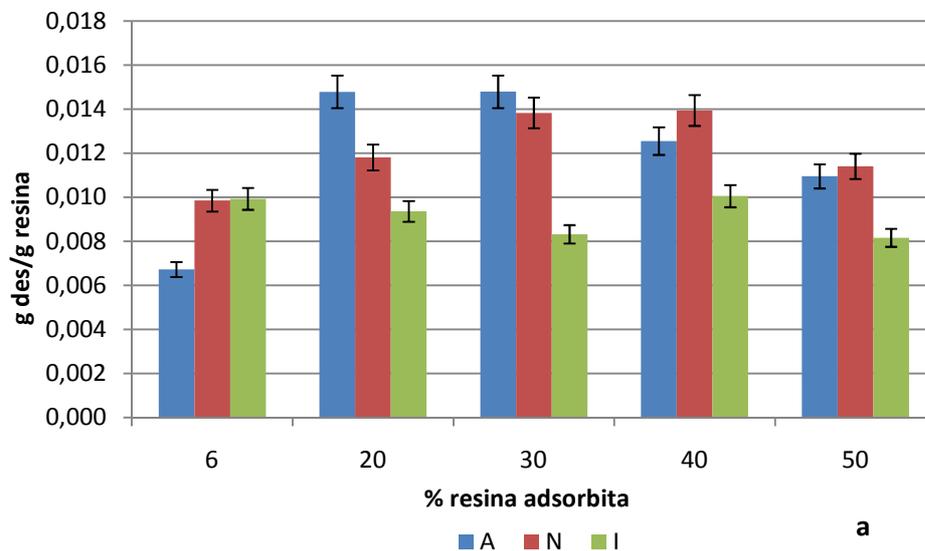


Figura 2.23. Adsorbimenti percentuali in funzione della percentuale di matrice adsorbente suddivise per tipo di adsorbimento per le AV1 (a) e le AV2 (b) in cui A = adsorbenti scambiatori anionici, N = adsorbenti neutri, I = adsorbente scambiatore ionico.

Quanto riscontrato negli andamenti degli adsorbimenti specifici, si ritrova anche in termini di adsorbimento percentuale. Nel caso delle acque di vegetazione a maggiore concentrazione di frazioni fenoliche, AV1, non è la scelta tra una resina anionica o neutra ad essere fondamentale per il recupero di tali frazioni, quanto

2. Parte sperimentale

piuttosto la concentrazione di matrice adsorbente: in entrambe i casi probabilmente si è in condizioni di saturazione della matrice dal momento che aumentando la sua concentrazione, la percentuale di adsorbimento continua ad aumentare. Nel caso delle acque di vegetazione tal quali, AV2, si riscontra un adsorbimento preferenziale delle componenti fenoliche per gli adsorbenti di tipo neutro, e sembra di essere nuovamente in presenza di saturazione del sistema come nel caso precedente. Lo stesso discorso vale per la matrice a scambio ionico, anche se con adsorbimenti percentuali inferiori. Nel caso degli adsorbenti anionici, che mostrano le performances peggiori, si raggiunge al massimo una percentuale di adsorbimento del 60% circa già con una concentrazione di matrice del 30%, ulteriori aumenti non portano a rese percentuali maggiori. Oltre ad un problema di diminuzione delle superficie utile all'adsorbimento per la presenza di polisaccaridi in questo scarto, tale classi di adsorbenti avendo siti attivi carichi positivamente, è probabilmente affine solo ad alcuni classi fenoliche, come per esempio ai polifenoli acidi che hanno una pKa superiore al pH delle acque tal quali.



2. Parte sperimentale

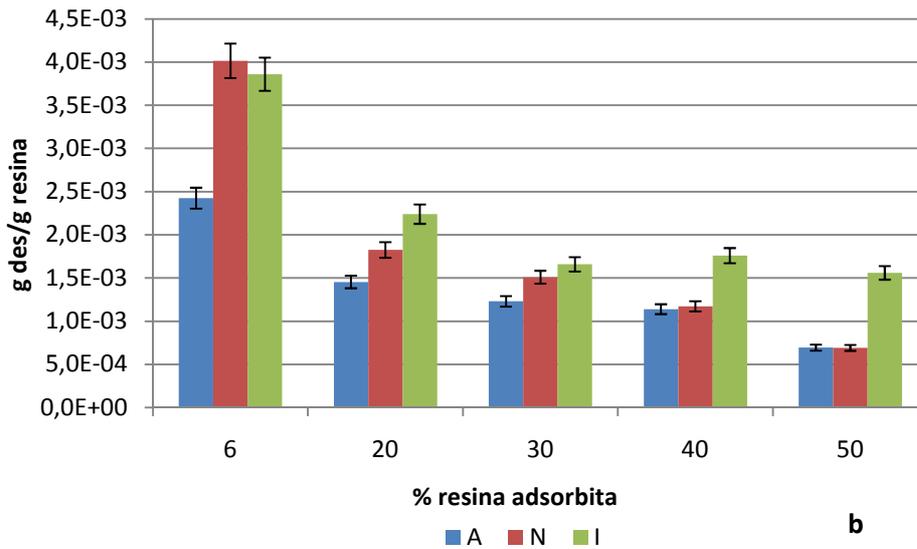


Figura 2.24. Desorbimenti specifici in funzione della percentuale di matrice adsorbente suddivise per tipo di adsorbimento per le AV1 (a) e le AV2 (b) in cui A = adsorbenti scambiatori anionici, N = adsorbenti neutri, I = adsorbente scambiatore ionico.

In termini di desorbimenti specifici, è possibile osservare nel caso delle AV1, delle condizioni operative ottimali in termini di concentrazione di matrice adsorbente utilizzata: per quanto riguarda la classe degli scambiatori anionici, i desorbimenti specifici maggiori si hanno utilizzando una concentrazione di adsorbente in fase di adsorbimento pari al 30 e 40%; nel caso degli adsorbenti neutri tale concentrazione è pari al 40 e 50%. La matrice a carattere ionico, a tutte le concentrazioni di resina, non dà desorbimenti specifici significativamente diversi tra loro all'interno dell'intervallo di errore.

Nel caso delle AV2, il maggiore rilascio delle componenti fenoliche adsorbite si riscontra alle concentrazioni di adsorbente minori in fase di adsorbimento.

2. Parte sperimentale

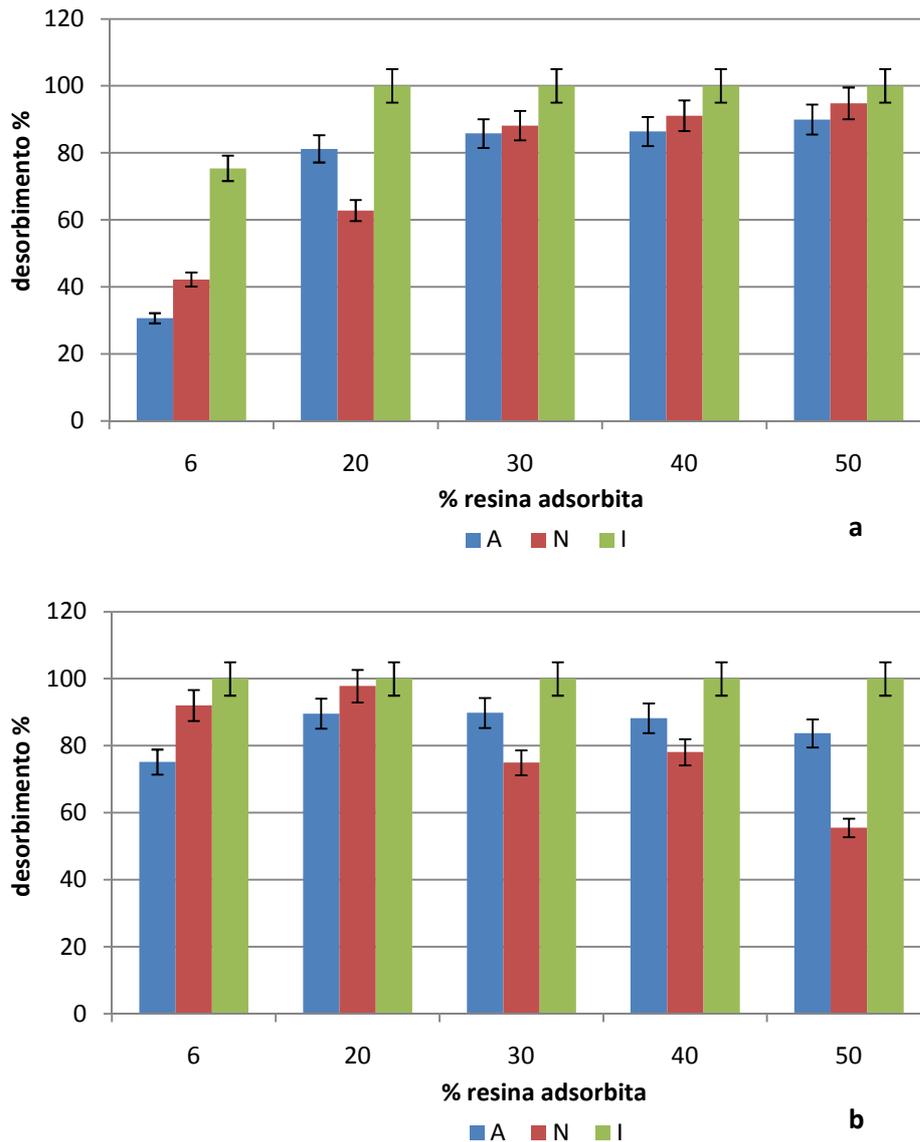


Figura 2.25. Desorbimenti percentuali in funzione della percentuale di matrice adsorbente suddivise per tipo di adsorbimento per le AV1 (a) e le AV2 (b) in cui A = adsorbenti scambiatori anionici, N = adsorbenti neutri, I = adsorbente scambiatore ionico.

Per quanto riguarda il processo di desorbimento, per entrambe le tipologie di acque di vegetazione, l'adsorbente a scambio anionico permette il recupero complessivo delle frazioni fenoliche adsorbite con l'etanolo acido scelto come solvente desorbente: ciò era prevedibile dal momento che non ci sono significative differenze tra valori di adsorbimento specifico e desorbimento specifico (Figure 2.22 e 2.24). per quanto riguarda le altre classi di matrice adsorbenti, alle diverse concentrazioni non si hanno significative differenze in

2. Parte sperimentale

termini di desorbimento percentuale, sembra però che il solvente scelto non sia in grado di recuperare tutte le frazioni fenoliche adsorbite dalla scarto.

Considerando l'intero processo, il grafico di figura 2.26, mostra l'andamento relativo alle diverse classi di resina.

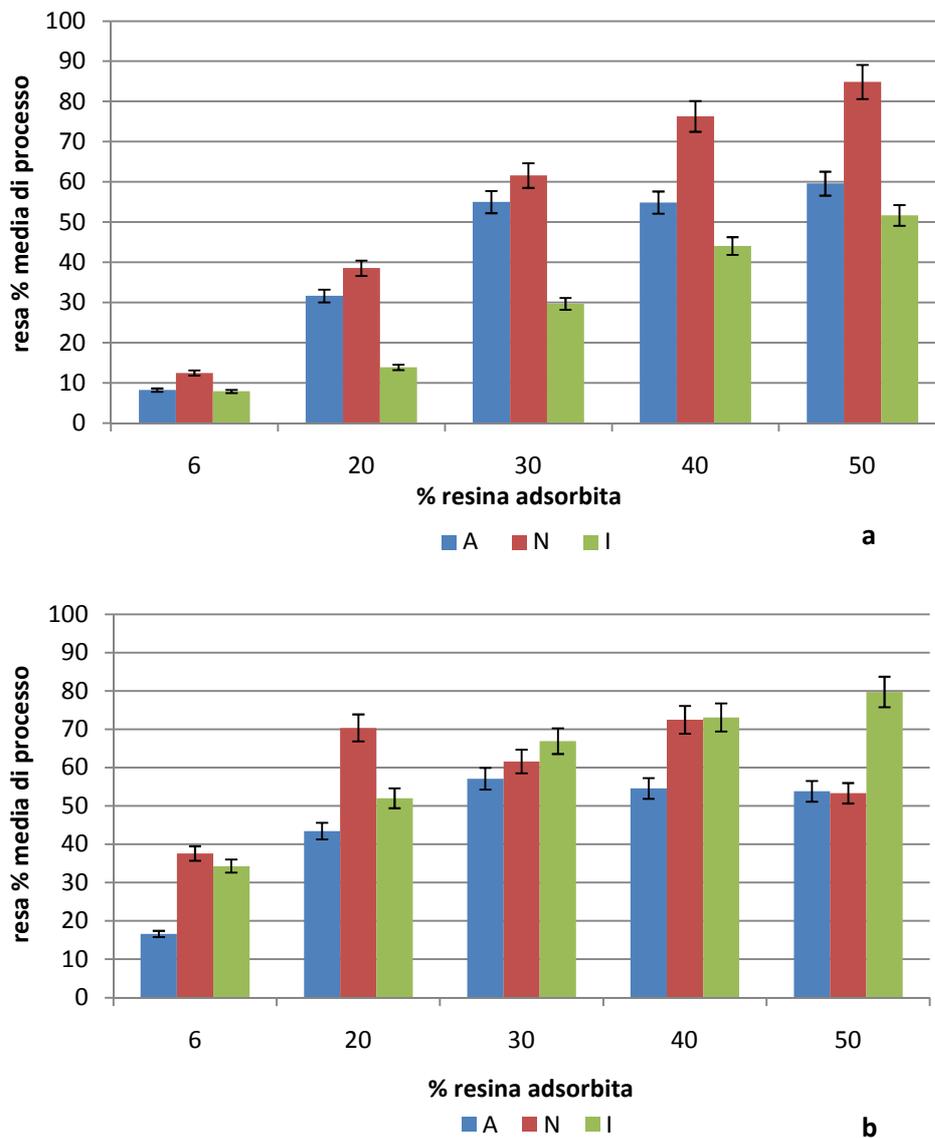


Figura 2.26. Rese medie di processo in funzione della percentuale di matrice adsorbente suddivise per tipo di adsorbimento per le AV1 (a) e le AV2 (b) in cui A = adsorbenti scambiatori anionici, N = adsorbenti neutri, I = adsorbente scambiatore ionico.

Le resine neutre, nel caso delle acque più concentrate, risultano avere una maggiore affinità per le frazioni fenoliche presenti nello scarto di lavorazione: a

2. Parte sperimentale

parità di concentrazione di adsorbente, infatti, si ottengono rese di processo maggiori. Inoltre aumentando la quantità di matrice, aumenta la resa di processo. Tale comportamento si riscontra anche per la resina a scambio ionico, anche se le percentuali di resa di processo sono inferiori. Per la classe degli scambiatori anionici, abbiamo rese di processo intermedie con valori massimi che si attestano intorno al 55-60% già al 30% di adsorbente.

Nelle acque di vegetazione tal quali, per la matrice a scambio ionico il discorso è del tutto analogo al precedente, anche se in questo caso avendo a che fare con una concentrazione di componenti fenoliche inferiori, le rese di processo risultano essere più elevate. Nel caso degli scambiatori anionici, si riscontrano nuovamente rese di processo intorno al 55% già al 30% di adsorbente. Per le matrici a carattere neutro, l'entità della resa di processo si attesta a valori del 70% circa, in un intervallo di concentrazioni di adsorbente dal 20 al 40%.

Scelta della miscela estraente ottimale per lo step di desorbimento.

Nel grafico di figura 2.27, vengono riportati gli andamenti relativi al processo di desorbimento in funzione della quantità di etanolo acido presente nella miscela desorbente, per ciò che riguarda le acque di vegetazione derivanti dai processi di filtrazione a membrana.

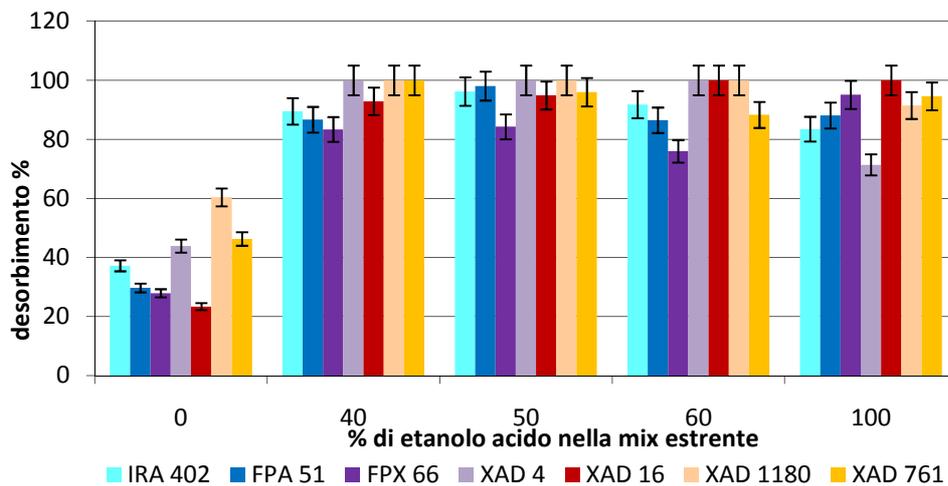


Figura 2.27. Rese percentuali del processo di desorbimento relative alle diverse tipologie di adsorbente utilizzato, in funzione della quantità di etanolo acido nella miscela estraente. Concentrazione adsorbente in fase di adsorbimento pari al 30%, desorbimento condotto a 80°C per 1h, con una concentrazione di adsorbente pari al 6%.

2. Parte sperimentale

Dagli andamenti sopra riportati è possibile osservare come in assenza di etanolo acido nella miscela estraente, le rese di recupero siano le più basse per tutte le diverse matrici adsorbenti utilizzate: la sola acqua non ha evidentemente una polarità sufficiente a rompere le interazioni che si creano tra le molecole fenoliche e le diverse matrici adsorbenti sia queste a carattere anionico, ionico o neutro. L'introduzione dell'etanolo acido, cambia la polarità del solvente ed anche il pH dell'ambiente in cui le sostanze adsorbite si vengono a trovare, facilitando il distacco dall'adsorbente al quale si trovano legate.

Scelta della quantità di HCl ottimale nella miscela estraente utilizzata per lo step di desorbimento.

Sempre per ciò che riguarda la fase di desorbimento, anche il pH del solvente desorbente può avere influenza sulle rese di recupero dalla matrice adsorbente visto che possiamo avere matrici che danno scambio anionico e ionico, ma anche matrici di tipo neutro.

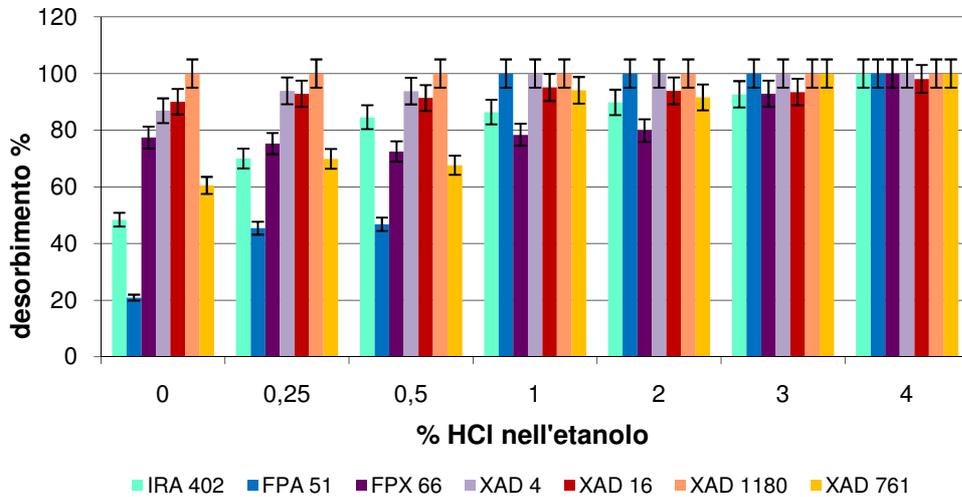


Figura 2.28. Rese percentuali del processo di desorbimento relative alle diverse tipologie di adsorbente utilizzato, in funzione della quantità di HCl nell'etanolo della miscela estraente. Concentrazione adsorbente in fase di adsorbimento pari al 30%, desorbimento condotto a 80°C per 1h, con una concentrazione di adsorbente pari al 6%.

Dagli andamenti sopra riportati, relativi alle AV1, si osserva che la presenza di HCl, ha una maggiore influenza nel caso delle matrici a scambio, dove l'acidità

2. Parte sperimentale

della miscela estraente sembra essere un fattore rilevante: sia quelle a scambio anionico, Amberlite IRA 402 ed Amberlite FPA 51, sia quella a scambio ionico, Amberlite XAD 761, danno rese di desorbimento maggiori per quantità di HCl crescenti. Probabilmente negli scambiatori anionici sia forti che deboli lo ione Cl^- derivante dall'acido cloridrico va a sostituirsi alle molecole adsorbite sui siti attivi amminici delle resine; per la matrice ionica, il comportamento è analogo, infatti risulta essere una matrice molto affine ad acidi e basi forti.

Recupero di idrossitirosolo da OMW tramite processi di adsorbimento e desorbimento su resina.

In tabella 2.4 vengono riportate le rese dei processi di adsorbimento e desorbimento relative alla molecola di idrossitirosolo, per tutti gli adsorbenti considerati in presenza di acque di vegetazione più concentrate, AV1.

Tabella 2.4. Rese di processo in termini di idrossitirosolo in funzione della tipologia di adsorbente. Adsorbimento condotto con il 10% di adsorbente per 24 ore, desorbimento condotto a 80°C con etanolo acido per 1h e con una concentrazione di adsorbente pari al 6%.

RESINA	Ads specifico (g ads/g resina)	Ads %	Des specifico (g ads/g resina)	Des %	Resa totale di processo
IRA 402	$1,00 \cdot 10^{-2}$	81	0,00402	40	33
FPA 51	$8,05 \cdot 10^{-3}$	65	0,00440	55	21
FPX 66	$8,42 \cdot 10^{-3}$	68	0,00551	65	45
XAD 4	0,00772	62	0,00427	55	35
XAD 1180	0,00760	62	0,00338	45	27
XAD 16	0,00847	69	0,00400	48	21
XAD 761	0,00573	46	0,00296	52	24

Dai risultati ottenuti è possibile osservare come le rese dell'intero processo di recupero dell'idrossitirosolo, siano piuttosto basse, a causa della difficoltà di desorbire tale molecola dalle diverse matrici a scambio, sia queste a carattere anionico, neutro o ionico.

In termini di adsorbimento, l'adsorbente a forte scambio anionico, l'Amberlite IRA 402, consente un miglior recupero con una resa di adsorbimento dell'80% circa, mentre per gli altri adsorbenti, i valori sono inferiori al 70%.

2. Parte sperimentale

Lo step di desorbimento, permette di recuperare con la miscela estraente di etanolo acido, solo la metà dell'idrossitirosolo adsorbito dalle acque.

Nel caso delle matrici a carattere neutro, tale molecola è in grado di instaurare interazioni di tipo π - π , con i siti aromatici dell'adsorbente, che rendono difficile il suo recupero con il solvente desorbente. Questo tipo di interazioni sarà prevalente anche nel caso di Amberlite XAD 761, dal momento che è anch'essa costituita da un polimero aromatico (fenolo-formaldeide). Nel caso degli scambiatori anionici, essendo le acque di vegetazione ad un pH inferiore alla pKa dell'idrossitirosolo⁵⁸, questo andrà ad interagire con i siti attivi di tipo amminico presenti su Amberlite IRA 402 e FPA 51, rendendone difficile il rilascio in presenza di un solvente acido.

Trattamenti successivi delle acque di vegetazione.

Per quanto riguarda le AV1, le quali permettono un maggior recupero di componenti fenoliche essendo più concentrate derivando da processi di filtrazione amembrana, è interessante indagare la possibilità di ritrattare le acque di vegetazione derivanti da un primo processo di adsorbimento con un secondo processo con resina nuova. A tale scopo si sono trattate le AV1 con l'adsorbente più efficiente tra le matrici polimeriche adsorbenti neutre, e quindi l'Amberlite XAD 16, e tra le anioniche l'Amberlite FPA 51.

In tabella 2.5 vengono riportati i risultati ottenuti per i vari trattamenti eseguiti.

Tabella 2.5. Rese dei processi del primo e secondo adsorbimento e dei rispettivi desorbimenti. Concentrazione di adsorbente in fase di adsorbimento pari al 30%; concentrazione di adsorbente in fase di desorbimento pari al 6%.

Resina 1° tratt.	% ads 1° tratt.	% des 1° tratt.	Resa totale	Resina 2° tratt.	% ads 2° tratt.	% des 2° tratt.	Resa totale
XAD 16	72	94	68	XAD 16	74	42	77
				FPA 51	58	44	75
FPA 51	51	100	52	XAD 16	80	73	81
				FPA 51	44	91	71

2. Parte sperimentale

I risultati relativi al primo processo di adsorbimento e successivo desorbimento sono sostanzialmente uguali a quelli ottenuti con le prove precedenti.

Ritrattando con l'adsorbente Amberlite XAD 16 le acque di vegetazione derivanti da un primo trattamento con lo stesso adsorbente, si può osservare che se il processo di adsorbimento permette di raggiungere una resa percentuale praticamente uguale, lo stesso non si può dire per il desorbimento che risulta essere molto più basso rispetto alle percentuali ottenute solitamente con questa matrice neutra. Probabilmente questo è dovuto al fatto che avendo già recuperato la maggior parte dei polifenoli presenti nelle acque di vegetazione, quelli rimasti vengono comunque adsorbiti da Amberlite XAD 16 nuova probabilmente penetrando in maniera più profonda nei pori della matrice, risultando così più difficili da recuperare con la miscela estraente durante il desorbimento.

Ritrattando invece con l'Amberlite FPA 51, si osserva un aumento nella resa percentuale del processo di adsorbimento rispetto a quelle normalmente raggiungibili con questa resina, probabilmente perché con il primo passaggio con Amberlite XAD 16, vengono allontanate solo determinate classi di polifenoli, lasciandone altre più affini all'adsorbente a scambio anionico, per esempio fenoli acidi, che al pH delle AV1 (4,6) si ritrovano indissociati e quindi si legano bene ai gruppi amminici presenti su tale matrice.

Se si passa ad osservare i risultati ottenuti per l'Amberlite FPA 51, si nota come utilizzando la stessa tipologia di matrice o l'adsorbente a carattere neutro, si ha un aumento piuttosto consistente nelle rese dell'intero processo. In particolare, utilizzando in un secondo processo la matrice Amberlite XAD 16, si nota come la resa del processo di desorbimento sia più elevata rispetto al caso precedente. Con un primo passaggio con Amberlite FPA 51 si riesce a recuperare come già visto in precedenza solo la metà delle componenti fenoliche; del restante 50% in presenza di nuova Amberlite FPA 51, nuovamente solo la metà viene recuperata da tale adsorbente, mentre con Amberlite XAD 16 se ne recupera un 80%, date le migliori performances degli adsorbenti neutri. In fase di desorbimento entrambe gli adsorbenti mostrano il loro solito andamento.

Conclusioni relative allo scarto liquido.

La fase di ultrafiltrazione ed osmosi inversa, seguita da una fase di separazione cromatografica, consente di recuperare una maggiore quantità di polifenoli, che da un lato possono fungere da *secondary chemical building blocks* per l'industria chimica^{36,59}, mentre dall'altro il residuo defenolato può essere bioconvertito a combustibili liquidi o gassosi come bioetanolo o biogas⁶⁰.

Se si considera la totalità dei polifenoli, la classe di adsorbenti a carattere neutro risulta avere un'affinità migliore per le componenti fenoliche presenti nello scarto di lavorazione delle olive se concentrato, mentre sulle acque tal quali le maggiori rese di separazione cromatografica si riscontrano per le matrici neutre e a scambio ionico. Gli adsorbenti anionici, sembrano non essere in grado di recuperare più del 55-60% delle frazioni fenoliche presenti probabilmente per la presenza di frazioni saccaridiche che influisce negativamente sul processo di adsorbimento in particolare nel caso delle AV2^{56,57}.

Per ciò che riguarda l'idrossitirosole, fenolo caratterizzante le acque di vegetazione, il suo recupero risulta piuttosto basso, anche se in fase di adsorbimento tale molecola viene recuperata dalle matrici adsorbenti considerate sia esse a carattere anionico, ionico o neutro con una percentuale media del 60% circa, il solvente utilizzato per il desorbimento e cioè l'etanolo acido non sembra essere adatto al recupero di tale molecole in maniera efficiente. È sicuramente necessario sviluppare ulteriormente la fase di purificazione cromatografica in particolare in termini di desorbimento dalle matrici polimeriche, investigando la possibilità di utilizzare altri solventi per meglio recuperare la molecola di idrossitirosole.

L'abbinamento di adsorbenti a carattere diverso permette di ottenere rese totali di processo superiori rispetto al loro utilizzo singolarmente.

Nel caso si debbano trattare acque di vegetazione tal quali senza passare attraverso step di filtrazione a membrana potrebbe essere strategico utilizzare enzimi a diverse attività carboidrasiche al fine di destrutturare i polisaccaridi in esse presenti ottenendo un bioliquefatto che in fase di purificazione cromatografica con adsorbenti a carattere anionico dovrebbe risentire meno di influenze negative da parte di polisaccaridi.

Scarti agroindustriali di tipo solido: crusca di grano.

L'altra tipologia di scarto agroindustriale è rappresentato da sottoprodotti di tipo solido. Lo schema riportato in figura 2.29 è un esempio di come è possibile valorizzare uno scarto solido come la crusca di grano tramite bioraffinazione.

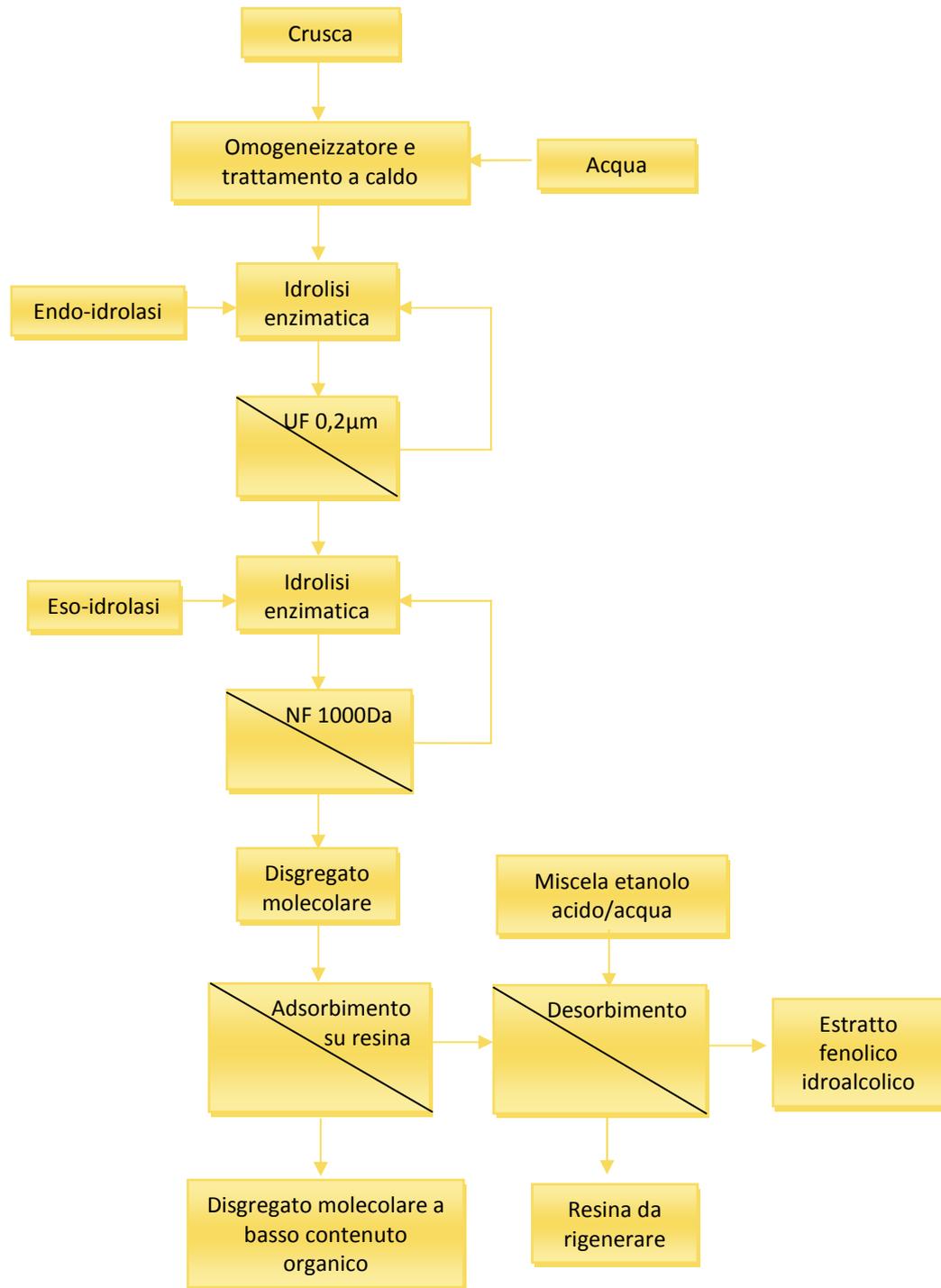


Figura 2.29. Processo di bioraffinazione di crusca di grano tramite idrolisi enzimatica, filtrazione a membrana e purificazione cromatografica.

2. Parte sperimentale

La prima operazione da effettuare su uno scarto di tipo solido è sicuramente quello di immettere acqua nel sistema come veicolo per l'omogeneizzazione del sistema stesso e come "solvente" in cui eseguire tutte le operazioni successive sulla biomassa. Gli scarti agroindustriali sono costituiti principalmente da polisaccaridi, i quali posti ad elevate temperature sono in grado di gelificare incorporando al loro interno acqua che può facilitare i successivi trattamenti di idrolisi della matrice vegetale, abbattendo in parte anche la carica microbica presente sulla biomassa che potrebbe creare problemi alla successiva idrolisi. Una volta ottenuto un sistema omogeneo e viscoso, si procede all'idrolisi enzimatica della crusca idrata. Sempre in un'ottica di processo a basso impatto ambientale un ruolo fondamentale lo giocano gli enzimi che operano tagli molecolari altamente specifici in condizioni blande e soprattutto in ambiente acquoso⁶¹.

Sul mercato sono presenti molti preparati enzimatici commerciali, caratterizzati da diverse attività carboidrasiche tra cui quelle cellulasiche e xilanasiche necessarie al fine di indirizzare il processo di bioraffinazione verso il maggiore recupero di biofenoli, contenuti nelle biomasse^{59,62}.

Nell'ottica di utilizzare biocatalizzatori enzimatici, è utile inserire nel processo di bioraffinazione, degli step successivi di UF e nano filtrazione (NF) in quanto scegliendo in maniera opportuna il taglio molecolare delle membrane, è possibile trattenere nel retentato l'enzima, che può quindi continuare la sua azione catalitica, e raccogliere il prodotto nel permeato^{63,64,65}.

In questo modo è possibile raccogliere il prodotto in continuo, ed evitare eventuali problemi di inibizione da prodotto dell'enzima, aumentando le rese del processo.

All'uscita dell'unità di NF si ottiene un disgregato molecolare in soluzione acquosa particolarmente ricco in componenti organiche. Tale disgregato ora può essere trattato come nel caso precedente con adsorbenti di tipo polimerico per la purificazione delle varie componenti in esso contenute.

Per quanto riguarda la bioraffinazione di scarti solidi dell'agroindustria come le crusche di grano, il problema maggiore che si riscontra, è la natura solida dello scarto stesso. In questo caso infatti, a differenza delle acque di vegetazione che essendo liquide contengono già in soluzione le componenti fenoliche di interesse,

i *secondary building blocks*, devono essere liberati dalle strutture delle matrici vegetali per essere portati in soluzione⁶⁶.

Nel caso della crusca di grano il composto fenolico di maggiore interesse è l'acido ferulico, presente in elevate quantità, fino al 4 % del peso secco della matrice vegetale⁶⁷. Diversi studi recentemente hanno dimostrato gli effetti positivi sulla salute umana dell'acido ferulico, così come di molti altri biofenoli. Oltre ad un elevato potere antiossidante legato alle caratteristiche di scavenging di questa molecola nei confronti dei radicali liberi, evidenziata anche in sistemi biologici⁶⁸, l'acido ferulico ha mostrato attività inibitorie nei confronti di diverse specie microbiche⁶⁹ tra cui diversi ceppi di *Listeria monocytogenes*, un batterio patogeno capace di crescere su derrate alimentari ed un'ottima capacità di filtro nei confronti dell'irraggiamento UV⁷⁰ sulla cute. Ampiamente studiati sono gli effetti antinfiammatori⁷¹, di protezione del sistema cardiocircolatorio^{72,73} e di difesa delle cellule neuronali⁷⁴. Accanto agli effetti benefici sulla salute umana, l'acido ferulico risulta essere una materia prima di interesse per l'industria chimica essendo precursore di notevoli prodotti ad alto valore aggiunto^{3,4,5}.

Processi di idrolisi acida e basica delle matrici di crusca consentono di ottenere il rilascio in soluzione acquosa delle sostanze fenoliche in essa contenute, ma tali processi presentano varie problematiche come l'utilizzo di sostanze pericolose, alte concentrazioni di sali nei prodotti neutralizzati etc., e sono dunque difficilmente industrializzabili.

Una valida e funzionale alternativa, sia in termini economici che ambientali, può essere rappresentata dall'utilizzo di biocatalizzatori enzimatici ormai largamente utilizzati in diversi processi industriali. Diverse specie microbiche, soprattutto fungine, producono infatti normalmente enzimi idrolitici come xilanasi, pectinasi, aril-esterasi, cellulasi etc. al fine di aggredire le pareti cellulari vegetali delle piante; tali attività quindi possono essere opportunamente scelte e sfruttate per aggredire qualsiasi parete cellulare come per esempio quella della crusca di grano. In particolare l'acido ferulico si trova legato alle catene xilanasiche che costituiscono la struttura della parete cellulare della crusca, quindi al fine di renderlo disponibile in soluzione acquosa sono necessari biocatalizzatori ad elevata attività xilanasica, possibilmente sia eso che endoxilanasica (Figura 2.30).

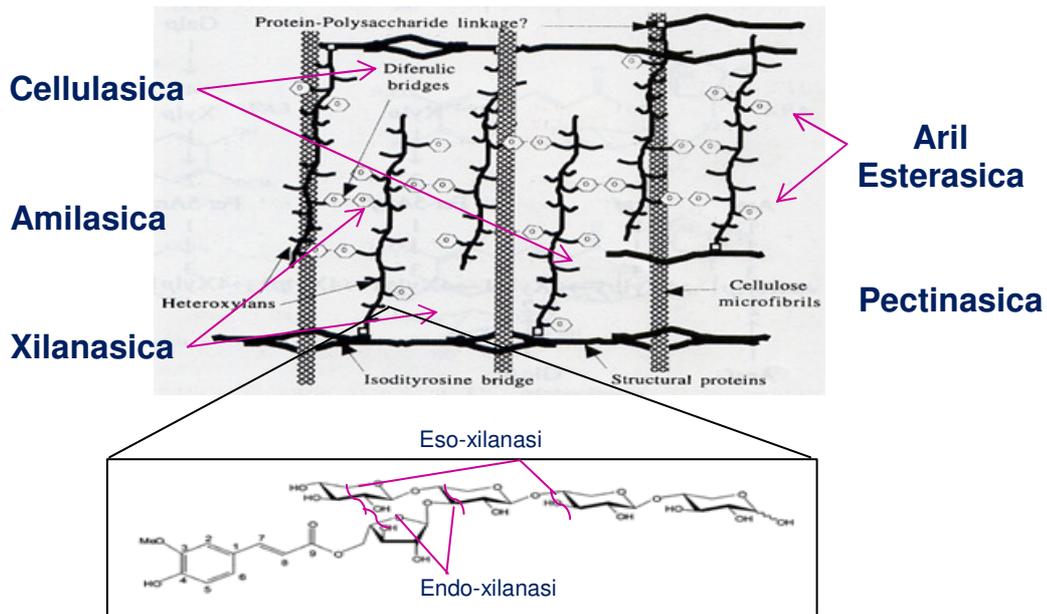


Figura 2.30. Struttura polissaccaridica della parete cellulare della crusca di grano.

Diversi sono gli studi che utilizzano un approccio di bioraffinazione come quello descritto in figura 2.29, per il recupero di acido ferulico al fine di produrre per esempio vanillina³⁴ oppure 4-vinilfenolo⁷⁵. Il problema di tale processo è che tramite il pretrattamento termico e successivo trattamento biocatalitico, si arriva a recuperare solo un 30% di tutto l'acido ferulico presente nella matrice vegetale. Tale limitazione è causata da possibili effetti di inibizione competitiva da prodotto dei biocatalizzatori utilizzati. Le xilanasi infatti risentono di inibizione da parte del monomero di xilosio e di oligomeri a due o più unità di xilosio, che vengono rilasciati dall'azione idrolitica operata dall'enzima sulle catene di xilano^{76,77}.

Per ovviare a tale problema può essere interessante andare ad inserire all'interno del processo di bioraffinazione della crusca per il recupero dell'acido ferulico, uno step di microfiltrazione/ultrafiltrazione, in modo da allontanare dal sistema i possibili inibitori del biocatalizzatore, come mostrato nel flow sheet di figura 2.29, aumentando le rese di recupero.

Idrolisi enzimatica: caratterizzazione del preparato enzimatico Fungamyl Super AX.

Sul mercato sono presenti molti preparati enzimatici commerciali, proposti dalle case produttrici come additivi tecnologici ad uso specifico e non come preparati enzimatici caratterizzati puntualmente per le loro attività. Volendo utilizzare questi preparati come biocatalizzatori a basso costo, ma in maniera razionale al fine di indirizzare il processo verso il maggiore recupero di biofenoli dagli scarti agroindustriali, è necessario provvedere ad una caratterizzazione puntuale delle attività enzimatiche, in particolare carboidrasiche, ed ancor più nello specifico al fine di destrutturare le catene arabinoxilatiche della crusca per liberare acido ferulico, xilanasiche.

Determinando la quantità di zuccheri riducenti⁷⁸, che consente indirettamente di valutare su substrati modello (xilano, pectina, amido), l'azione complessiva di tutte le diverse attività enzimatiche contenute nei preparati commerciali, è possibile determinare l'entità dell'idrolisi delle principali strutture polisaccaridiche vegetali ad opera degli enzimi scelti.

In particolare, il preparato enzimatico Fungamyl Super AX, prodotto di fermentazioni dei microrganismi *Aspergillus oryzae* e *Humicola insolens*, già utilizzato in processi di idrolisi della crusca di grano^{59,75}, presenta elevate attività xilanasiche, amilasiche e pectinasiche, nonché arilesterasiche, adatte alla disgregazione della matrice vegetale della biomassa in esame per il recupero di acido ferulico.

Essendo le attività enzimatiche influenzate dal pH e dalla temperatura del sistema nel quale agiscono è necessario determinare quali siano i valori ottimali di queste due grandezze per gli enzimi che si sceglie di utilizzare nel processo di bioraffinazione della crusca.

La crusca di grano in soluzione acquosa presenta un pH naturale tra 5,0 e 5,4, mentre altri scarti solidi, come per esempio nelle vinacce il pH è più acido intorno al 3,8. Per questo in un'ottica più ampia per trattare tutti gli scarti agroindustriali in un processo di *biorefinery* come quello riportato in precedenza è bene valutare il comportamento degli enzimi a questi valori di pH.

2. Parte sperimentale

I grafici in figura 2.31 e 2.32, si riferiscono alla reazione condotta su un substrato modello di xilano allo 0,3% a pH 3,8 e a pH 5,0 a diverse temperature per verificare come la variazione di pH influenzerà la velocità iniziale della reazione e la concentrazione di zuccheri riducenti rilasciati.

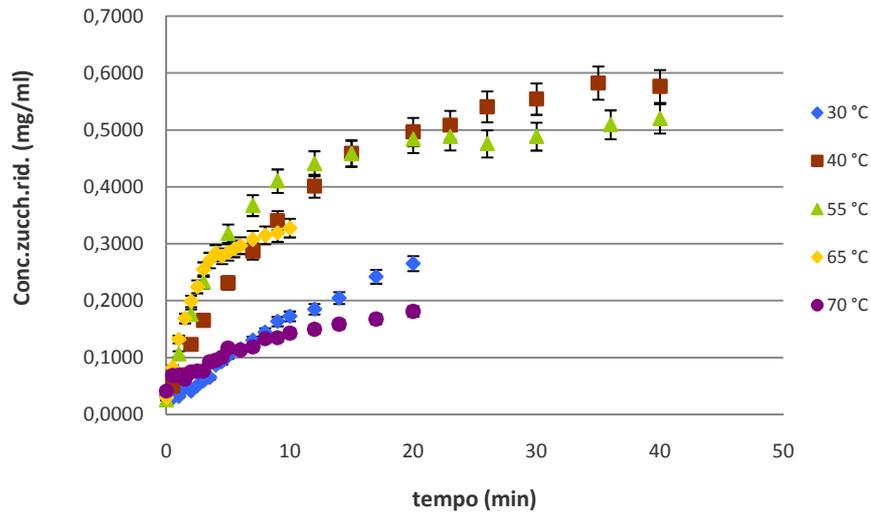


Figura 2.31. Rilascio di zuccheri riducenti in funzione del tempo trascorso dall'inizio della reazione condotta con Fungamyl Super AX diluito 1:1000 su un substrato di xilano allo 0,3% a pH 3,8.

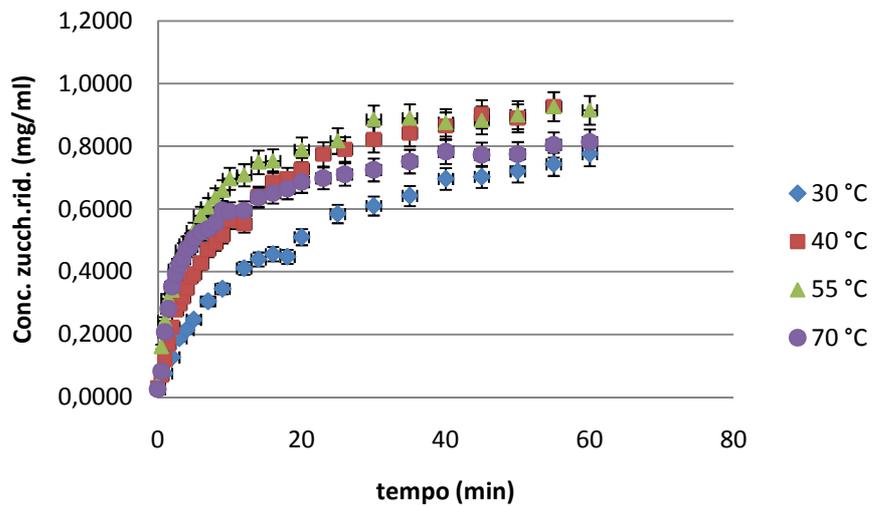


Figura 2.32. Rilascio di zuccheri riducenti in funzione del tempo trascorso dall'inizio della reazione condotta con Fungamyl Super AX diluito 1:1000 su un substrato di xilano allo 0,3% a pH 5,0.

2. Parte sperimentale

Si nota innanzitutto che la quantità di xilosio rilasciato risulta a tutte le temperature significativamente superiore a pH 5,0 rispetto a quella ottenuta a pH 3,8.

Le temperature migliori alle quali condurre la reazione sono 45°C nel caso di pH 3,8, e 55°C nel caso di pH 5,0; questi dati sono in linea con quanto riportato in letteratura per xilanasi derivanti da *Aspergillus oryzae*⁷⁹ e *Humicola insolens*⁸⁰. Per le prime gli autori riportano una temperatura ottimale tra 60 e 65 °C e un pH tra 5,5 e 6,5. Per gli enzimi estratti da *Humicola insolens* invece è stata trovata una temperatura ottimale di 55-60°C e un pH di 6-6,5.

L'equazione di Arrhenius ci consente di calcolare l'energia di attivazione della reazione di idrolisi enzimatica attraverso la seguente relazione:

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_{att}}{R \cdot T}}$$

dove:

k = costante di velocità;

A = fattore pre-esponenziale;

R = costante dei gas ($\frac{J}{K \cdot mol}$);

T = temperatura (°K);

E_{att} = energia di attivazione (J).

È necessario quindi calcolare la velocità iniziale delle reazioni enzimatiche alle diverse temperature (Figura 2.33 e 2.34).

2. Parte sperimentale

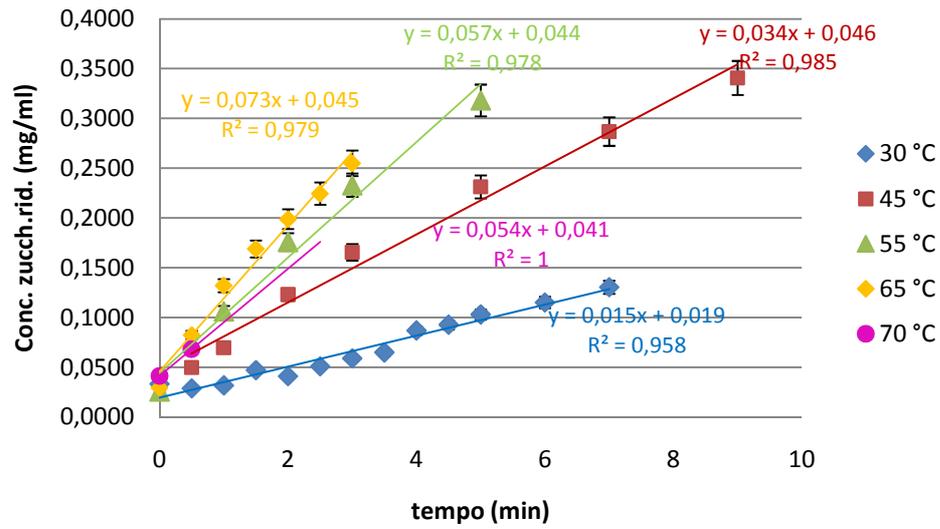


Figura 2.33. Concentrazione di zuccheri riducenti rilasciati nei primi minuti della reazione enzimatica condotta su un substrato di xilano allo 0,3% a pH 3,8 ed enzima diluito 1:1000.

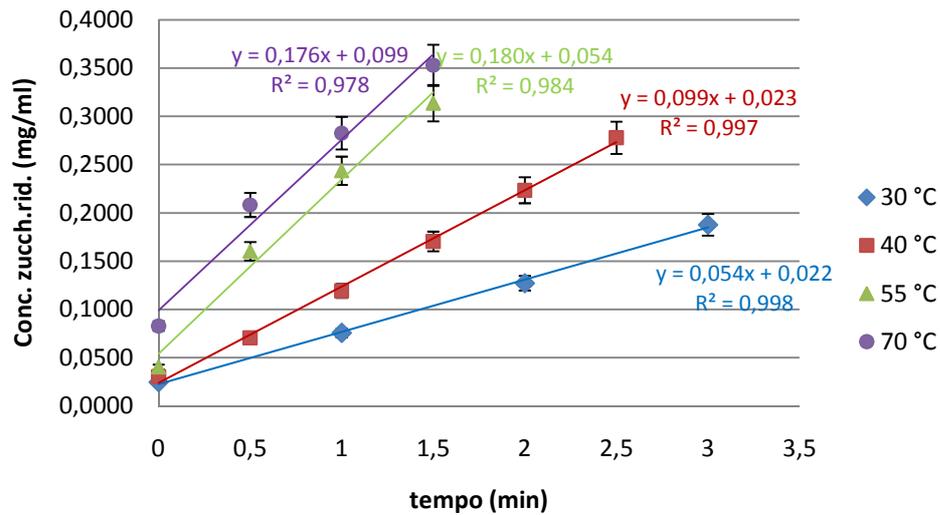


Figura 2.34. Concentrazione di zuccheri riducenti rilasciati nei primi minuti della reazione enzimatica condotta su un substrato di xilano allo 0,3% a pH 5,0 ed enzima diluito 1:1000.

Interpolando ciascuna serie di dati si ottiene una retta la cui pendenza corrisponde alla velocità di reazione alle varie temperature, i cui valori sono riassunti in tabella 2.6.

2. Parte sperimentale

Tabella 2.6. Velocità iniziali riscontrate alle diverse temperature per i pH 3,8 e 5,0, relative alle reazioni enzimatiche condotte su substrato di xilano allo 0,3% ed enzima diluito 1:1000.

Temperatura (°C)	pH	Velocità iniziale (mg/ml*min)
30	3,8	$0,015 \pm 9 \cdot 10^{-4}$
	5,0	$0,054 \pm 3 \cdot 10^{-3}$
40	3,8	$0,034 \pm 2 \cdot 10^{-3}$
	5,0	$0,099 \pm 6 \cdot 10^{-3}$
55	3,8	$0,057 \pm 3 \cdot 10^{-3}$
	5,0	$0,180 \pm 1 \cdot 10^{-2}$
65	3,8	$0,073 \pm 4 \cdot 10^{-2}$
	5,0	n.r.
70	3,8	$0,054 \pm 3 \cdot 10^{-3}$
	5,0	$0,176 \pm 1 \cdot 10^{-2}$

In generale si osserva un aumento della velocità di reazione variando la temperatura da 30 a 65°C come previsto dall'equazione di Arrhenius mentre, a 70°C, la rapida diminuzione dell'attività enzimatica, a causa della ragionevole disattivazione, rende difficile la corretta determinazione della velocità iniziale; in particolare per la retta a 70°C a pH 3,8, l'interpolazione dei dati è stata eseguita solo su due punti quindi il valore di velocità iniziale ricavato non può essere considerato attendibile.

Una volta determinati gli effetti della temperatura sull'attività enzimatica si è tentato di capire quale fosse la stabilità dell'enzima alle sue temperature ottimali di lavoro che sono risultate essere 40°C e 55°C rispettivamente a pH 3,8 e a pH 5.

2. Parte sperimentale

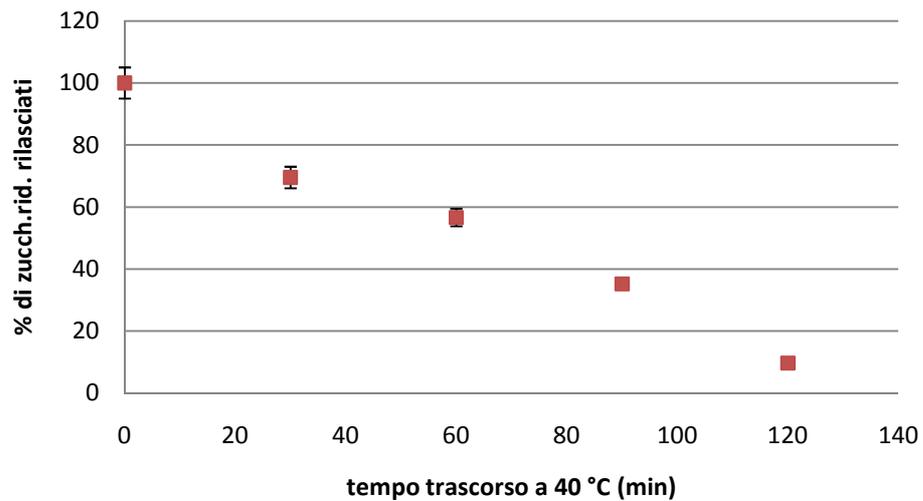


Figura 2.35. Diminuzione dell'attività enzimatica espressa in termini di zuccheri riducenti rilasciati in funzione del tempo di permanenza dell'enzima a 40 °C e pH 3,8 ed enzima diluito 1:1000.

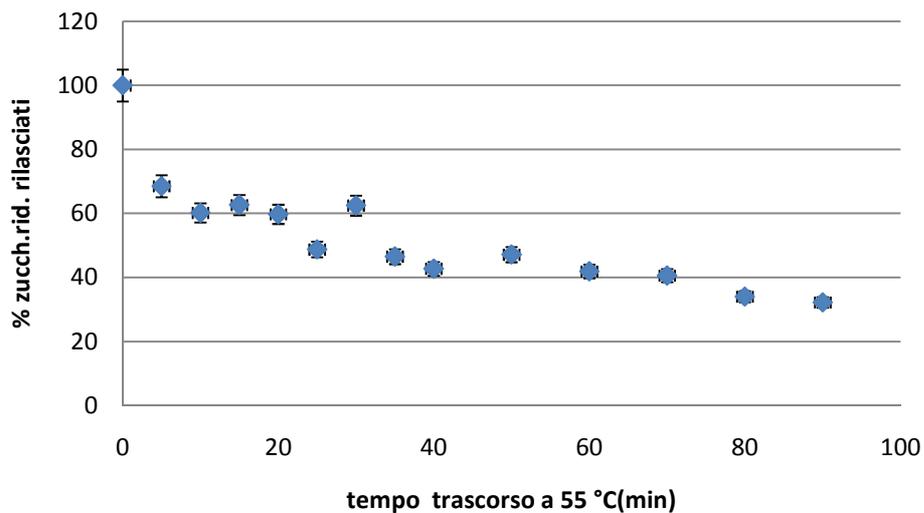


Figura 2.36. Diminuzione dell'attività enzimatica espressa in termini di zuccheri riducenti rilasciati in funzione del tempo di permanenza dell'enzima a 55 °C e pH 5,0 ed enzima diluito 1:1000.

Lo studio è stato condotto considerando come riferimento la concentrazione di zuccheri riducenti rilasciati appena la soluzione enzimatica è stata portata a 40°C o 55°C, cioè quando l'attività enzimatica è ancora completa (valore fissato come 100%). La quantità di zuccheri riducenti rilasciati nelle prove effettuate a tempi successivi è stata espressa come percentuale del valore massimo iniziale. Si nota

2. Parte sperimentale

che a 40 °C il tempo di mezza vita dell'enzima è di circa 64 minuti. L'attività xilanasica si azzerava dopo altrettanti minuti (Figura 2.35).

A 55°C (Figura 2.36) il tempo di mezza vita è pari a 30 minuti, quindi molto inferiore al precedente, ma il successivo decremento risulta meno rapido che a 40 °C. Tali dati sono confermati da quelli riportati da E.-M. Dusterhoft e collaboratori (1997), i quali hanno determinato che la xilanasia estratta da *Humicola Insolens* da loro caratterizzata ha una perdita di attività del 50% dopo 45 minuti a 60°C⁸⁰.

Per il calcolo dell'energia di attivazione si sono considerate quindi le temperature da 30 a 65°C per il pH 3,8 e quelle da 30 a 55 °C per il pH 5,0.

Dalle velocità iniziali ricavate alle diverse temperature è possibile risalire alle costanti cinetiche della reazione che dal complesso enzima-substrato porta alla formazione del prodotto (stadio lento della reazione enzimatica). L'equazione che lega la velocità di reazione alla costante di velocità è:

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot [ES]$$

dove [ES] è la concentrazione del complesso enzima-substrato. Poiché la concentrazione di enzima (1g/l) utilizzata nelle prove consente di essere a saturazione con un substrato allo 0,3% (p/v), si può considerare la concentrazione del complesso uguale a quella iniziale di enzima.

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot [E_0]$$

A questo punto, essendo note le velocità e la concentrazione di enzima utilizzata, è possibile calcolare le costanti di velocità della reazione condotta alle diverse temperature.

E' possibile poi calcolare l'energia di attivazione tramite l'equazione di Arrhenius scritta in forma logaritmica:

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{E_{att}}{R} \cdot \frac{1}{T}$$

2. Parte sperimentale

Essa corrisponde all'equazione di una retta con pendenza $(\frac{E_{att}}{R})$. Si è quindi riportato in grafico il logaritmo naturale delle costanti di velocità in funzione dell'inverso della temperatura (Figura 2.37 e Figura 2.38 **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**).

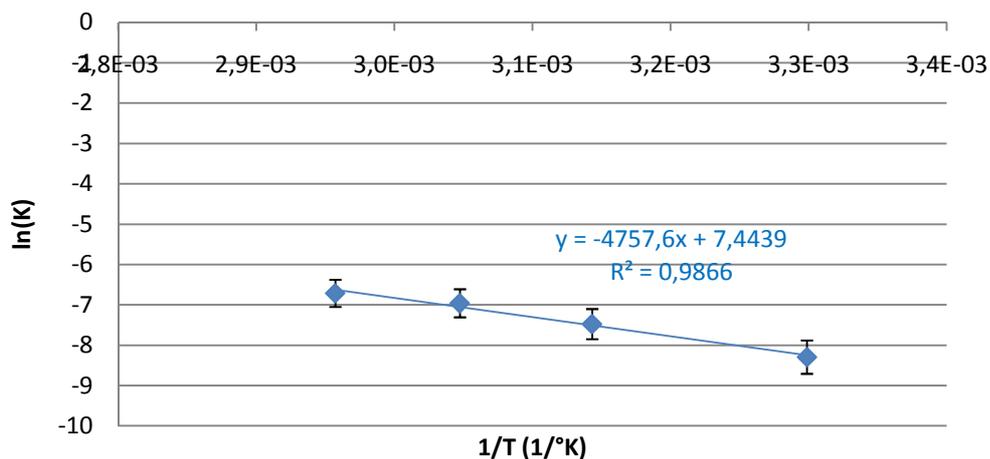


Figura 2.37. Retta derivante dall'equazione di Arrhenius per il calcolo dell'energia di attivazione della reazione condotta a pH 3,8 su xilano allo 0,3% ed enzima diluito 1:1000.

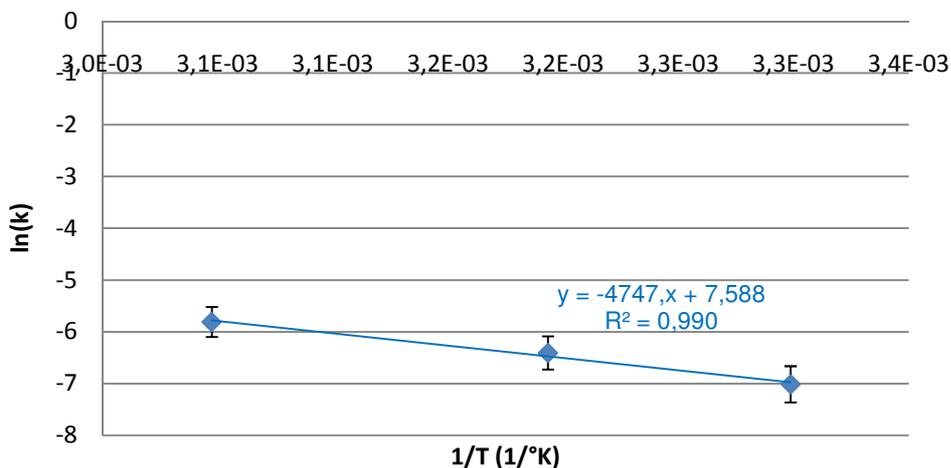


Figura 2.38. Retta derivante dall'equazione di Arrhenius per il calcolo dell'energia di attivazione della reazione condotta a pH 5,0 su xilano allo 0,3% ed enzima diluito 1:1000.

Dalla pendenza delle rette ottenute interpolando i dati, moltiplicando per la costante dei gas (R), si ottiene:

2. Parte sperimentale

$E_{\text{att}} = 39,6 \pm 2,3 \text{ kJ/mol}$ per la reazione a pH 3,8

$E_{\text{att}} = 39,5 \pm 2,4 \text{ kJ/mol}$ per la reazione a pH 5,0

I valori di energia di attivazione calcolati risultano molto simili per entrambi i pH e sono in linea con quanto riportato in letteratura, sebbene il calcolo relativo al pH 5,0 risulti approssimato in quanto effettuato su soli tre punti. M. Turkiewicz e collaboratori (2000) riportano per due xilanasi studiate una energia di attivazione della reazione di idrolisi di 35,5 kJ/mol e 42,5 kJ/mol⁸¹. L. He *et al.* (1993) confermano tali dati: infatti le xilanasi da loro caratterizzate risultano avere energie di attivazione di 35,3 kJ/mol e 42,7 kJ/mol. Inoltre, come il preparato enzimatico studiato in questo lavoro, presentano un ottimo di pH intorno a 5,5 e una temperatura ottimale di 50°C⁸². I valori di energia di attivazione della reazione di idrolisi dello xilano catalizzata da enzimi sono nettamente inferiori a quelli relativi all'idrolisi acida dello stesso substrato. In letteratura è riportato infatti che quest'ultima reazione ha una energia di attivazione compresa tra 99.3–130 kJ/mol per xilano contenuto nei residui della lavorazione della canna da zucchero⁸³.

Alle temperature ottimali di lavoro individuate per i due diversi valori di pH, i tempi di inattivazione dell'enzima risultano più lunghi del tempo al quale alle stesse temperature, viene raggiunto il plateau. Ciò può indicare che il cessato rilascio di zuccheri non sia dovuto ad inattivazione dell'enzima bensì ad una inibizione da prodotto. In questo caso la separazione dello xilosio dalla miscela di reazione può consentire all'enzima di reagire ulteriormente.

Idrolisi enzimatica: caratterizzazione del preparato enzimatico Celluclast BG.

Il preparato enzimatico Celluclast BG (Novozyme), è caratterizzato da una dichiarata attività cellulasica e xilanasica, ed è ottenuto per fermentazione da *Trichoderma reesei*, microrganismo per il quale sono noti in letteratura, i valori di pH ottimali per la sua attività xilanasica, che risultano essere compresi tra il 4,0 e 5,5⁸⁴.

2. Parte sperimentale

Anche in questo caso sono stati valutati i parametri ottimali in termini di pH e temperatura.

Per ciò che riguarda il pH sono stati scelti sempre i valori 3,8 e 5,0.

In termini di temperatura, in figura 2.39 e 2.40, vengono riportati gli andamenti relativi al rilascio di zuccheri riducenti nel tempo ad opera dell'enzima su di un substrato modello costituito da una soluzione di xilano allo 0,3% in acqua, a diverse temperature e a pH 3,8 e 5,0 rispettivamente.

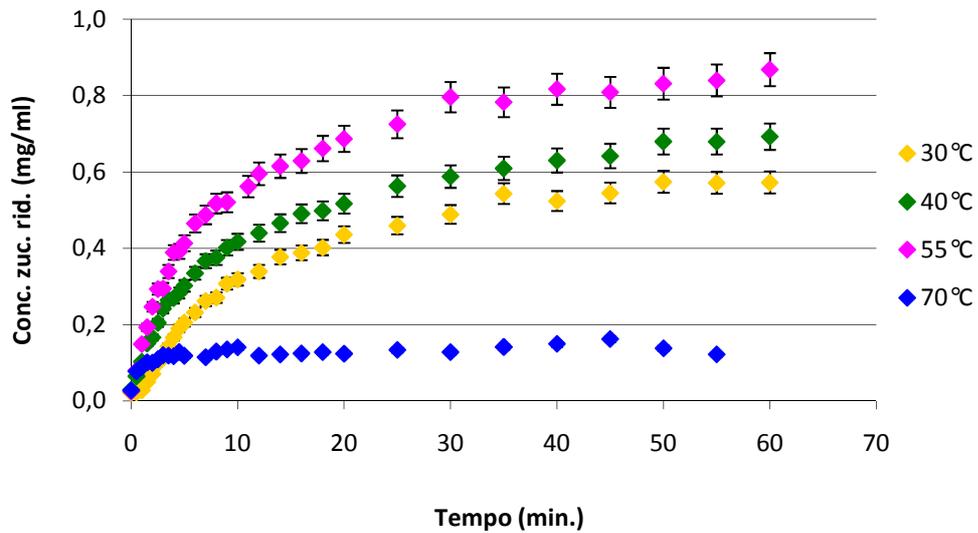
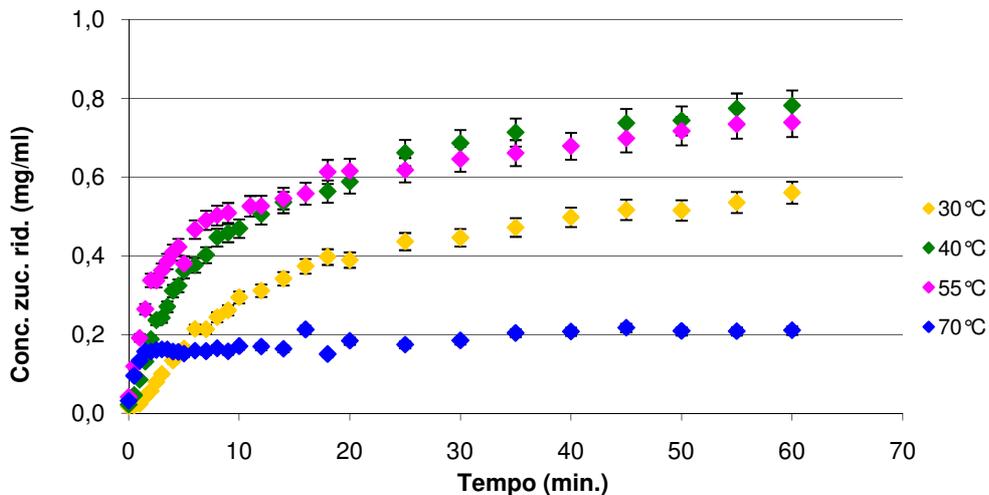


Figura 2.39. Rilascio di zuccheri riducenti in funzione del tempo trascorso dall'inizio della reazione condotta con Fungamyl Super AX diluito 1:1000 su un substrato di xilano allo 0,3% a pH 3,8.



2. Parte sperimentale

Figura 2.40. Rilascio di zuccheri riducenti in funzione del tempo trascorso dall'inizio della reazione condotta con Fungamyl Super AX diluito 1:1000 su un substrato di xilano allo 0,3% a pH 5,0.

Gli andamenti in termini di concentrazioni di zuccheri riducenti rilasciate in soluzione sono del tutto analoghi.

Si osserva innanzitutto che per le prove condotte ad una temperatura di 70°C, si ottengono rilasci complessivi di zuccheri riducenti minore rispetto a tutte le altre temperature già dopo i primi due minuti di reazione, questo è probabilmente dovuto al fatto che una temperatura così elevata inattiva molto velocemente la capacità catalitica di Celluclast BG.

A pH 3,8, per ottenere il massimo rilascio di zuccheri riducenti in soluzione la temperatura di 55°C risulta essere quella ottimale, mentre a pH 5,0 i rilasci maggiori si hanno per le temperature di 40 e 55°C; tali rilasci inoltre tendono a convergere come conseguenza di una progressiva diminuzione dell'attività enzimatica alla temperatura maggiore.

Da un punto di vista cinetico le velocità iniziali di reazione di rilascio di zuccheri riducenti risultano lineari nel tempo al di sotto dei 4-5 minuti di reazione.

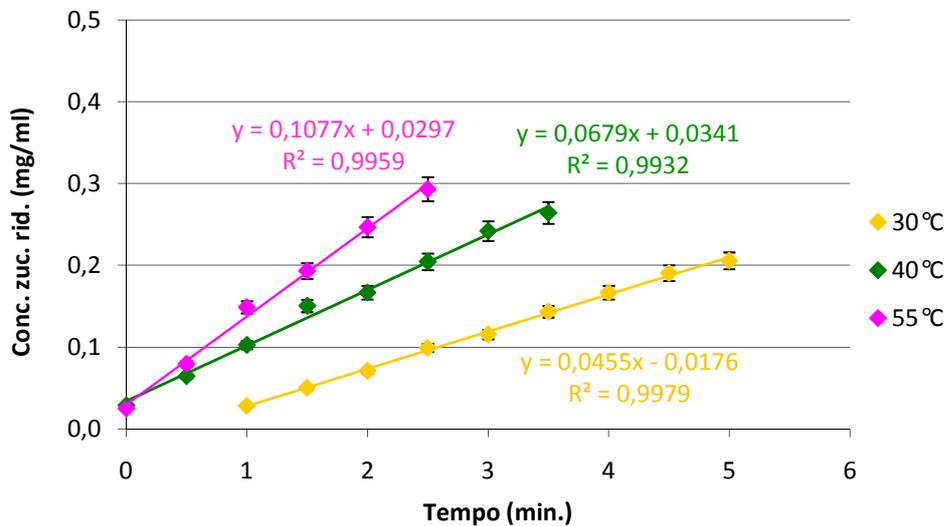


Figura 2.41. Concentrazione di zuccheri riducenti rilasciati nei primi minuti della reazione enzimatica condotta su un substrato di xilano allo 0,3% a pH 3,8 ed enzima diluito 1:1000.

2. Parte sperimentale

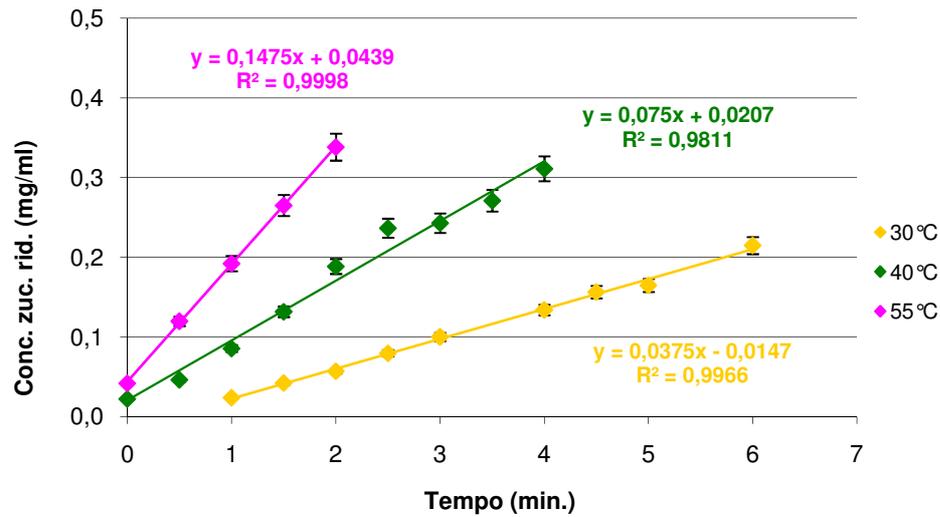


Figura 2.42. Concentrazione di zuccheri riducenti rilasciati nei primi minuti della reazione enzimatica condotta su un substrato di xilano allo 0,3% a pH 5,0 ed enzima diluito 1:1000.

Tabella 2.7. Velocità iniziali riscontrate alle diverse temperature per i pH 3,8 e 5,0, relative alle reazioni enzimatiche condotte su substrato di xilano allo 0,3% ed enzima diluito 1:1000.

Temperatura (°C)	pH	Velocità iniziale (mg/ml*min)
30	3,8	$0,046 \pm 3 \cdot 10^{-3}$
	5,0	$0,038 \pm 2 \cdot 10^{-3}$
40	3,8	$0,068 \pm 4 \cdot 10^{-3}$
	5,0	$0,075 \pm 5 \cdot 10^{-3}$
55	3,8	$0,108 \pm 6 \cdot 10^{-3}$
	5,0	$0,148 \pm 9 \cdot 10^{-3}$

In generale si osserva che le velocità iniziali delle reazioni sono maggiori a pH 5,0 rispetto a quelle a pH 3,8 ed aumentano proporzionalmente con l'aumento della temperatura da 30 a 55°C (Tabella 2.7). Le curve a temperatura di 70°C non sono state considerate vista la rapida disattivazione dell'enzima ad entrambi i valori di pH considerati.

2. Parte sperimentale

Soltanto alla temperatura di 55°C si osservano le velocità iniziali maggiori per i pH 3,8 e 5,0: questo risultato è in linea con quanto riportato in letteratura per temperature ottimali di lavoro dell'enzima in questione⁸⁵.

Ai fini del processo di bioraffinazione è importante verificare per quanto tempo l'enzima risulta stabile alla temperatura di lavoro.

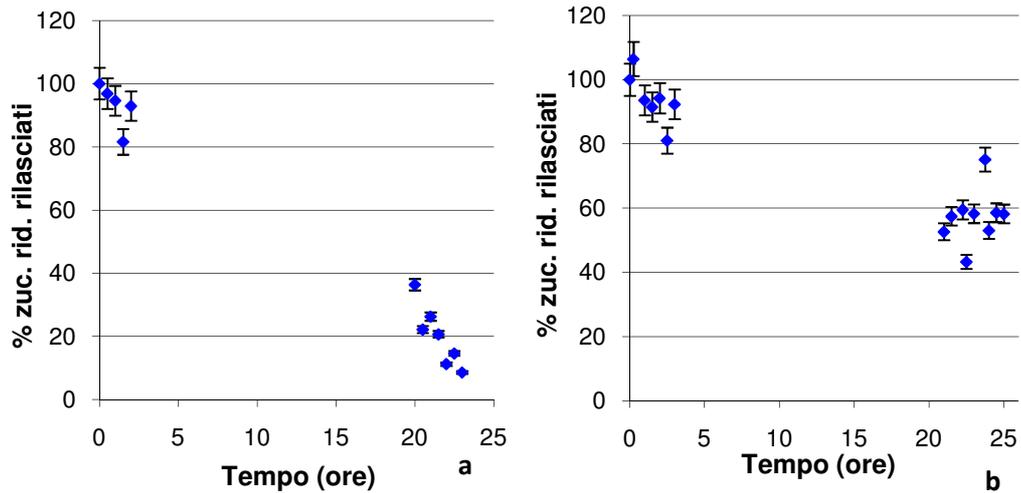


Figura 2.43. Attività enzimatica espressa in termini di zuccheri riducenti rilasciati in funzione del tempo di permanenza dell'enzima a pH 3,8 a 40 °C (a) e 55°C (b) ed enzima diluito 1:1000.

La stabilità dell'enzima è inferiore a pH 3,8 in cui il tempo di mezza risulta di circa 12 ore rispetto a quella a pH 5,0 che risulta più stabile mostrando un tempo di mezza vita di almeno 24 ore (Figura 2.43). A 55°C la stabilità dell'enzima diminuisce drasticamente risultando più instabile a pH 5,0, nonostante sia il valore di pH ottimale per l'attività enzimatica specifica.

2. Parte sperimentale

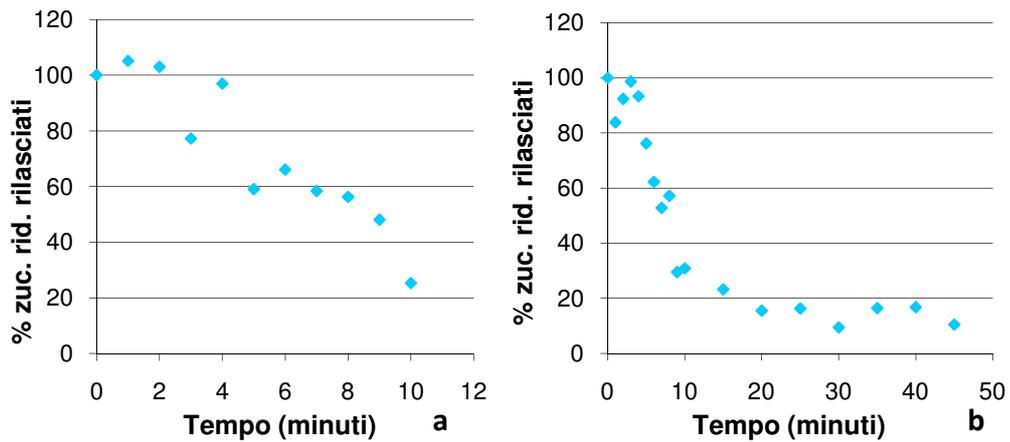


Figura 2.44. Attività enzimatica espressa in termini di zuccheri riducenti rilasciati in funzione del tempo di permanenza dell'enzima a pH 5,0 a 40 °C (a) e 55°C (b) ed enzima diluito 1:1000.

I dati di stabilità ricavati sono in grado di spiegare anche quanto osservato nelle prove cinetiche di rilascio degli zuccheri riducenti a varie temperature a pH 5,0. I comportamenti anomali del rilascio degli zuccheri riducenti a 55°C sono quindi giustificabili, infatti la Figura 2.40 mostra un arresto dell'attività enzimatica a pH 5,0 proprio intorno a 9-10 minuti, coerentemente con il tempo di mezza vita dell'enzima stesso in quelle condizioni (Figura 2.44 b); così come il calo osservato a pH 3,8 (Figura 2.39) risulta coerente con il tempo di mezza vita dell'enzima in queste condizioni.

Dalle velocità iniziali di reazione calcolate alle diverse temperature è possibile risalire alle costanti cinetiche della reazione che dal complesso enzima-substrato porta alla formazione del prodotto (stadio lento della reazione enzimatica) come descritto per Fungamyl SuperAX, e da queste risalire all'energia di attivazione.

2. Parte sperimentale

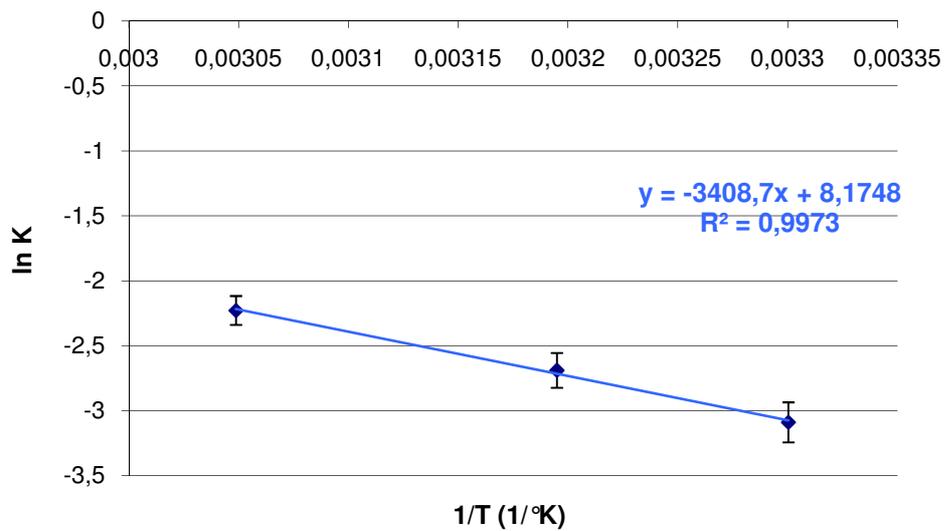


Figura 2.45. Retta derivante dall'equazione di Arrhenius per il calcolo dell'energia di attivazione della reazione condotta a pH 3,8 su xilano allo 0,3% ed enzima diluito 1:1000.

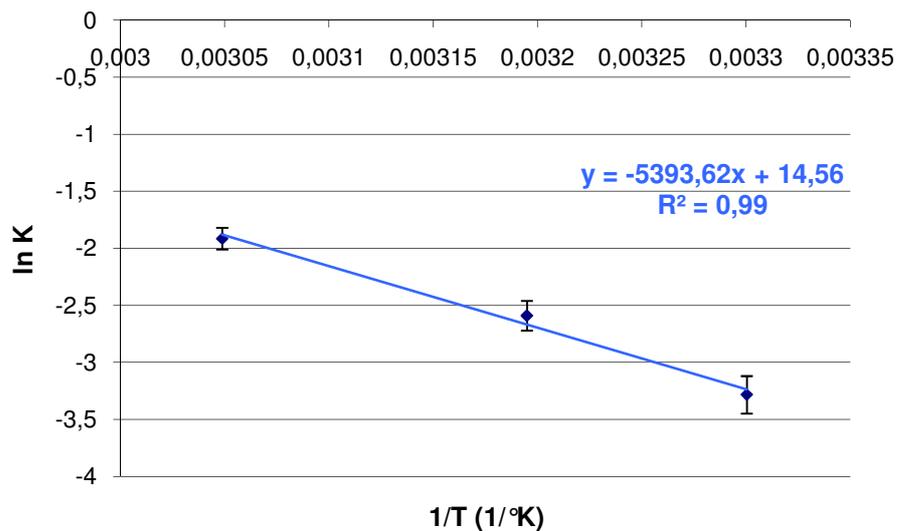


Figura 2.46. Retta derivante dall'equazione di Arrhenius per il calcolo dell'energia di attivazione della reazione condotta a pH 5,0 su xilano allo 0,3% ed enzima diluito 1:1000.

Dalle pendenze delle rette ottenute interpolando i dati, e moltiplicando per la costante dei gas (R), si ottiene:

$$E_{\text{att}} = 28,3 \pm 1,7 \text{ kJ/mol}$$

per la reazione a pH 3,8

$$E_{\text{att}} = 44,8 \pm 2,7 \text{ kJ/mol}$$

per la reazione a pH 5,0

2. Parte sperimentale

I valori ottenuti in termini di energia di attivazione sono in linea con quelli generalmente riscontrati per reazioni di catalisi enzimatica^{81,82,84} e già riscontrata con Fungamyl super AX, sebbene il calcolo ad entrambe i valori di pH risulti limitato dal fatto che è stato effettuato su soli tre punti.

I dati di stabilità termica sono solo in apparenza in contraddizione con quanto ottenuto per quanto riguarda l'attività del preparato a diversi pH. A pH 3,8, l'enzima mostrava la più alta efficienza in termini di attività ad alte temperature, in queste condizioni è però anche meno stabile e quindi più facilmente denaturabile.

Separazione cromatografica.

Una volta idrolizzata la crusca di grano si ha nuovamente a che fare con uno scarto passato allo stato liquido, per il quale ben si prestano i processi di separazione cromatografica con resina polimeriche per il recupero dell'acido ferulico, fenolo largamente presente nella crusca. Tale componente una volta idrolizzata enzimaticamente la crusca con preparati ad attività xilanasi si trova ora presente in forma biodisponibile in soluzione acquosa.

In tabella 2.8, vengono riportate le caratteristiche chimiche dell'idrolizzato di crusca di grano in termini di contenuto di fenoli e di carboidrati.

Tabella 2.8. Caratteristiche chimiche del bioliquefatto di crusca di grano.

Idrolizzato di crusca di grano	
Polifenoli totali (mg/l)	197,9±9,9
Zuccheri totali (g/l)	77,6±4,7
Zuccheri riducenti (g/l)	30,7±1,8

Recupero di acido ferulico dall'idrolizzato di crusca.

Per la purificazione cromatografica dell'idrolizzato di crusca sono state utilizzate le matrici adsorbenti polimeriche descritte nel paragrafo precedente relativo alla valorizzazione delle acque di vegetazione delle olive.

2. Parte sperimentale

In questo caso visto l'elevato rapporto zuccheri-fenoli, i processi di adsorbimento e successivo desorbimento vengono discussi anche in termini di zuccheri totali e riducenti.

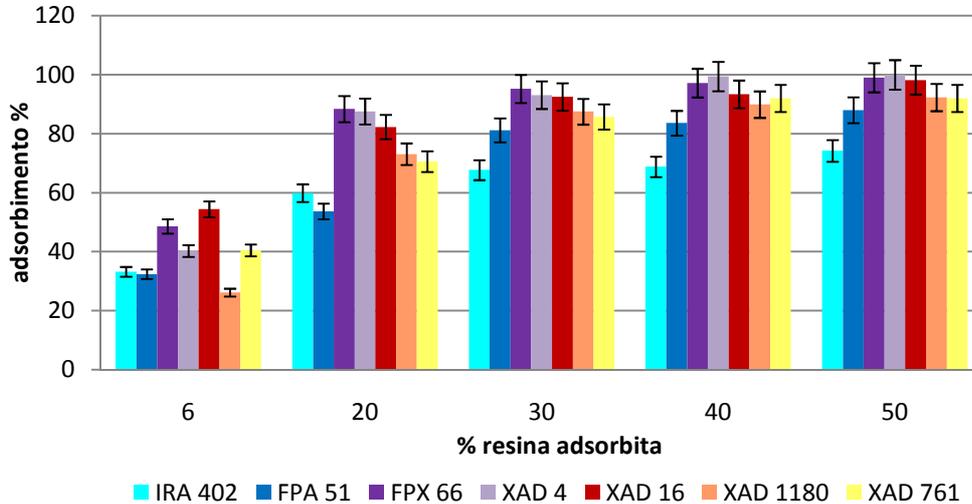


Figura 2.47. Rese percentuali del processo di adsorbimento per la frazione fenolica, relative alle diverse tipologie di adsorbente utilizzato, in funzione della quantità di adsorbente. Concentrazione adsorbente in fase di adsorbimento pari al 30%, desorbimento condotto a 80°C per 1h, con una concentrazione di adsorbente pari al 6%.

In termini di rese percentuali nel processo di adsorbimento relativamente al contenuto fenolico dell'idrolizzato di crusca, è possibile osservare come la frazione fenolica contenuta in questa tipologia di scarto dia dei buoni adsorbimenti su queste matrici già a concentrazioni di adsorbente pari al 20%: si ottengono infatti recuperi pari al 60% circa, a conferma che le matrici scelte hanno comunque una buona affinità per le componenti di questo tipo.

L'acido ferulico ha una pK_a pari a 4,58⁸⁶, per cui al pH dell'idrolizzato di crusca che è pari a 5,0-5,4, si trova in soluzione in forma dissociata; nell'idrolizzato abbiamo anche monomeri, oligomeri e polimeri delle catene di zuccheri che compongono la matrice vegetale di crusca, che come riscontrato in precedenza per le acque di vegetazione hanno una loro influenza in termini di adsorbimento in particolare se la matrice polimerica ha carattere di scambiatore anionico.

Anche in questo caso sembra che gli adsorbenti più indicati al recupero delle componenti fenoliche presenti nell'idrolizzato di crusca siano quelle a carattere

2. Parte sperimentale

neutro dal momento che a parità di concentrazione di matrice adsorbente rendono adsorbimenti percentuali maggiori rispetto a quelli riscontrati per gli adsorbenti a carattere anionico sia forte che debole.

Le frazioni fenoliche presenti nell'idrolizzato enzimatico di crusca risultano inoltre essere più affini rispetto a quelle contenute nelle acque di vegetazione delle olive all'adsorbente a scambio ionico Amberlite XAD 761. In questo caso, infatti, si ottengono rese percentuali di adsorbimento superiori all'80% già con una concentrazione di matrice adsorbente pari al 30%; maggiori concentrazioni non portano a significativi aumenti nelle rese di processo probabilmente perché si crea una situazione di saturazione della matrice.

Con le matrici adsorbenti Amberlite FPX 66, Amberlite XAD 4 e Amberlite XAD 16, si riescono ad ottenere rese quantitative in termini di adsorbimento aumentando la concentrazione di adsorbente in soluzione fino al 50%; di fatto tali matrici risultano chimicamente in termini di struttura polimerica che le costituisce molto simili, e si differenziano solo per le loro caratteristiche fisiche (Tabella 2.2). Tali grandezze però non sembrano dare significative differenze per quanto riguarda l'adsorbimento delle componenti fenoliche contenute nella crusca di grano. Anche l'adsorbente Amberlite XAD 1180, presenta caratteristiche chimiche analoghe, ma ha una minore area superficiale rispetto alle altre matrici adsorbenti a carattere neutro, questo può ragionevolmente spiegare il motivo delle basse rese percentuali di adsorbimento riscontrate per tale adsorbente. A conferma di quanto appena descritto si può osservare come passando da una concentrazione di matrice del 40% ad una del 50% non si hanno aumenti significativi di adsorbimento percentuale. Sebbene gli scambiatori a carattere anionico mostrino le performances peggiori, aumentando la concentrazione di adsorbente in soluzione, si riscontra un aumento di rese di adsorbimento percentuale.

2. Parte sperimentale

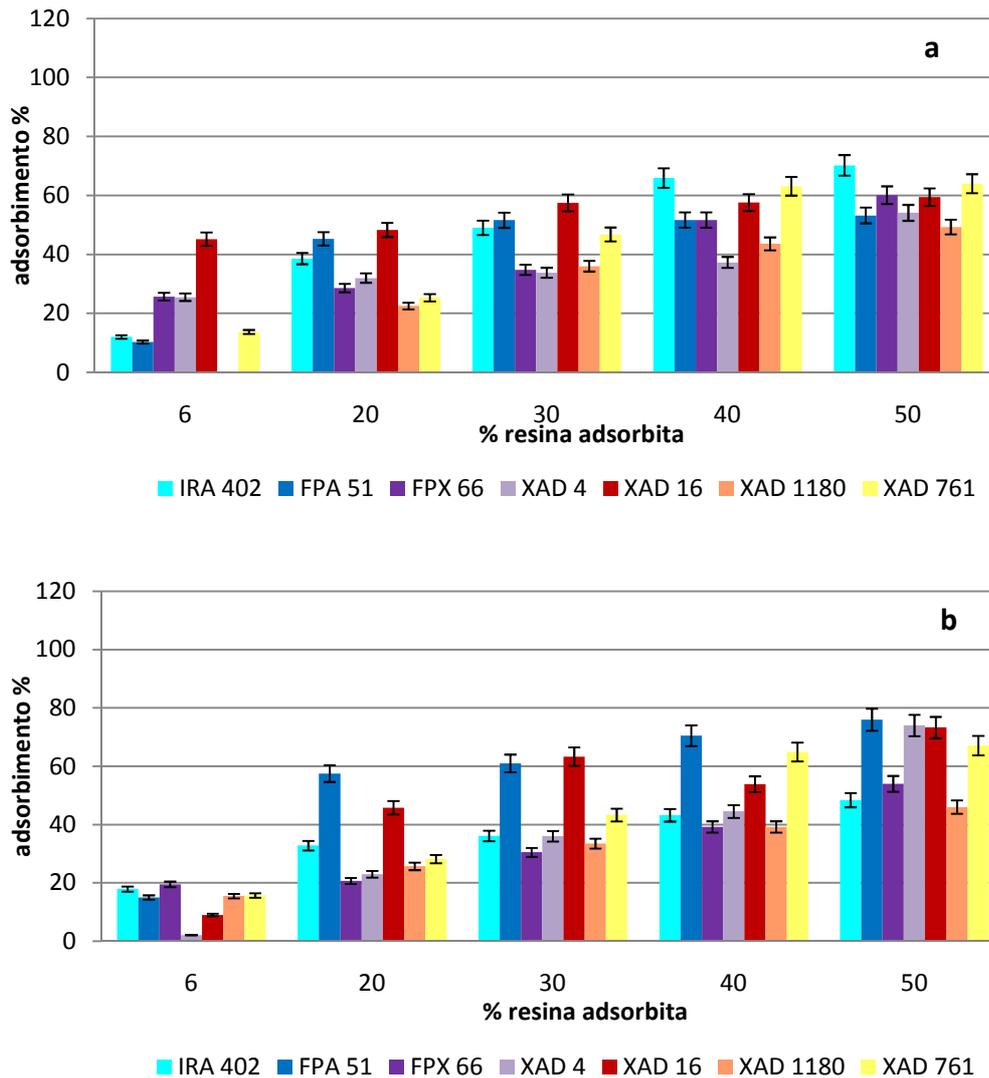


Figura 2.48. Rese percentuali del processo di adsorbimento in termini di zuccheri totali (a) e riducenti (b) relative alle diverse tipologie di adsorbente utilizzato, in funzione della quantità di adsorbente. Concentrazione adsorbente in fase di adsorbimento pari al 30%, desorbimento condotto a 80°C per 1h, con una concentrazione di adsorbente pari al 6%.

Le matrici adsorbenti a scambio anionico risultano avere una buona affinità anche nei confronti dei carboidrati (Figura 2.48). Masuda *et al.* hanno dimostrato come sia possibile effettuare una separazione cromatografica di monosaccaridi, disaccaridi e oligosaccaridi utilizzando colonne impaccate con fasi stazionarie costituite da polimeri tra cui stirene-divinilbenzene, funzionalizzate con gruppi metilamminici⁸⁷, trimetilamminici^{88,89}. Tali separazioni coinvolgono i gruppi amminici presenti sugli scambiatori anionici, ed i gruppi idrossilici i quali si

2. Parte sperimentale

ritrovano al pH dell'idrolizzato di crusca in forma non dissociata dal momento che presentano valori di $pK_a \geq 12$ ^{87,88,89}.

Per quanto riguarda le matrici a carattere neutro, risultano anch'esse dare buoni adsorbimenti delle componenti saccaridi presenti nell'idrolizzato di crusca, sebbene, in letteratura, tali adsorbenti non vengono indicati come adatti all'adsorbimento di tali molecole, quanto piuttosto per concentrarle nella soluzione acquosa esausta dopo il processo di adsorbimento^{90,91}. Il comportamento osservato può essere spiegato con l'adsorbimento di componenti fenoliche ancora legate a monomeri o catene saccaridiche⁸⁹, che quindi non sono realmente impegnate in interazioni con la matrice adsorbente, ma che vengono comunque allontanate con il processo di adsorbimento.

Anche nel caso della matrice adsorbente a carattere ionico Amberlite XAD 761, per la quale si osservano buone percentuali di adsorbimento, è possibile fare la stessa ipotesi: tale adsorbente infatti possiede una struttura di tipo aromatico in grado di dare interazioni di tipo π - π con le molecole delle componenti fenoliche, che possono ancora essere in parte legate a componenti saccaridiche.

I risultati relativi al processo di desorbimento sono riportati nei grafici successivi.

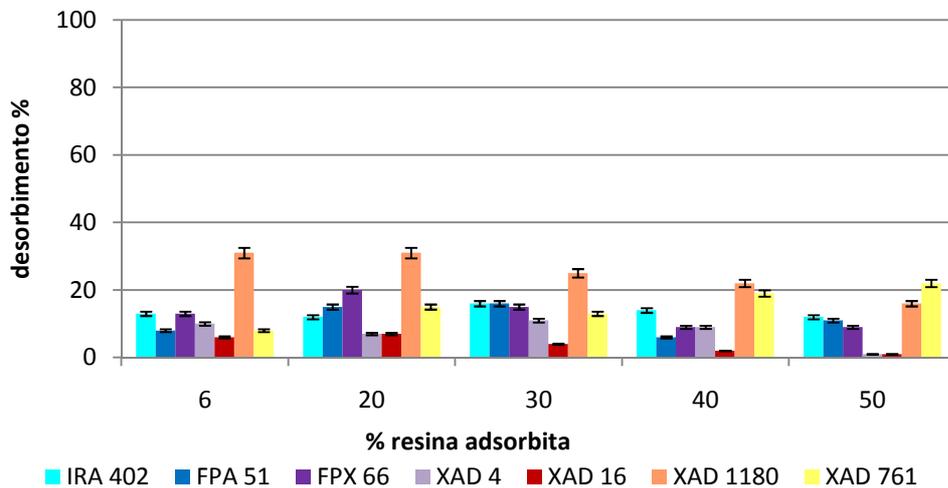


Figura 2.49. Rese percentuali del processo di desorbimento per la frazione fenolica, relative alle diverse tipologie di adsorbente utilizzato, in funzione della quantità di adsorbente. Concentrazione adsorbente in fase di adsorbimento pari al 30%, desorbimento condotto a 80°C per 1h, con una concentrazione di adsorbente pari al 6%.

2. Parte sperimentale

Se in termini di adsorbimento il processo per la componente fenolica contenuta nell'idrolizzato di crusca era favorito, lo stesso non può essere detto per il processo di desorbimento per il quale si raggiunge al massimo un recupero dalla matrice adsorbente pari al 31% circa e solo con Amberlite XAD 1180. I bassi desorbimenti di tali componenti sono accompagnati anche da bassi desorbimenti dei carboidrati sia in termini di zuccheri totali sia in termini di zuccheri riducenti (Figura 2.50 a e b).

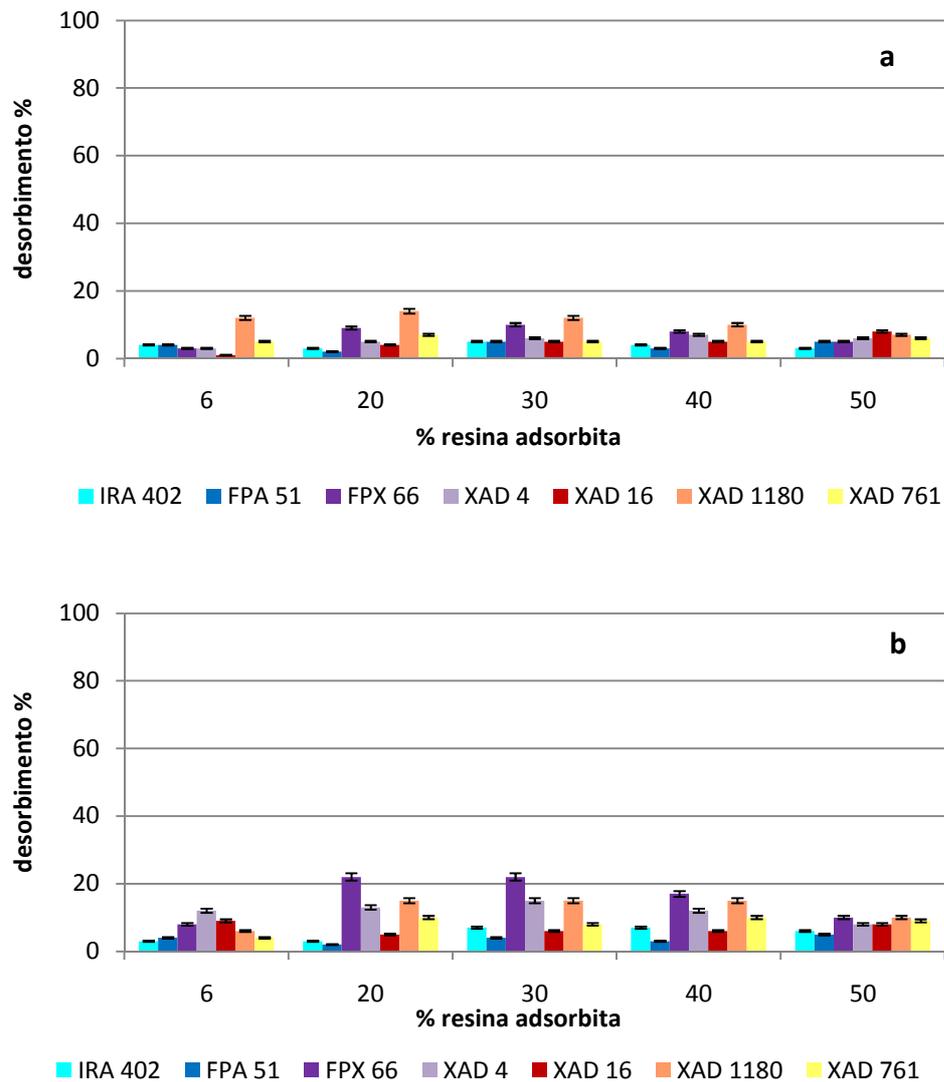


Figura 2.50. Rese percentuali del processo di adsorbimento in termini di zuccheri totali (a) e riducenti (b) relative alle diverse tipologie di adsorbente utilizzato, in funzione della quantità di

2. Parte sperimentale

adsorbente. Concentrazione adsorbente in fase di adsorbimento pari al 30%, desorbimento condotto a 80°C per 1h, con una concentrazione di adsorbente pari al 6%.

Tali andamenti sono probabilmente dovuti alla scelta della miscela estraente costituita da una parte di acqua e una di etanolo acido; per gli adsorbenti a carattere neutro e ionico, in presenza di quest'ultimo infatti i carboidrati tendono a precipitare sulle matrici adsorbenti neutre, rendendo difficile anche il recupero delle frazioni fenoliche⁸⁷. Inoltre, sempre per quanto riguarda il desorbimento dei carboidrati, per le resine a scambio anioniche, il solvente ideale per rompere le interazioni di tipo ionico che si vengono a creare tra i siti attivi amminici presenti sulla matrice adsorbente ed i gruppi ossidrilici sui carboidrati, è costituito da soluzioni a carattere fortemente basico, solitamente NaOH^{87,88,89}, in modo da arrivare a condizioni di pH maggiori della pKa degli zuccheri rendendoli completamente o parzialmente ionizzati.

Visti i risultati ottenuti, si può ragionevolmente affermare che introdurre uno step di ultra e nano filtrazione che trattengano le componenti saccaridiche nel batch di reazione permettendo solo l'uscita delle componenti fenoliche con il permeato, diventa strategico al fine di un valido processo di bioraffinazione della crusca di grano.

Separazione con filtrazione a membrana.

Mentre nei processi di bioraffinazione di scarti liquidi le unità di filtrazione a membrana come l'ultrafiltrazione e l'osmosi inversa sono fondamentali se si vuole recuperare in parte l'acqua del processo produttivo che ha prodotto lo scarto e se si vuole riuscire a recuperare tramite resina a scambio, una quantità maggiore della frazione fenolica recuperabile dalla biomassa, nel caso degli scarti di tipo solido, unità di ultra e nano filtrazione possono diventare fondamentali, al fine di migliorare la capacità catalitica del biocatalizzatore allontanando in continuo i prodotti di reazione che possono comportarsi potenziali inibitori.

Stima delle dimensioni molecolari di preparati enzimatici.

I preparati enzimatici commerciali come Fungamyl Super AX e Celluclast Bg i quali sono caratterizzati da diverse attività carboidrasiche, sono di facile utilizzo

ed hanno costi relativamente bassi che li rendono adatti ad un processo di bioraffinazione di scarti agroindustriali di tipo solido come la crusca di grano. Essendo l'attività xilanasica inibita dai prodotti di reazione, è necessario allontanarli dal batch di reazione tramite unità di filtrazione a membrana, con tagli molecolari che però permettano di trattenere l'enzima al fine di permettergli di continuare a lavorare su catene non disgregate. È necessario quindi conoscere quali siano le dimensioni molecolari degli enzimi utilizzati nei processi di bioraffinazione, essendo essi preparati enzimatici che contengono "miscele" di attività diverse, è difficile conoscerne a priori le dimensioni molecolari. Consultando il database BRENDA⁹², è possibile avere una prima indicazione: vengono infatti riportate per le carboidrasi di interesse tagli molecolari superiori ai 30 KDa per *Aspergillus oryzae* e *Humicola insolens*, e dimensioni di circa 21 KDa per l'endo-1,4-xilanasasi estratte da *Trichoderma reesei*.

Lavorando in un intervallo di dimensioni di tagli molecolari tra i 5 KDa ed i 0,2 micron, è possibile determinare quale membrana è necessaria al fine di trattenere all'interno del batch di reazione enzimi come Fungamyl super AX e Celluclast BG.

Gli enzimi devono essere testati singolarmente andando a determinare sul retentato la quantità di zuccheri riducenti rilasciati utilizzando una soluzione di xilano come sistema modello facendo avvenire la reazione enzimatica. In questo modo è possibile valutare, se il passaggio attraverso la membrana causa una diminuzione di attività per perdita o disattivazione dell'enzima. La stessa prova viene fatta utilizzando un'aliquota di permeato. Su questa si esegue anche la determinazione delle proteine totali, tramite saggio di Bradford per verificare se una eventuale mancanza di attività è dovuta all'assenza dell'enzima nel permeato o alla sua inattivazione.

Da queste prove è risultato che la membrana di taglio molecolare 5 KDa è in grado di trattenere il preparato enzimatico Fungamyl Super AX, e quella a 20 nm trattiene il preparato Celleclast BG: per entrambe infatti si è visto che ai tagli molecolari indicati, l'attività xilanasica della soluzione all'interno del serbatoio resta costante mentre è assente nel permeato, dove non si riscontra nemmeno la presenza di proteine.

Stima delle dimensioni molecolari del substrato.

Vista la composizione della matrice vegetale di crusca ricca in arabinoxilani, al fine di determinare la porosità adatta a trattenere la biomassa all'interno dell'unità di filtrazione per ottenere una sua completa disgregazione, si può operare utilizzando un sistema modello di xilano.

La filtrazione viene condotta quindi su di una soluzione acquosa di xilano all'1% p/V; prima di iniziare il processo, è necessario determinare la quantità di zuccheri riducenti prima e dopo reazione enzimatica con il preparato Funganyl Super AX; prima per determinare se eventualmente sono presenti già in partenza zuccheri semplici, e dopo per avere un valore iniziale di zuccheri riducenti ottenibili con l'idrolisi enzimatica.

Il permeato viene raccolto in continuo per la determinazione degli zuccheri riducenti sempre prima e dopo reazione enzimatica: prima per verificare il passaggio di substrato nel permeato e dopo, in questo caso, come verifica dell'effettiva assenza di substrato. Nel caso di concentrazioni di zuccheri riducenti inferiori al limite di rilevabilità del metodo può essere, quindi, strategico, al fine di verificare il passaggio anche di poche catene polisaccaridiche nel permeato, sfruttare l'idrolisi enzimatica dei polisaccaridi che comporta un aumento degli zuccheri riducenti in soluzione.

Si determinano anche i pesi secchi dei campioni di permeato prelevato di volta in volta dal sistema di filtrazione a membrana. Tali valori sono interessanti dal momento che un rapporto tra la concentrazione di zuccheri riducenti e pesi secchi ci permette di ottenere un'indicazione sulla quantità di catene polisaccaridiche presenti nel permeato: più il rapporto tra concentrazione di zuccheri riducenti e peso secco è alto, maggiore è la quantità di catene polisaccaridiche permeate. Il reciproco, e cioè il rapporto tra pesi secchi e concentrazione di zuccheri riducenti in soluzione ci permette di avere una stima del peso molecolare medio di tali catene: la concentrazione di zuccheri riducenti infatti è una stima del numero di catene polimeriche in quanto ciascun polisaccaride termina con uno zucchero riducente. Dividendo quindi il peso secco per la concentrazione di zuccheri riducenti, cioè per il numero di terminali di catena, si può ottenere una prima stima del peso di ogni polisaccaride.

2. Parte sperimentale

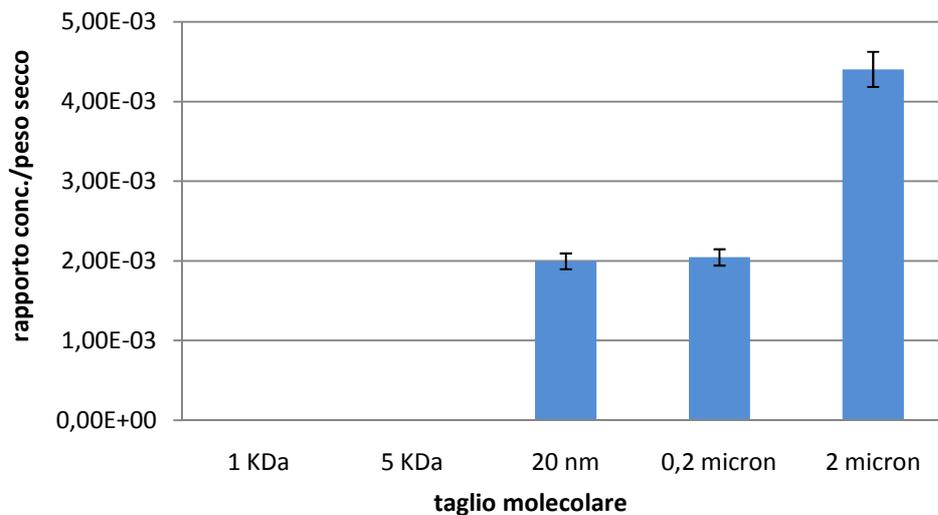


Figura 2.51. Rapporto tra concentrazione di zuccheri riducenti e peso secco relativi a ciascuna frazione di substrato permeato.

Già a tagli molecolari di 20 nm si riscontra una fuoriuscita di substrato nel permeato, con un aumento del peso secco e della concentrazione di zuccheri riducenti.

Considerando il reciproco dei valori riportati in figura 2.51, otteniamo come descritto in precedenza una stima del peso molecolare medio delle diverse catene di substrato (Tabella 2.9).

Tabella 2.9. Rapporti tra peso secco e concentrazione di zuccheri riducenti relativi a ciascuna frazione di substrato permeato.

Membrana	Rapporto peso secco/conc. zucch.rid.
1 KDa	/
5 KDa	/
20 nm	501
0,2 micron	489
2 micron	227

I dati sopra riportati indicano che le catene polisaccaridiche permeate dalle membrane a 20 nm e 0,2 micron hanno pesi molecolari simili, mentre quelle di dimensioni maggiori hanno un peso inferiore.

Frazionamento dei prodotti derivanti dall'idrolisi di un substrato di xilano con diversi preparati enzimatici: Fungamyl Super AX e Celluclast BG.

Una volta avvenuta la reazione all'interno del batch d'idrolisi enzimatica, è necessario allontanare i prodotti di reazione enzimatica per non avere inibizione del preparato enzimatico necessario alla disgregazione della matrice vegetale che costituisce la biomassa solida da bioraffinare. Anche in questo caso avendo a che fare con una matrice eterogenea, ed un altrettanto eterogeneo pool di attività enzimatica, è impossibile sapere a priori le dimensioni dei prodotti di reazione, dal momento che i preparati enzimatici possono agire idrolizzando le molecole esterne alle catene polisaccaridiche (attività eso), o andando a rompere legami interni alle catene polisaccaridiche (attività endo).

È possibile avere a priori un'idea delle dimensioni molecolari dei prodotti di reazione, lavorando su di un sistema modello come lo xilano che ben ricalca quelle che sono le strutture preponderanti nella crusca di grano, facendolo reagire singolarmente con i preparati enzimatici fin qui considerati, nelle condizioni di reazione ottimali stabilite in precedenza, ed introducendo nell'unità di filtrazione a membrana un sistema già idrolizzato previa denaturazione dell'enzima.

2. Parte sperimentale

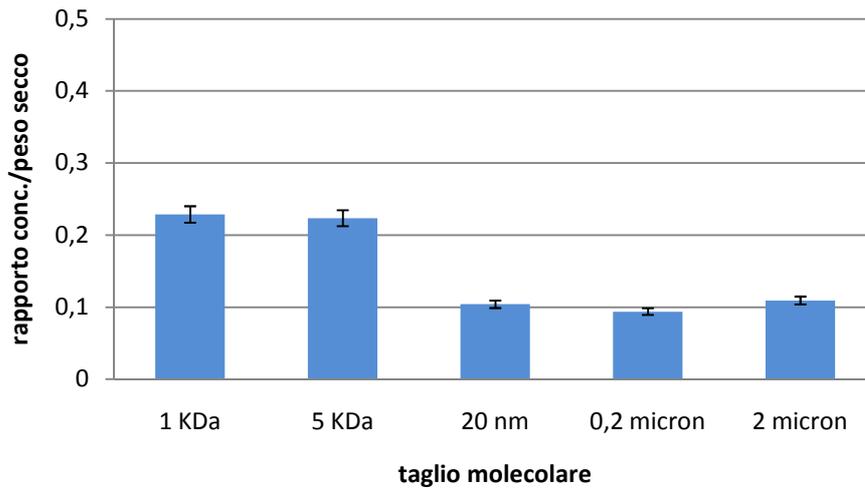


Figura 2.52. Rapporto tra concentrazione di zuccheri riducenti e peso secco relativi a ciascuna frazione di prodotto ottenuto dall'azione enzimatica di Fungamyl Super AX diluito 1:1000 su substrato xilano allo 0,3%, permeato a diversi tagli molecolari.

Il grafico di Figura 2.52, mostra l'andamento del rapporto tra zuccheri riducenti e peso secco ottenuti facendo reagire il substrato modello di xilano con il preparato enzimatico Fungamyl Super AX: si nota subito che il maggior numero di catene polisaccaridiche permea già con membrane a tagli molecolari di 1 e 5 KDa. L'utilizzo di membrane a dimensioni superiori non consente di frazionare ulteriormente il substrato. Confrontando questi risultati con quelli riportati per il substrato non idrolizzato (Figura 2.51), si osserva una diversa distribuzione delle dimensioni molecolari, ridotte a seguito della reazione enzimatica. Lo xilano non idrolizzato trattato con membrane filtranti dai tagli molecolari pari a 1 e 5 KDa non mostra la presenza di zuccheri riducenti nel permeato. Inoltre si osserva un significativo aumento dei rapporti tra concentrazione di zuccheri riducenti e pesi secchi (prima del trattamento enzimatico: 0,0020-0,0045; dopo: 0,1-0,2). Ciò indica che l'idrolisi ha ridotto le dimensioni delle catene e aumentato considerevolmente il loro numero.

2. Parte sperimentale

Tabella 2.10. Rapporto tra peso secco e concentrazione di zuccheri riducenti relativi a ciascuna frazione di prodotto ottenuto dall'azione enzimatica di Fungamyl Super AX diluito 1:1000 su substrato xilano allo 0,3%, permeato a diversi tagli molecolari.

Membrana	Rapporto peso secco/conc. zucch.rid.
1 KDa	4,37
5 KDa	4,48
20 nm	9,61
0,2 micron	10,66
2 micron	9,15

Il rapporto tra peso secco e concentrazione di zuccheri riducenti conferma la diminuzione delle dimensioni molecolari. I pesi molecolari medi (Tabella 2.10) sono molto più bassi rispetto a quelli del substrato non idrolizzato (circa 227 – 500).

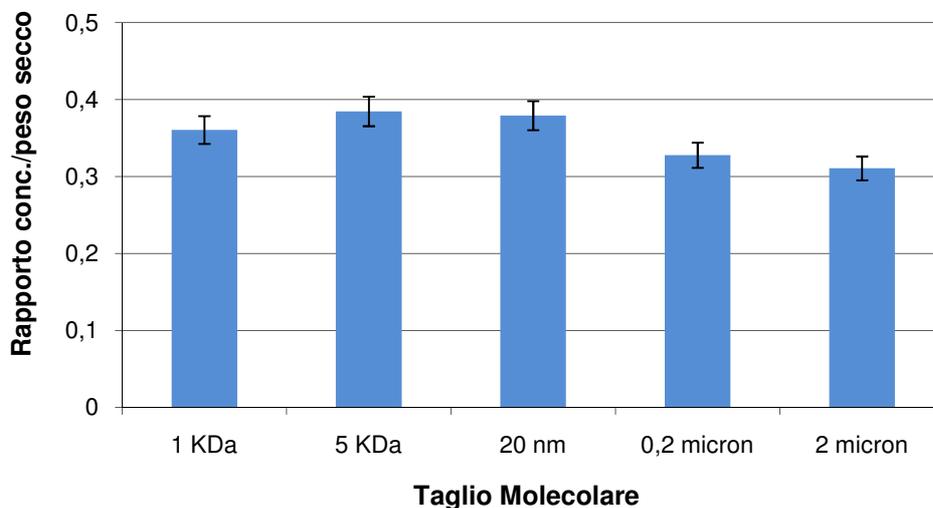


Figura 2.53. Rapporto tra concentrazione di zuccheri riducenti e peso secco relativi a ciascuna frazione di prodotto ottenuto dall'azione enzimatica di Celluclast BG diluito 1:1000 su substrato xilano allo 0,3%, permeato a diversi tagli molecolari.

2.Parte sperimentale

Il Celluclast BG opera sul substrato andando a ridurre le catene di xilano tanto che si rileva la presenza di zuccheri riducenti nei permeati raccolti anche con membrane di porosità pari a 1 e 5 KDa (Figura 2.53).

Utilizzando quindi una membrana a 5 KDa è possibile trattenere selettivamente lo xilano eventualmente non reagito ed entrambe gli enzimi Fungamyl Super AX e Celluclast BG all'interno del sistema di ultrafiltrazione ai fini di protrarre più a lungo la reazione enzimatica, allontanando contemporaneamente i prodotti di reazione.

Confrontando poi i valori dei rapporti tra concentrazione di zuccheri riducenti e peso secco ottenuti per i prodotti, con quelli ricavati in precedenza per il substrato, si osserva anche in questo caso un aumento di tale rapporto: in assenza del trattamento enzimatico si ha un rapporto pari a 0,0022-0,0023, mentre in presenza tale rapporto si attesta a valori di 0,31-0,38. Ciò conferma che l'enzima opera un'idrolisi che porta alla riduzione delle dimensioni delle catene di xilano aumentandone considerevolmente il loro numero in soluzione.

Passando al reciproco di tale rapporto, si ottengono i risultati di Tabella 2.11.

I pesi medi dopo l'idrolisi enzimatica del Celluclast BG per tutte le membrana considerate non mostrano significative differenze, ma risultano inferiori rispetto a quelli determinati nel caso di xilano non trattato enzimaticamente, ad ulteriore conferma che anche il preparato Celluclast BG ha operato la sua attività catalitica xilanasica sullo xilano.

Tabella 2.11. Rapporto tra peso secco e concentrazione di zuccheri riducenti relativi a ciascuna frazione di prodotto ottenuto dall'azione enzimatica di Fungamyl Super AX diluito 1:1000 su substrato xilano allo 0,3%, permeato a diversi tagli molecolari.

Membrana	Rapporto peso secco/conc. zucch.rid.
1 KDa	2,8
5 KDa	2,6
20 nm	2,6
0,2 micron	3,1
2 micron	3,2

2. Parte sperimentale

I valori relativi al rapporto tra concentrazione di zuccheri riducenti rilasciati e peso secco ottenuti con il preparato enzimatico Fungamyl Super AX, sono circa la metà di quelli che si ricavano con Celluclast BG (Figure 2.52 e 2.53). Questo ci permette di dire che quest'ultimo preparato consente di ottenere catene più lunghe rispetto al precedente. Si potrebbe quindi ipotizzare che Fungamyl Super AX agisca maggiormente come una endoxilanasasi, mentre il Celluclast BG ha attività di tipo esoxilanasiche.

Considerando invece l'inverso del rapporto tra concentrazione di zuccheri riducenti e pesi secchi per una la stima dei pesi molecolari separati con le diverse membrane, si osserva, che l'azione enzimatica di Fungamyl Super AX permette di ottenere pesi medi delle catene polisaccaridiche compresi tra 6,6 e 7,7, circa il doppio rispetto a quanto ottenuto con Celluclast BG, confermando il fatto che con Fungamyl Super AX si riescono ad ottenere catene polisaccaridiche di maggiore lunghezza.

In figura 2.54 vengono riportati i risultati relativi all'utilizzo di entrambe i preparati unendo quindi le attività endo ed esoxilanasiche. I due preparati enzimatici sono stati utilizzati ad una concentrazione pari alla metà delle prove precedenti.

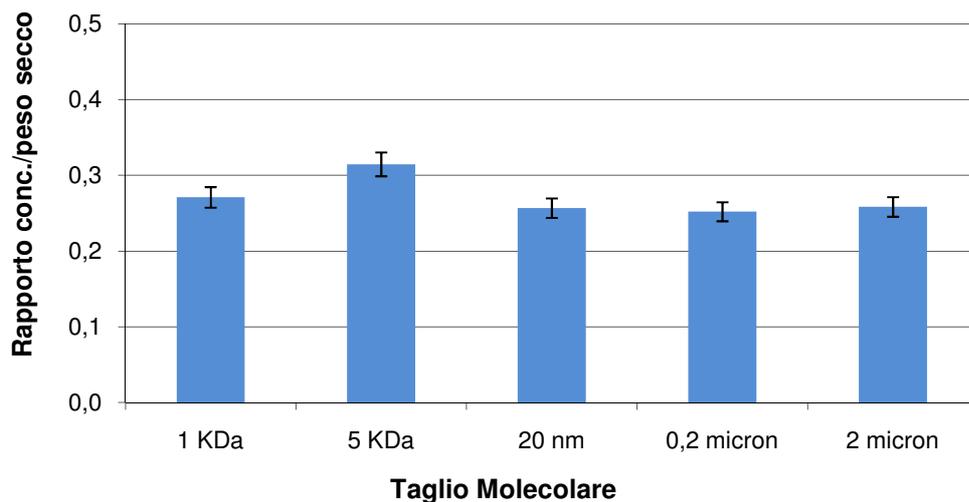


Figura 2.54. Rapporto tra concentrazione di zuccheri riducenti e peso secco relativi a ciascuna frazione di prodotto ottenuto dall'azione enzimatica di Celluclast BG e Fungamyl Super AX entrambi diluiti 1:2000 su substrato xilano allo 0,3%, permeato a diversi tagli molecolari.

2. Parte sperimentale

Dai risultati ottenuti sembra che i due enzimi non lavorino in maniera sinergica, aumentando l'attività enzimatica complessiva in termini di rilascio di zuccheri riducenti, ma semplicemente sommando le loro attività eso e endoxilanasica. Alle concentrazioni di enzimi utilizzate si è arrivati a rilasciare in soluzione una quantità di zuccheri riducenti pari alla metà circa della somma delle quantità di zuccheri riducenti rilasciati nei casi precedenti in cui gli enzimi venivano fatti lavorare singolarmente ad una concentrazione doppia. E', inoltre, interessante notare che questi dati sembrano suggerire che non vi siano particolari fenomeni di inibizione sulle attività enzimatiche di un preparato in presenza dei prodotti di reazione dell'altro.

In Tabella 2.12 vengono riportati i risultati relativi alla distribuzione dei pesi molecolari separati con le diverse membrane, in cui si osserva che in presenza dei due enzimi si ottengono catene polisaccaridiche con pesi molecolari medi intermedi a quelli che si ottengono utilizzando singolarmente i due enzimi, confermando l'ipotesi di una somma di attività e non di una sinergia tra i preparati, attività comunque non inibitoria dei prodotti di reazione di un enzima sull'altro.

Tabella 2.12. Rapporto tra peso secco e concentrazione di zuccheri riducenti relativi a ciascuna frazione di prodotto ottenuto dall'azione enzimatica di Celluclast BG e Fungamyl Super AX entrambi diluiti 1:2000 su substrato xilano allo 0,3%, permeato a diversi tagli molecolari.

Membrana	Rapporto peso secco/conc. zucch.rid.
1 KDa	3,69
5 KDa	3,18
20 nm	3,90
0,2 micron	3,97
2 micron	3,87

Valutazione dei parametri di ultrafiltrazione.

È chiaro che per separare i prodotti dal batch di reazione per evitare da un lato l'inibizione delle carboidrati e dall'altro per recuperare molecole di acido ferulico e diferulati che derivano dalla disgregazione della matrice vegetale di crusca presa come esempio di biomassa solida, si deve operare in regime di nano filtrazione con membrane filtranti che riescano ad eseguire tagli molecolari dell'ordine dei 1000 Da; con tali dimensioni si è sicuri, grazie ai dati fin qui raccolti, di mantenere all'interno del sistema catene di xilano non ancora disgregate ed il pool di attività enzimatiche necessarie.

Al fine di ottimizzare l'operatività di un sistema di ultra e nano filtrazione, è necessario andare ad agire su parametri quali, la velocità del flusso di substrato ed enzima che ricircolano all'interno del sistema, e la cosiddetta pressione transmembrana (TMP, *Trans-Membrane Pressure*), che rappresenta la differenza di pressione applicata a monte e a valle dell'unità filtrante per ottenere il passaggio di flusso. Valori diversi di TMP, permetteranno di recuperare più o meno velocemente il permeato, cioè il liquido che passa attraverso la membrana filtrante nel quale si ritrovano componenti di interesse e prodotti di inibizione; maggiore sarà la velocità di uscita e quindi di allontanamento dei possibili inibitori dell'enzima, maggiore sarà la possibilità di prolungarne la capacità di conversione catalitica al fine di disgregare le matrici vegetali.

2. Parte sperimentale

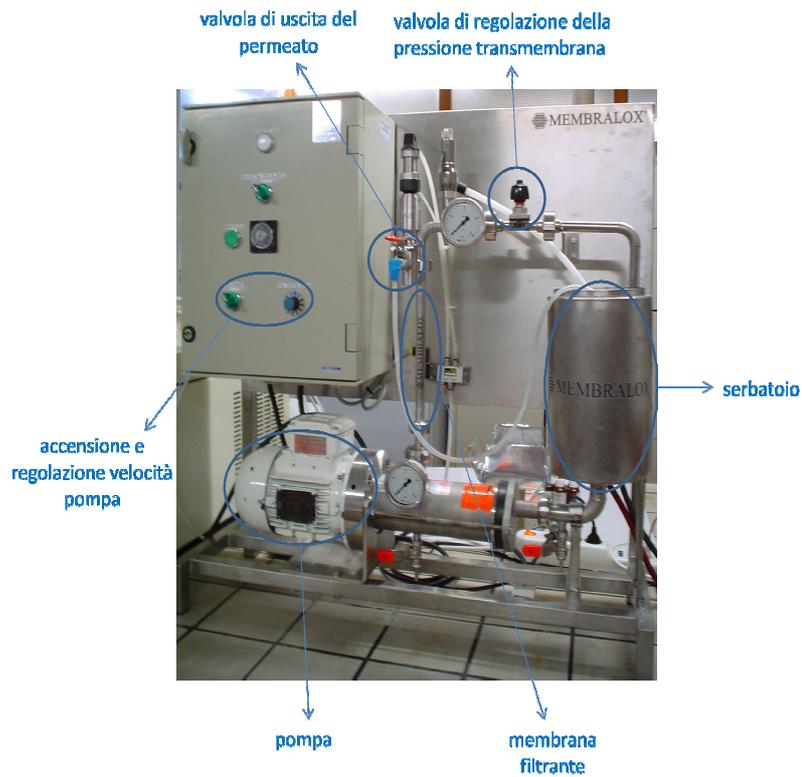


Figura 2.55. Descrizione dell'impianto di ultra e nano filtrazione Modello MEMBRALOX XLab3 (Pall).

Operando su di un sistema modello di xilano idrolizzato con le xilanasi contenute nei preparati enzimatici Fungamyl Suoer AX e Celluclast BG su di un impianto analogo a quello riportato in figura mantenendo fissa la velocità di ricircolo e variando la TMP, si sono ottenuti i risultati riportati nei grafici seguenti.

2. Parte sperimentale

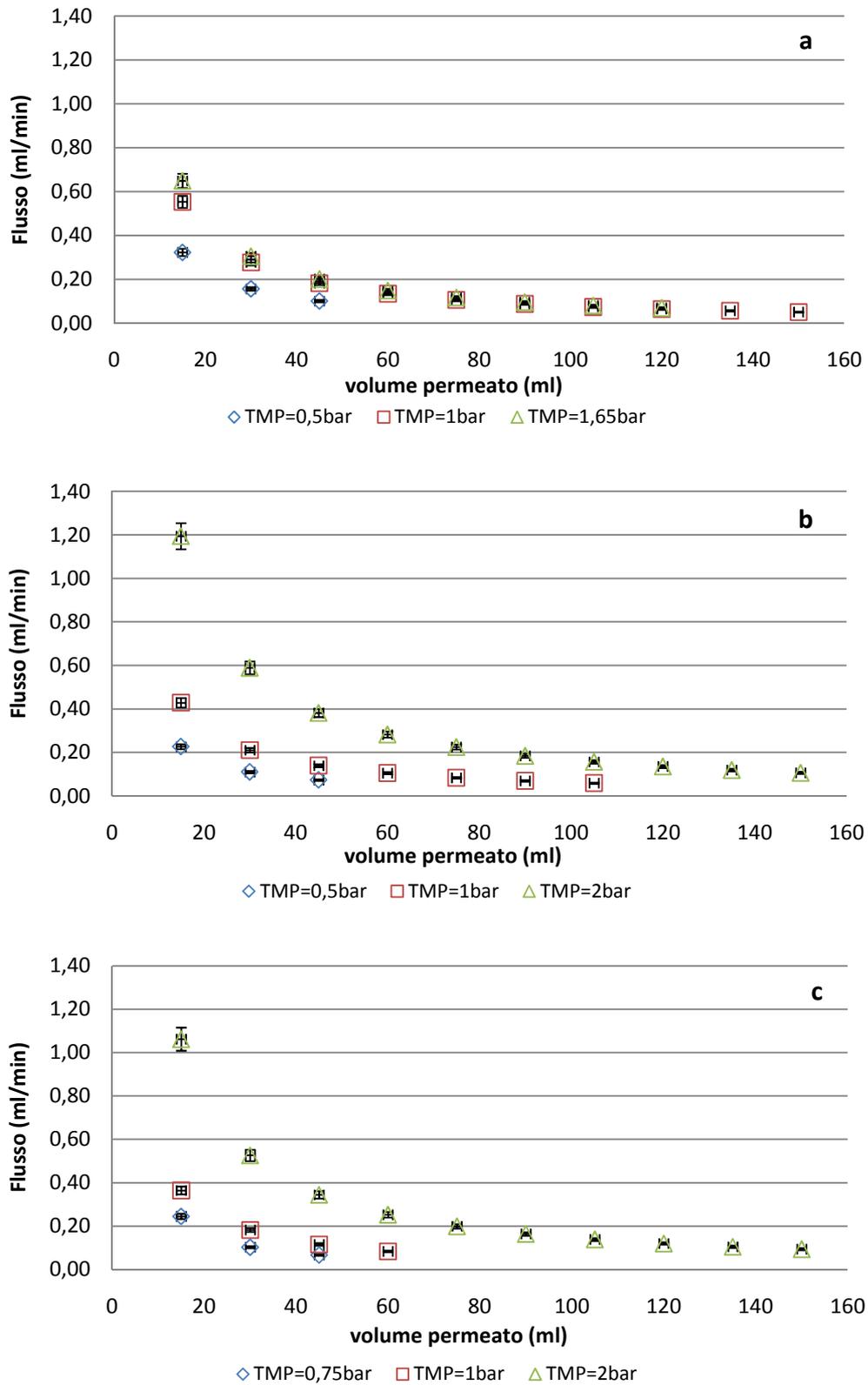


Figura 2.56. Variazione del flusso di permeato in funzione del volume di permeato, a diverse TMP e diverse velocità: 60 l/h (a), 120 l/h (b) e 180 l/h (c).

2. Parte sperimentale

Dai grafici sopra riportati, si osserva un andamento analogo a tutte le velocità considerate: minore è la TMP, cioè la forza che viene conferita al sistema al fine di far permeare il liquido attraverso la membrana filtrante, minore è il flusso di permeato che viene raccolto. Per tutte le velocità si raggiunge un valore di flusso minimo pari a circa 0,10 ml/min che per basse TMP viene raggiunto già dopo aver raccolto soli 45 ml di permeato. Un aumento di TMP, invece permette di raggiungere tale valore dopo aver allontanato dal sistema dai 120 ai 160 ml di permeato.

Andando a confrontare tra di loro le diverse velocità, si nota che alla velocità di ricircolo più bassa, (velocità = 60 l/h), abbiamo dei flussi iniziali più bassi rispetto agli altri casi, addirittura nel caso della TMP più alta, tale valore è circa la metà di quello che si ottiene per la velocità 120 l/h. Un comportamento di questo tipo è dovuto al fatto che nonostante ci sia un'alta TMP, la velocità con cui viene fatto circolare il liquido all'interno del sistema è troppo bassa per far fuoriuscire il permeato velocemente dal batch di reazione.

Aumentando però la velocità da 120 a 180 l/h, non si ha un ulteriore aumento bensì il flusso tende a diminuire, in questo caso perché essendo la velocità molto alta, il liquido non rimane abbastanza tempo a contatto con la membrana filtrante causando una diminuzione di flusso di permeato in uscita dal sistema.

È importante valutare anche il tempo in cui si raggiunge un determinato flusso, in particolare il valore di flusso minimo che diventa critico dal punto di vista del processo di bioraffinazione dal momento che il preparato enzimatico scelto comincerà a rimanere per più tempo a contatto con possibili prodotti di inibizione e quindi diminuirà la sua capacità catalitica di idrolisi del substrato.

2. Parte sperimentale

Tabella 2.13. tempi e volumi di permeato a cui si arriva al valore di flusso minimo, per le diverse velocità e TMP impostate.

Velocità (l/h)	TMP (bar)	Tempo (min)	Volume permeato (ml)
60	0,50	149	45
	1,00	172	90
	1,65	156	90
120	0,50	136	30
	1,00	142	60
	2,00	149	150
180	0,75	146	30
	1,00	130	45
	2,00	143	135

A velocità più bassa, il valore di flusso minimo riscontrato nelle prove eseguite, viene raggiunto prima a TMP basse: conferendo infatti al sistema minore differenza di pressione per far confluire il liquido tra i pori della membrana filtrante, abbiamo una fuoriuscita di permeato più lenta e quindi fin dai primi minuti si ha una caduta di flusso ad un valore minimo. Aumentando la TMP del doppio, tale valore viene raggiunto in tempi più lunghi permettendo anche di raccogliere dal sistema un volume maggiore di permeato. Aumentandola invece di tre volte, il sistema tende a raggiungere il flusso minimo in tempi più brevi, come se forzando maggiormente il liquido sulla membrana si creasse una sorta di intasamento della stessa.

A velocità di ricircolo pari a 120 l/h, abbiamo invece sempre un aumento del tempo di raggiungimento del flusso minimo e del volume di permeato raccolto, che addirittura alla TMP maggiore è pari a 5 volte quello raccolto a TMP più bassa.

Nel caso della velocità 180 l/h, come per la velocità 60 l/h, aumentando da 0,75 bar a 1,00 bar la TMP, viene raggiunto prima il flusso di lavoro minimo, mentre tale valore viene raggiunto dopo per TMP ancora più alte permettendo anche di recuperare più permeato. Questi risultati sembrerebbero descrivere un fenomeno in cui un aumento di pressione tende a dare un iniziale intasamento della

membrana per poi liberare i pori in una fase successiva conferendo ancora più forza al sistema.

In letteratura sono riportati numerosi lavori, che prevedono in particolare l'utilizzo di sistemi di ultrafiltrazione piuttosto che nano filtrazione per la purificazione di liquidi più o meno eterogenei sia in campo alimentare^{93,94,95} che non⁹⁶, in cui si ovvia al problema dell'intasamento o fouling della membrana filtrante utilizzando un sistema detto backpulse.

Durante la filtrazione, particelle di soluto possono andare ad accumularsi sulla superficie della membrana ostruendone i pori, impedendo al permeato di fuoriuscire dal sistema. Il backpulse⁹⁷, consiste nel generare una contropressione dall'esterno verso l'interno della membrana, in modo da provocare un riflusso di permeato all'interno dei pori tale da rimuovere le particelle che bloccano la membrana le quali rientrano nel flusso normale del retentato⁹⁷. Tutto ciò permette al flusso di ritornare a valori prossimi o coincidenti a quelli di inizio filtrazione.

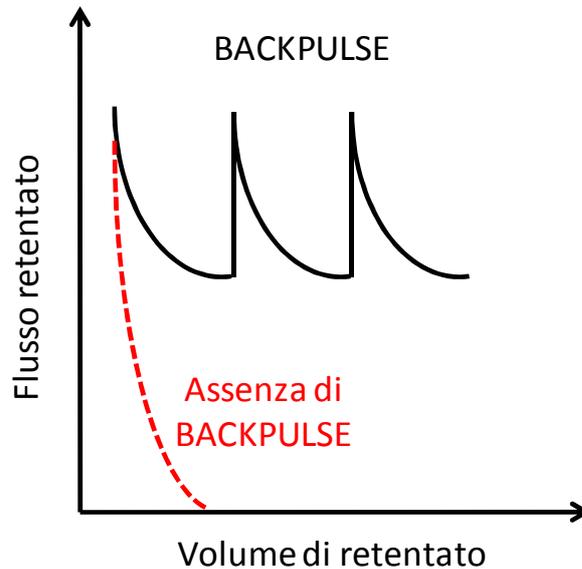


Figura 2.57. Esempio dell'andamento del flusso in funzione del volume di permeato in presenza ed in assenza di backpulse.

Di seguito vengono riportati i risultati ottenuti per diverse prove in cui è stato introdotto il sistema di backpulse della durata di 2 secondi ogni 20 secondi di tempo.

2. Parte sperimentale

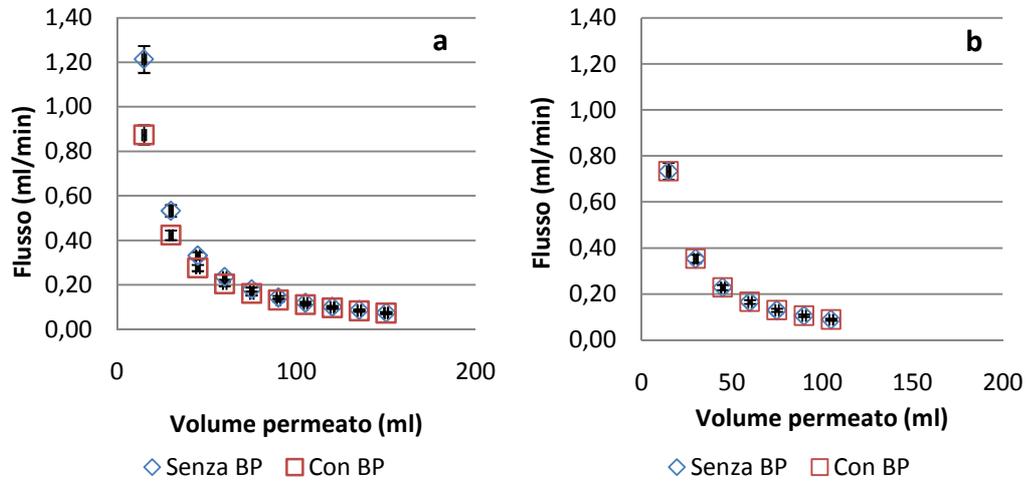


Figura 2.58. Andamento del flusso in funzione del volume di permeato a TMP pari a 1,4 bar e a velocità 80 l/h (a) e 180 l/h (b) in presenza ed in assenza di backpulse.

Da quanto ottenuto, né a basse né ad alte velocità l'introduzione del sistema di backpulse apporta un miglioramento nell'entità di flusso che si raggiunge con il sistema modello utilizzato costituito da una soluzione di xilano idrolizzato dai preparati enzimatici Fungamyl super AX e Celluclast Bg e la membrana da 1000 Da. Addirittura in fase iniziale, si ha una diminuzione del flusso dovuta al fatto che il backpulse comporta un richiamo di permeato verso l'interno della membrana.

Aumentando la TMP, i risultati non cambiano, sia per le basse che per le alte velocità.

2. Parte sperimentale

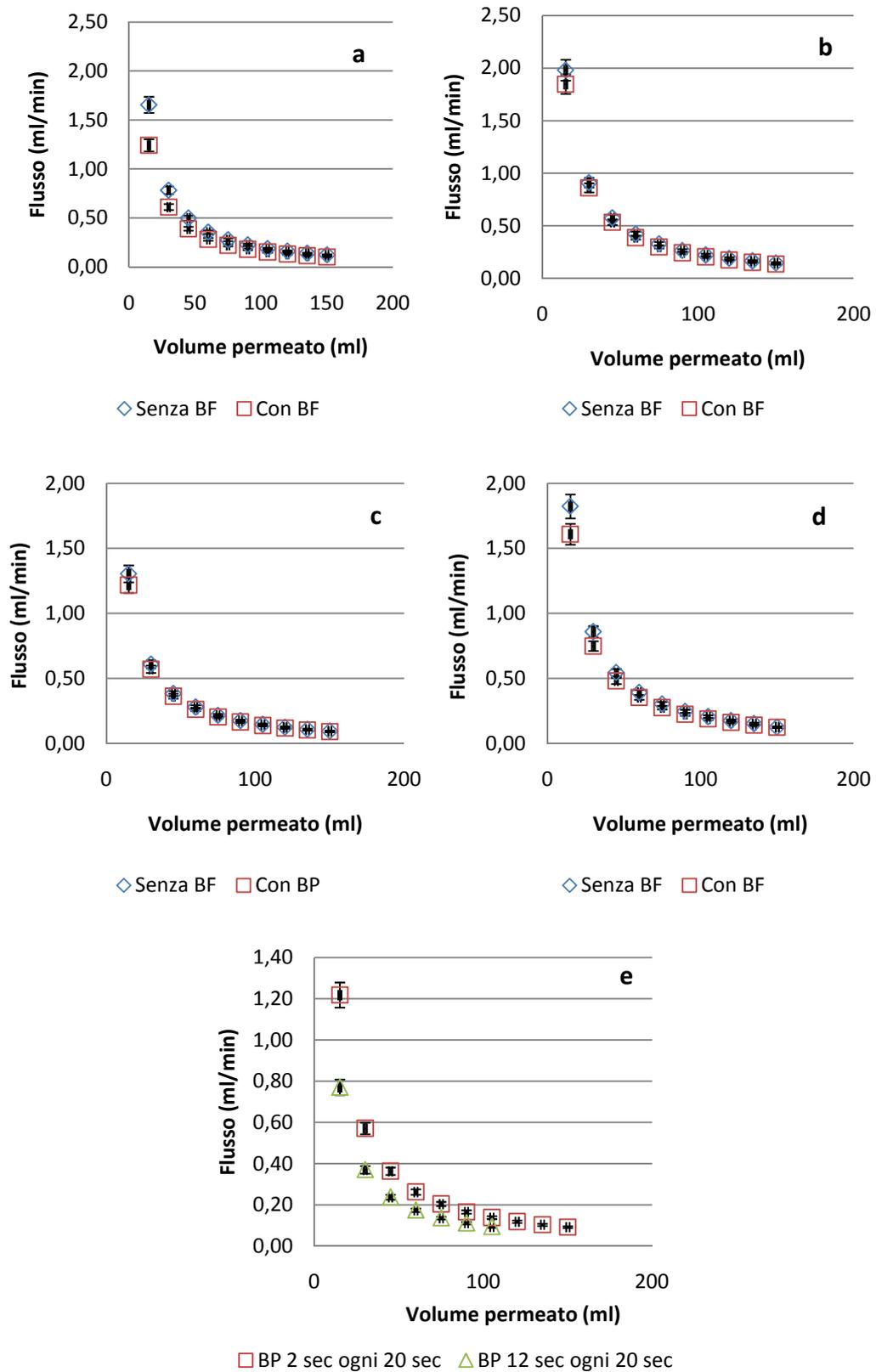


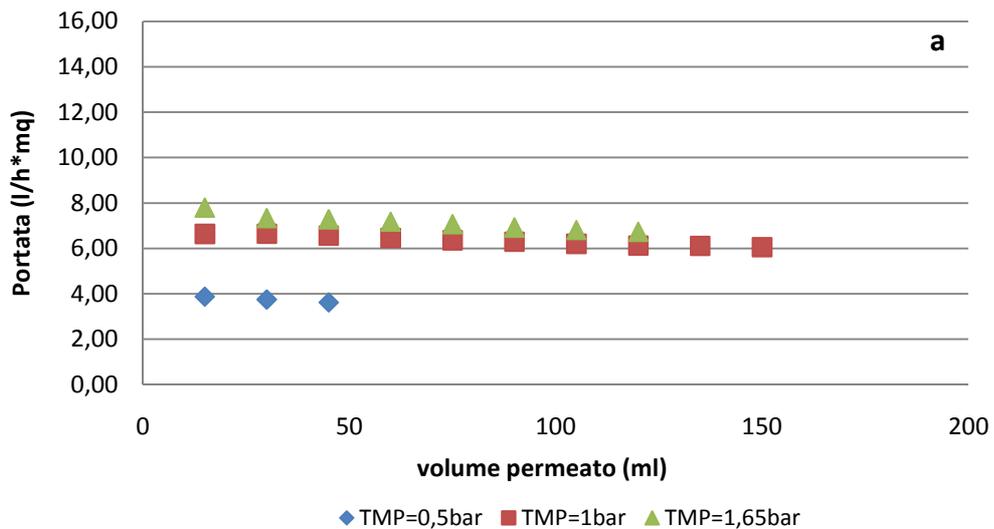
Figura 2.59. Andamento del flusso in funzione del volume di permeato a TMP pari a 1,8 bar e a velocità 80 l/h (a) e 180 l/h (b), a TMP pari a 2,2 bar a velocità 80 l/h (c) e 180 l/h (d), a TMP 2,2 bar e a velocità 180 l/h in presenza ed in assenza di backpulse.

2. Parte sperimentale

Nemmeno un aumento della durata del backpulse cambia l'andamento del flusso che tende sempre a diminuire e ad arrivare ad un valore costante di circa 0,10 ml/min. In quest'ultimo caso, avendo il backpulse una durata maggiore, la diminuzione del flusso a parità di volume raccolto è ancora più evidente.

Gli andamenti riportati relativi ai dati ottenuti in presenza ed in assenza del sistema di backpulsing, sono da imputarsi al fatto che tale sistema, risulta efficace per sistemi eterogenei per i quali bastano tagli molecolari superiori ai 20000 Da^{93,94,95,96}, al fine di purificare il liquido in esame.

Essendo in presenza di un sistema, xilano-enzima-prodotti di reazione, che necessita di tagli molecolari decisamente più bassi, più che il flusso è bene monitorare l'andamento della portata che tiene conto anche dell'area della sezione attraversata dal fluido.



2. Parte sperimentale

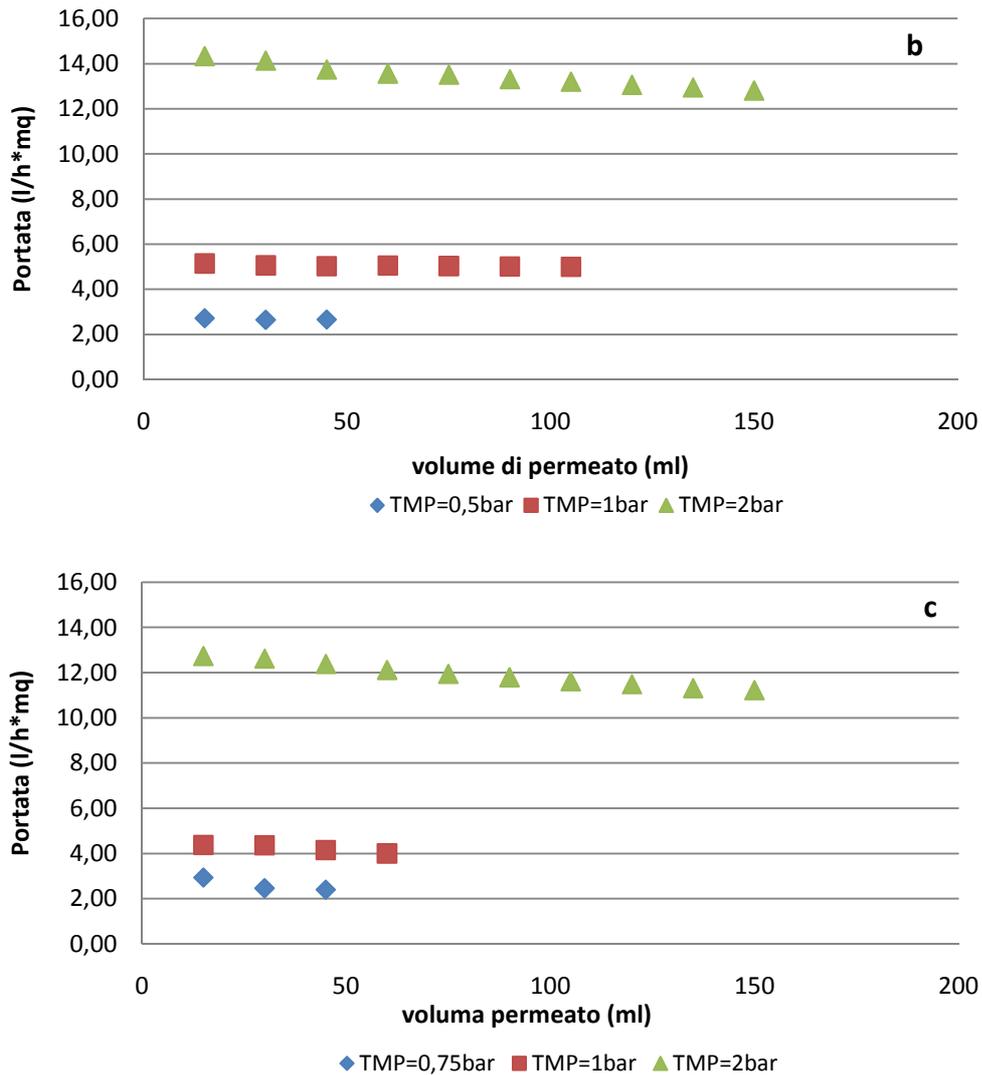


Figura 2.60. Andamento della portata in funzione del volume di permeato a diverse TMP e a velocità 60 l/h (a), 120 l/h (b) e 180 l/h (c).

Dai valori riportati in grafico, come nel caso del flusso i valori maggiori sono quelli relativi alla velocità di ricircolo pari a 6. A TMP minori abbiamo portate minori.

Tutti i valori mostrano però un andamento pressoché costante indice del fatto che alle condizioni operative impostate siamo già in regime di portata massima raggiungibile con il sistema modello scelto. Un andamento costante della portata conferma il fatto che non siamo in presenza di fouling della membrana (Figura 2.60): infatti in questi casi si raggiunge un calo di portata fino ad un valore pari a zero in tempi piuttosto brevi⁹⁷.

2. Parte sperimentale

In questo caso la soluzione con cui si ha a che fare contiene ancora catene polisaccaridiche non idrolizzate dal mix di preparati enzimatici utilizzati e particelle d'inerte che viene utilizzato per la liofilizzazione dei preparati enzimatici stessi che rendono il sistema piuttosto torbido. Questo solido sospeso può essere la causa di formazione di un boundary layer⁹⁸ di tipo reversibile che si forma per la diffusione di particelle dal flusso di retentato verso la membrana (Figura 2.61), e che può essere allontanato con un semplice lavaggio della membrana tubolare, nel nostro caso effettuato con una soluzione di soda 2M indicata per sistemi in cui sono presenti elevate concentrazioni di frazioni saccaridiche.

2. Parte sperimentale

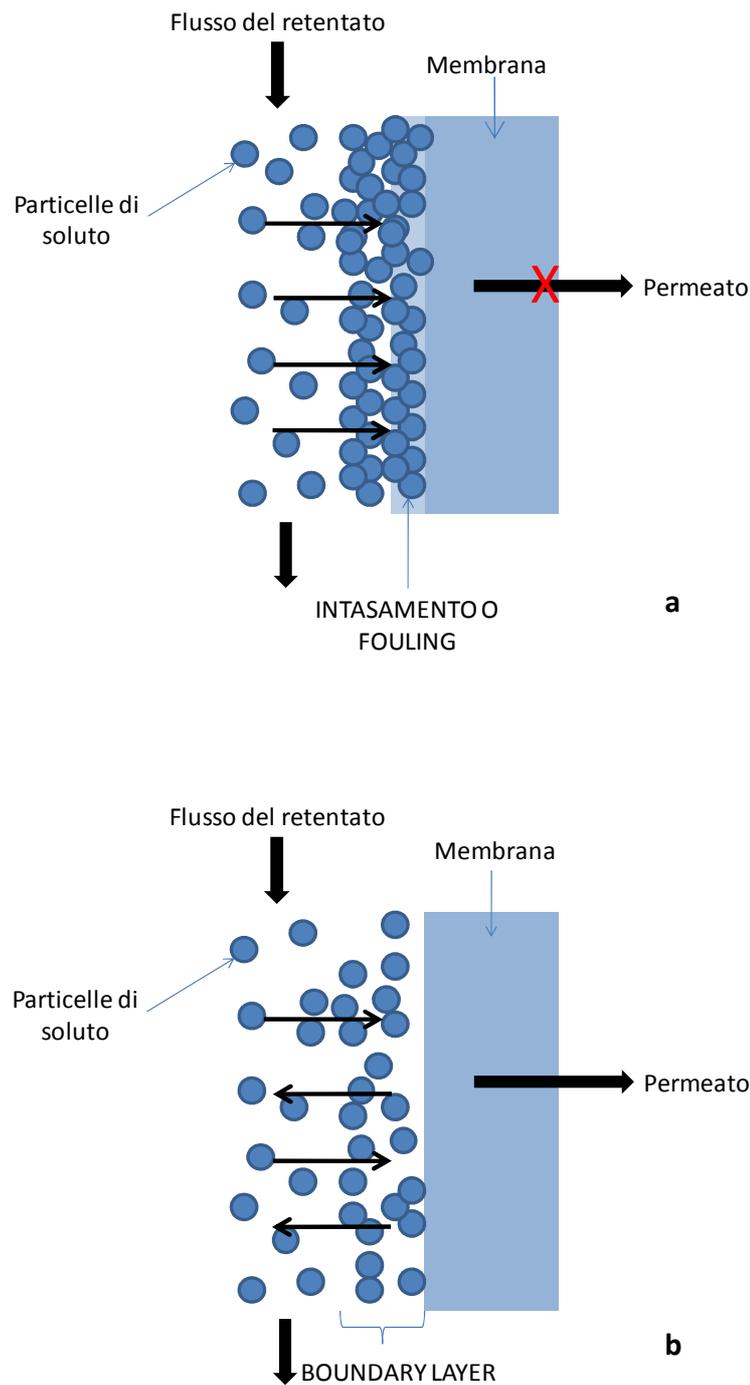


Figura 2.61. Differenza tra fouling della membrana e formazione di boundary layer.

Questo tipo di comportamento è supportato dal fatto che a parità di condizioni operative non si sono osservate significative differenze di flusso iniziale di permeato, che in tutte le prove condotte si arrivava allo stesso valore di flusso minimo di lavoro (0,10 ml/min).

Conclusioni relative allo scarto solido.

Il primo problema che si riscontra in un processo di bioraffinazione per scarti solidi, è quello di introdurre nel sistema una sufficiente quantità di acqua che funge sostanzialmente da solvente necessario alla veicolazione di preparati enzimatici con attività adatte all'idrolisi delle matrici vegetali costituenti il solido in esame. Nel caso della crusca che presenta strutture di tipo arabinoxilaniche, le attività enzimatiche necessarie sono di tipo xilanasiche e vengono fornite dai preparati enzimatici Fungamyl Super AX e Celluclast BG (Novozyme).

Una volta ottenuto un bioliquefatto di crusca di grano, si può procedere agli step di filtrazione a membrana e separazione cromatografica. Dai dati riportati in precedenza è ragionevole pensare che l'introduzione a valle dell'idrolisi enzimatica possa apportare miglioramenti in fase di purificazione con matrici adsorbenti. Infatti, sebbene si siano ottenuti buoni risultati in termini di rese percentuali di adsorbimento, la presenza di frazioni saccaridiche sembra inficiare in maniera significativa il recupero dai diversi adsorbenti testati delle frazioni fenoliche di interesse.

Anche le frazioni fenoliche contenute nel bioliquefatto di crusca, sembrano mostrare una maggiore affinità per adsorbenti di tipo neutro, che inoltre non risentono negativamente almeno in fase di adsorbimento della presenza di elevate concentrazioni di carboidrati. Tali componenti, a differenza di quelle contenute nelle acque di vegetazione delle olive, presentano anche una buona affinità per la resina neutra.

L'ottimizzazione del processo di filtrazione a membrana prevede la valutazione: delle dimensioni delle componenti stesse del bioliquefatto in fase di idrolisi, degli enzimi che si utilizzano per ottenere tale bioliquefatto, della velocità di ricircolo e della TMP dell'impianto di filtrazione. Tale mesa a punto risulta necessaria al fine di evitare eventuali intasamenti della membrana e di allontanare dal batch di reazione i prodotti il più in fretta possibile in modo da prolungare la capacità di conversione catalitica dell'enzima.

Nel caso della crusca un buon compromesso tra tutti questi parametri sembra essere quello di lavorare ad una velocità di ricircolo pari a 120 l/h con una TMP di 2 bar e con una membrana a taglio molecolare pari a 1 kDa.

Utilizzo di prodotti di bioraffinazione di scarti liquidi (acque di vegetazione delle olive) e solidi (crusca di grano): i bioliquefatti per cosmesi funzionale.

Come abbiamo visto, le biomasse vegetali sono quindi una fonte rilevante di *secondary chemical building blocks* attualmente non pienamente sfruttate in genere composte da cellulosa, emicellulose, lignina, amido, proteine, acidi grassi/trigliceridi, oli essenziali, gomme e fenoli. Il recupero di tutte queste componenti dalle biomasse tramite sistemi di filtrazione a membrana e successiva purificazione cromatografica può costituire una valida via di valorizzazione per l'ottenimento di materie prime ad alto valore aggiunto da inserire in diversi settori dell'industria chimica di sintesi. I sottoprodotti ottenuti da questi processi possono inoltre essere inviati alla produzione di biogas, bioetanolo o biofuels quando non contengono più elevate concentrazioni di polifenoli che influiscono negativamente sui processi di digestione anaerobica.

Al fine del recupero delle componenti di interesse dalle biomasse vegetali è necessario renderle biodisponibili tramite uno step di idrolisi enzimatica al fine di ottenere un bioliquefatto che può essere inviato ai successivi processi di filtrazione e separazione cromatografica, oppure può essere utilizzato tal quale grazie alle sue caratteristiche chimiche in diversi settori industriali per esempio come quello cosmetico (Figura 2.62).

2. Parte sperimentale

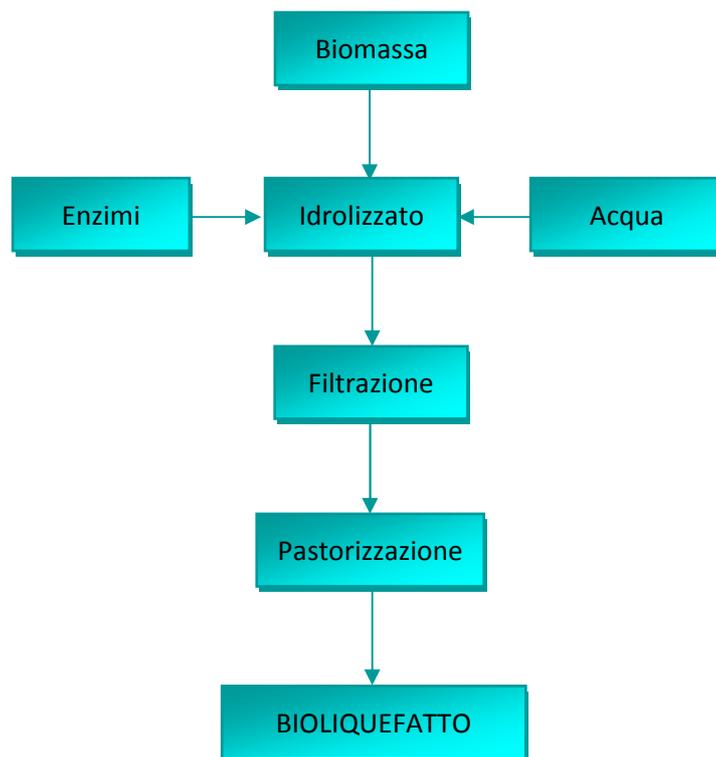


Figura 2.62. Schema del processo di ottenimento di un bioliquefatto.

In tabella 2.14 vengono riportate le caratteristiche tecniche di interesse dal punto di vista cosmetico per due diversi bioliquefatti ottenuti dagli scarti fin qui considerati.

Tabella 2.14. Caratteristiche chimiche dei bioliquefatti di acque di vegetazione delle olive e di crusca di grano.

Caratteristica chimica	Bioliquefatto da Acque di vegetazione delle olive tal quali	Bioliquefatto da crusca di grano
Polifenoli totali (mg/l)	700±35	198±10
Polifenolo caratterizzante (mg/l)	Idrossitirosolo: 387±19	Acido ferulico: 200±10
Potere antiossidante (ORAC/l) ⁹⁹	15000±300	900±18

2. Parte sperimentale

Il processo di produzione dei bioliquefatti è necessario al fine di rendere veicolabili all'interno di una formulazione cosmetica le molecole e quindi le loro proprietà. Non è infatti possibile utilizzare direttamente la crusca in quanto solida o le acque di vegetazione tal quali in quanto anch'esse contengono solidi sospesi. Componenti solide possono creare problemi a livelli formulativi, ma soprattutto rende non appetibile il prodotto al consumatore finale.

Non solo da regolamento europeo n.1223/2009 che regola la produzione ed il commercio dei prodotti cosmetici le materie prime utilizzate per la formulazione di emulsioni piuttosto che tensioliti, che devono avere caratteristiche chimico-fisiche, ma soprattutto microbiologiche che rendano sicuro l'utilizzo del prodotto per i consumatori finali. Nel processo di ottenimento del bioliquefatto sono, infatti, previsti dei processi di trattamento termico al fine di eliminare eventuali cariche microbiche.

I due bioliquefatti da acque di vegetazione delle olive e da crusca sono stati utilizzati per realizzare due prototipi di prodotti cosmetici: uno per lo skin care a base di bioliquefatto di crusca di grano e un prodotto a risciacquo a base di bioliquefatto di olive, entrambe inseriti in formula al 5%.

La crema viso a base di bioliquefatto di crusca di grano (Figura 2.63) è stato uno dei primi prodotti sviluppati attraverso lo spin-off universitario (Frescosmesi s.r.l., Bologna) e viene attualmente venduto come prodotto antiage viste le proprietà che il bioliquefatto ha mostrato *in-vivo* di apportare un aumento dell'elasticità cutanea pari al 9%, e una riduzione media delle ruche del 21%¹⁰⁰.

INCI: AQUA (WATER), **HYDROLYZED WHEAT BRAN**, AVENA SATIVA EXTRACT, HYDROLYZED TOMATO SKIN, , TOCOPHERYL ACETATE, CETYL ALCOHOL, OLEA EUROPAEA OLIVE (OIL) UNSAPONIFIABLES, VITIS VINIFERA (GRAPE) SEED OIL, TRITICUM VULGARE (WHEAT) GERM OIL, CAPRYLIC/CAPRIC TRIGLYCERIDES, CETEARYL ISONONANOATE, C₁₂-C₁₅ ALKYL BENZOATE, MEL, BUTYROSPERMUM PRKII BUTTER (SHEA BUTTER), CETEARYL GLUCOSIDE, XANTHAN GUM, MACADAMIA INTEGRIFOLIA SEED OIL, BORAGO OFFICINALIS SEED OIL, SODIUM BENZOATE, POTASSIUM SORBATE, PERSEA GRATISSIMA (AVOCADO) OIL, CITRIC ACID, PARFUM.

Figura 2.63. Elenco ingredienti dell'emulsione prototipo con bioliquefatto di crusca di grano.

Il prodotto a risciacquo sviluppato è uno shampoo a base di acque di vegetazione (Figura 2.64) provenienti dall'azienda agricola Altavita (FC), che è stato

2. Parte sperimentale

sviluppato dalla collaborazione tra i due spin-off universitari, Frescosmesi s.r.l. e Phenbiox s.r.l. (Bologna), con ECOArca (Modena), all'interno di un progetto che prevede la valorizzazione di sottoprodotti agroindustriali derivanti dalle eccellenze agricole delle regione Emilia-Romagna facente parte di un accordo quadro con SLOW-FOOD ITALIA.

INGREDIENTS: AQUA (WATER), HYDROLIZED OLIVE FRUIT^{*,**}, DISODIUM COCOAMPHODIACETATE, SODIUM MYRISTOYL SARCOSINATE, LAURAMIDOPROPYL BETAINE, COCAMIDOPROPYL BETAINE, POTASSIUM COCOYL PCA, SODIUM LAUROYL GLUTAMATE, SODIUM LAUROYL SARCOSINATE, SODIUM LAURYL SULFOACETATE, OLEA EUROPEA (OLIVE) OIL UNSAPONIFIABLES, CAESALPINIA SPINOSA GUM, CITRIC ACID, BENZYL ALCOHOL, SODIUM DEHYDROACETATE, POTASSIUM SORBATE, PARFUM (FRAGRANCE).

* proveniente da produzione Biologica Certificata
** prodotto da residui di lavorazione della produzione di Olio Extravergine d'oliva dell'azienda Altavita (FC)

Figura 2.64. Elenco ingredienti dell'emulsione prototipo con bioliquefatto di acque di vegetazione.

I prodotti cosmetici in cui viene aggiunto come attivo un bioliquefatto, come nel caso dell'azienda agricola Altavita (FC), possono consentire di chiudere il ciclo di produzione di una determinata *cultivar*. Infatti, ciò che rappresenta uno scarto da trattare con processi anche costosi per le aziende agricole può diventare una fonte di molecole altamente attive per realizzare nuove linee di cosmetici a proprio marchio o per conto terzi. Lo spin-off Frescosmesi s.r.l. nasce proprio su questa idea di business andando a fornire un nuovo servizio per la produzione di piccole linee cosmetiche molto personalizzate in grado di valorizzare specifici sottoprodotti. In questo modo il cliente, oltre a dare soluzione ad un problema come quello degli scarti, può anche diversificarsi sul proprio mercato di riferimento attraverso la vendita di nuovi prodotti attirando nuova clientela e fidelizzando ulteriormente quella pregressa.

3. CONCLUSIONI

Poiché la domanda di energia continua ad aumentare, soprattutto da parte dei paesi in via di sviluppo, il problema dell'esaurimento delle risorse non rinnovabili e dei danni causati all'ambiente dalle attività umane sono sempre più attuali. Tra le risorse non rinnovabili il petrolio è anche la principale fonte di materie prime per la chimica industriale oltre che energetica. L'impiego energetico, altamente remunerativo, fa sì che sia conveniente estrarre petrolio e che questo possa essere utilizzato anche come materia prima per la chimica industriale. Poiché i *chemical building blocks* (tra essi fenoli e cresoli) sui quali poggia la gran parte della chimica di sintesi, sono attualmente ottenuti dalla raffinazione di idrocarburi fossili (petrolio, carbone e gas naturale), vi è un crescente interesse verso la sintesi di tali molecole a partire da fonti rinnovabili. La Comunità Europea sta incentivando lo sviluppo di tecnologie di bioraffinazione, cioè processi che utilizzano proprio biomasse quali risorse rinnovabili per la produzione integrata di energia (biocombustibili) e di materie prime per la chimica industriale del dopo petrolio¹⁰¹.

Le biomasse vegetali derivanti dalle trasformazioni agroindustriali contengono circa il 3-8% (p/p secco) di fenoli e rappresentano quindi una ricca fonte di *secondary chemical building blocks* a basso costo e, al momento, non adeguatamente sfruttata.

L'utilizzo di tali biomasse può essere affrontato in termini di un nuovo concetto di bioraffineria a partire da sottoprodotti del settore agroalimentare (Figura 3.1), con l'obiettivo di sostituire parte delle materie prime ottenute da idrocarburi fossili con i *secondary chemical building blocks* naturalmente presenti in esse. I fenoli estratti dagli scarti possono essere utilizzati come versatili intermedi per ottenere una vasta gamma di prodotti finiti a medio ed alto valore aggiunto per l'industria chimica, ma anche cosmetica, farmaceutica ed alimentare^{102,103}.

3. Conclusioni

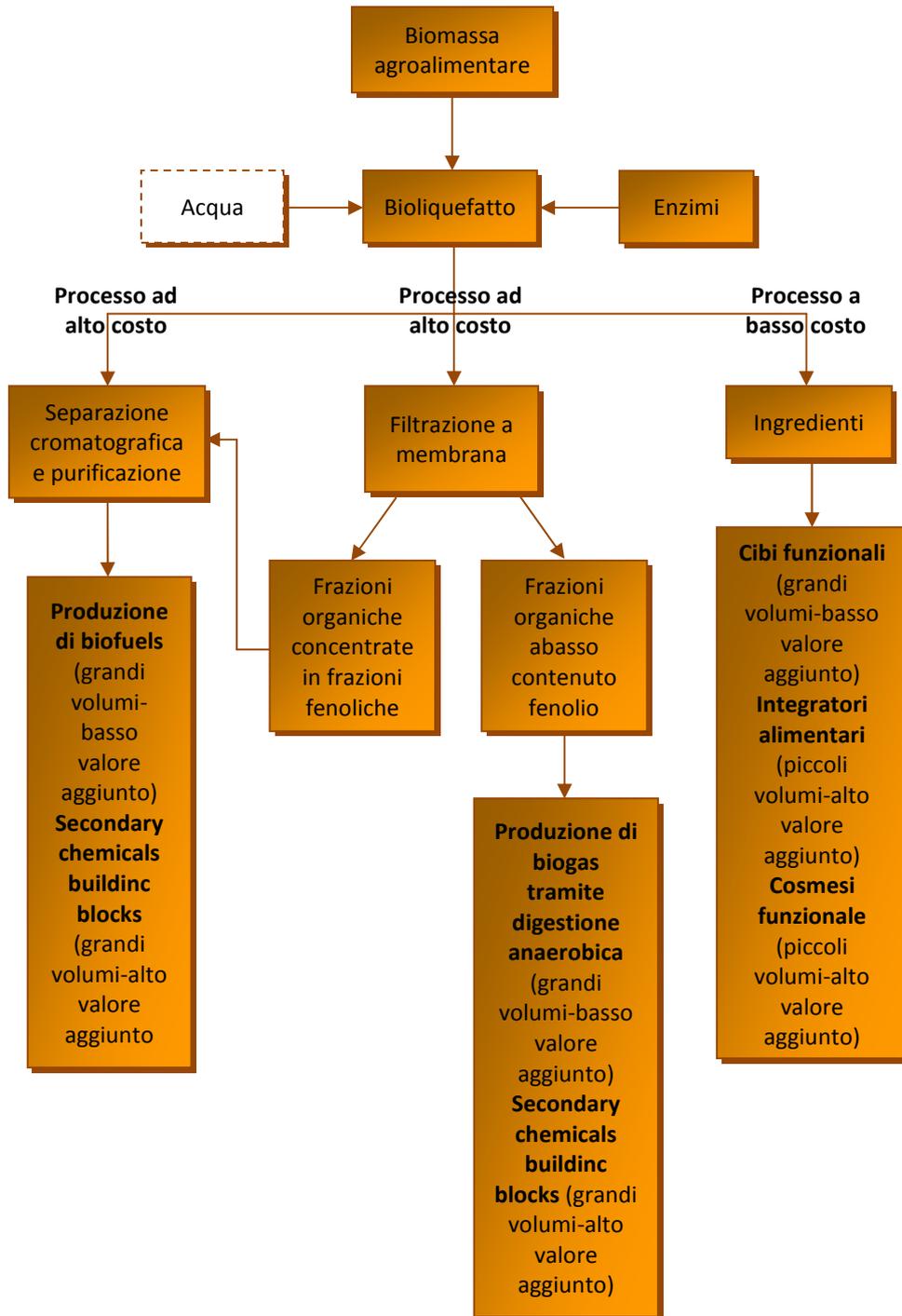


Figura 3.1. Esempio di nuovo concetto di bioraffineria a partire da biomasse agroindustriali.

Le biomasse agroindustriali si distinguono in due grandi categorie sostanzialmente dal punto di vista fisico: abbiamo infatti scarti di tipo liquido, come possono essere le acque di vegetazione derivanti dai processi di molitura delle olive, oppure solido, come nel caso della crusca derivante dalla lavorazione

3. Conclusioni

del grano. In questo secondo caso è necessaria l'introduzione di acqua nel sistema, per rendere possibili i successivi step di bioraffinazione.

Nel caso delle acque di vegetazione, non essendo necessaria l'aggiunta di acqua allo scarto si può procedere con uno dei tre processi sopra schematizzati.

La separazione cromatografica prevede l'utilizzo di matrici polimeriche adsorbenti di tipo alimentare con diverse caratteristiche, alcune presentano carattere di scambiatori anionici forti o deboli, altri essendo macropolimeri aromatici presentano un carattere neutro, altri ancora si comportano da scambiatori ionici. Per questa tipologia di scarto, le frazioni fenoliche in essa contenute, risultano avere una maggiore affinità per le matrici adsorbenti a carattere ionico, per le quali è possibile ottenere rese di recupero delle frazioni fenoliche pari all'80% utilizzando una concentrazione di adsorbente del 50%. Gli adsorbenti a carattere neutro, permettono recuperi intermedi, mentre gli scambiatori a carattere anionico, mostrano le peggiori performances di recupero. Tale comportamento è sostanzialmente dovuto all'effetto negativo da imputarsi alla presenza di frazioni polisaccaridiche^{56,57} all'interno delle acque di vegetazione, che vanno a diminuire la capacità adsorbente della matrice diminuendone l'area superficiale andando ad interagire con i siti amminici presenti su tale tipo di polimero adsorbente.

Tale fenomeno negativo, è meno evidente se prima della purificazione cromatografica, si effettua una filtrazione a membrana, con la quale da un lato si eliminano le frazioni polisaccaridiche concentrando invece quelle fenoliche, e dall'altro è possibile recuperare parte dell'acqua utilizzata nell'impianto di produzione dell'olio d'oliva spingendosi fino all'osmosi inversa. In questo caso considerando gli adsorbenti percentuali per le matrici che danno scambio anionico, si osserva un aumento del recupero, in fase di adsorbimento, dallo scarto delle frazioni fenoliche all'aumento della concentrazione di matrice in soluzione. In questo caso, in presenza di scambiatori di tipo ionico, le rese di processo si riducono del 30%, ma mostrano un trend crescente per concentrazioni di adsorbente maggiore. Nel caso di acque di vegetazione più concentrate sono le resine a carattere neutro a mostrare le performances migliori permettendo di

3. Conclusioni

raggiungere percentuali di recupero dell'85%, rese che aumentano all'aumentare di matrice adsorbente.

In termini di adsorbimenti specifici, trattando le acque di vegetazione con processi a membrana si è in grado di recuperare per unità di matrice adsorbente una concentrazione di polifenoli che è di 10 volte superiore rispetto a quella recuperabile dalle acque tal quali.

Considerando il solo idrossitirosole, la componente fenoliche di maggiore interesse nelle acque di vegetazione, il processo cromatografico ha permesso il recupero fino al 45% del contenuto totale attraverso l'utilizzo dell'Amberlite FPX 66 ottenendo così un estratto idroalcolico contenente circa 1,7 g/l di idrossitirosole.

Per quanto riguarda le acque di vegetazione tal quali sarebbe interessante vederne il comportamento una volta che sono state trattate enzimaticamente al fine di idrolizzare le catene polisaccaridiche in esse contenute al fine di ridurre l'effetto negativo della frazione polisaccaridica sul processo di separazione cromatografica.

Se per lo scarto liquido una fase di idrolisi enzimatica, può non essere fondamentale lo è sicuramente per gli scarti di tipo solido dove i *secondary chemical building blocks* di interesse sono legati alle strutture delle matrici vegetali⁴¹. Un esempio di scarto solido, è la crusca di grano, costituita principalmente da catene di arabinoxilani alle quali è legato l'acido ferulico, il fenolo caratterizzante tale scarto. Sono quindi necessarie attività di tipo xilanasico al fine di idrolizzare tali catene e rendere biodisponibile tale molecole in acqua. L'interesse di questa matrice vegetale è anche dovuto al fatto che la frazione fenolica è meno distribuita e principalmente legata alla presenza di pochi acidi cinnamici di cui l'80% è acido ferulico.

A tale fine sono stati individuati preparati enzimatici ad elevate attività xilanasiche, quali Fungamyl Super AX e Celluclast BG (Novozyme), i quali permettono di ottenere un bioliquefatto di crusca di grano che contiene circa 198 mg/l di acido ferulico, 78 g/l di zuccheri totali e 30 g/l di zuccheri riducenti.

Al fine di recuperare l'acido ferulico tramite bioraffinazione possono essere utilizzate le stesse matrici polimeriche viste per le acque di vegetazione. In

3. Conclusioni

generale anche le frazioni fenoliche presenti nella crusca di grano vengono recuperate con rese di processo di adsorbimento maggiori per le matrici a carattere neutro, con rese addirittura quantitative ad una percentuale di adsorbente pari al 50%. Le performances peggiori sono state ottenute con le matrici a scambio anionico, in particolare la scambiatrice anionica forte che, come nel caso precedente delle acque di vegetazione tal quali risentiva maggiormente di frazioni polisaccaridiche presenti in soluzioni^{87,88,89}.

Se il processo di adsorbimento è favorito anche in termini di frazioni saccaridiche, lo stesso non può essere detto per la fase di desorbimento infatti, in questo caso il maggiore rapporto carboidrati-fenoli, rende difficile il recupero sia delle componenti saccaridi che, sia di quelle fenoliche. Tale comportamento è da imputarsi alla scelta del solvente scelto come miscela estraente e cioè l'etanolo acido, in letteratura viene infatti imputato tale effetto come risultato della precipitazione di componenti saccaridiche sulla matrice adsorbente.

Anche in questo caso diventa quindi fondamentale l'introduzione di uno step di filtrazione a membrana, nello specifico ultra e nano filtrazione, al fine da un lato di allontanare le catene polisaccaridiche che vanno ad inficiare la successiva purificazione cromatografica delle componenti fenoliche, dall'altro permette anche nel caso di enzimi che risentono di inibizione da prodotto come le xilanasi^{79,80}, di allontanare dal batch di reazione i possibili inibitori prolungando la capacità di conversione catalitica del o dei preparati enzimatici.

Operando su sistema modello costituito da xilano fatto reagire con i due preparati Fungamyl Super AX e Celluclast BG, sono state messe a punto le condizioni operative valutando le dimensioni delle componenti stesse del bioliquefatto in fase di idrolisi, degli enzimi che si utilizzano per ottenere tale bioliquefatto, della velocità di ricircolo e della TMP dell'impianto di filtrazione, tutto al fine di evitare eventuali intasamenti della membrana e di allontanare dal batch di reazione i prodotti il più in fretta possibile in modo diminuire al massimo i problemi di inibizione enzimatica.

Nel caso della crusca un buon compromesso tra tutti questi parametri sembra essere quello di lavorare ad una velocità di ricircolo pari a 120 l/h con una TMP di 2 bar e con una membrana a taglio molecolare pari a 1 kDa.

3. Conclusioni

Seppure le biomasse agroindustriali rappresentano notevoli volumi di materia prima da trattare in processi di bioraffinazione, e di conseguenza permetterebbero di ottenere elevate quantità di *secondary chemical building blocks*, i processi di filtrazione a membrana e purificazione cromatografica hanno un costo elevato, in termini impiantistici e di materiale impiegato. Sebbene, in un recente studio, Setti *et al.*⁵⁹ hanno dimostrato che il processo di separazione cromatografica è in grado di recuperare i *secondary chemical building blocks* a costi competitivi con l'attuale presso di mercato. La mancanza di elevati volumi di domanda di prodotti da "risorse rinnovabili" così come l'eccessiva offerta derivante dagli enormi volumi di matrici di scarto vegetale frenano lo sviluppo delle bioraffinerie intese come processi di separazione sequenziale delle componenti chimiche ad alto valore aggiunto. Tali processi rimangono relegati alla tradizionale nicchia di mercato degli estratti erboristici o parafarmaceutici dei prodotti naturali.

Un processo di bioraffinazione meno costoso e quindi più competitivo, è quello che prevede l'utilizzo di bioliquefatti per la produzione diretta di ingredienti da utilizzare nei settori alimentari, degli integratori e non ultimo della cosmesi.

In particolare in campo cosmetico da una materia prima a basso costo come le biomasse agroalimentari è possibile ottenere un prodotto liquido che permetta la veicolazione di molecole altamente attive sulla pelle tramite l'applicazione di un cosmetico, ad elevato valore aggiunto per un prodotto finito, il cosmetico, ad un valore aggiunto ancora più alto.

Questo tipo di valorizzazione permette inoltre alle aziende agroalimentari, ma anche ad agriturismi, negozi di frutta e verdura, di chiudere il loro ciclo produttivo risparmiando quelli che sono i costi di smaltimento dei rifiuti, che di fatto tali non sono per chi li valorizza tramite idrolisi enzimatica e ottenimento di un bioliquefatto.

Su questa base questo lavoro di dottorato ha permesso di sviluppare la base delle ricerche industriali che hanno portato allo sviluppo di un nuovo spin-off universitario che è stato fondato a marzo 2011 con il nome FRESCOSMESI. Una società a responsabilità limitata avente lo scopo di studiare nuovi biocosmetici a forte valenza territoriale partendo proprio dagli scarti agroalimentari e trasformandoli in nuovi prodotti cosmetici ad alto valore aggiunto.

4. MATERIALI E METODI

Scarto agroalimentare liquido: acque di vegetazione delle olive.

Determinazione delle isoterme di adsorbimento relative a matrici polimeriche adsorbenti

Per la determinazione delle isoterme di adsorbimento⁵⁴ di diverse matrici polimeriche adsorbenti fornite dalla ditta Rhom and Haas, Amberlite IRA 402, FPA 51, FPX 66, XAD 4, XAD 16, XAD 1180, XAD 761, sono state utilizzare soluzioni a concentrazioni diverse di polifenoli, e una concentrazione di matrice adsorbente costante.

A tale scopo sono state utilizzate come soluzioni di partenza le acque di vegetazione provenienti da processi di filtrazione a membrana, diluite in acqua distillata di 2, 10, 25 e 50 volte, e le acque di vegetazione tal quali, diluite in acqua di 2, 3, 4 e 5 volte. Per quanto riguarda le matrici adsorbenti, sono state utilizzate ad una concentrazione pari al 10% p/p delle acque di vegetazione.

Su aliquote di acque di vegetazione prima e dopo il trattamento con matrici adsorbenti è stata eseguita l'analisi per la determinazione del contenuto totali di polifenoli con il metodo del Folin-Ciocalteu¹⁰⁴.

Separazione cromatografica tramite processi di adsorbimento e desorbimento su matrici polimeriche di acque di vegetazione delle olive.

Sono state eseguite prove di adsorbimento su diverse matrici polimeriche, Amberlite IRA 402, FPA 51, FPX 66, XAD 4, XAD 16, XAD 1180, XAD 761, fornite dalla ditta Rhom and Haas, in sistemi batch costituiti da bottiglie in vetro Pirex, ponendo per un tempo complessivo di circa 20 ore, gli adsorbenti a contatto con acque di vegetazione derivanti da processi di filtrazione a membrana, AV1, e acque tal quali, AV2, a temperatura ambiente e sotto costante agitazione. Sono state scelte le seguenti concentrazioni di matrice in percentuale p/p di acque: 6, 20, 30, 40 e 50. Le acque di vegetazione tal quali, prima di essere utilizzate, sono

state sottoposte a centrifugazione per 15 minuti a 7000 giri, e successivamente filtrate su carta per allontanare gli eventuali solidi di sospesi.

Una volta trascorse le 20 ore, le matrici adsorbenti sono state allontanate e sottoposte ad un processo di desorbimento utilizzando etanolo acido per l'aggiunta del 4% di HCl, considerando una concentrazione di adsorbente pari al 6% p/V di etanolo acido stesso. I processi di desorbimento sono stati condotti per un'ora e ad una temperatura pari a 80°C in bagno maria.

Una volta trascorso il tempo di desorbimento, le resine esauste sono state allontanate e l'estratto alcolico acido è stato trattato per le successive analisi.

Scelta della miscela estraente ottimale per lo step di desorbimento.

Sono state eseguite prove di desorbimento utilizzando diverse miscele desorbenti:

- Etanolo acido per HCl al 4%;
- Etanolo acido per HCl al 4% e acqua in rapporto 60:40;
- Etanolo acido per HCl al 4% e acqua in rapporto 50:50;
- Etanolo acido per HCl al 4% e acqua in rapporto 40:60;
- Acqua.

La fase di adsorbimento è stata condotta utilizzando una concentrazione di matrici polimerica pari al 30% p/p di acque di vegetazione, per 20 ore sotto costante agitazione. Trascorso tale periodo le matrici polimeriche sono state separate per la successiva fase di desorbimento in cui l'adsorbente è stato utilizzato al 6% p/V delle varie miscele estraenti sopra elencate. I processi di desorbimento sono stati condotti per un'ora ad una temperatura di 80°C in bagno ad acqua.

L'etanolo utilizzato (Fluka) è puro al 99%, e l'acido cloridrico (Sigma) è al 37%.

Scelta della quantità ottimale di acido cloridrico nell'etanolo della miscela per lo step di desorbimento.

Sono state eseguite prove di desorbimento utilizzando diverse percentuali di acido cloridrico (37%, Sigma), pari a 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 3 e 4 % V/V di etanolo (99%, Fluka).

La fase di adsorbimento è stata condotta utilizzando una concentrazione di matrici polimerica pari al 30% p/p di acque di vegetazione, per 20 ore sotto costante

agitazione. Trascorso tale periodo le matrici polimeriche sono state separate per la successiva fase di desorbimento in cui l'adsorbente è stato utilizzato al 6% p/V di miscela estraente con le quantità di acido cloridrico sopra elencate. I processi di desorbimento sono stati condotti per un'ora ad una temperatura di 80°C in bagno ad acqua.

Determinazione della quantità di polifenoli totali con il metodo del Folin-Ciocalteu¹⁰⁵.

Si preparano 5 soluzioni di catechina (Sigma), utilizzata come polifenolo di riferimento, in metanolo a concentrazioni comprese tra 20 e 300 mg/l. In matracci da 20 ml, ad 1 ml di ciascuna soluzione, sono aggiunti: 1 ml di metanolo, 5 ml d'acqua, 1 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu e, dopo 5 minuti, 4 ml di carbonato di sodio 10% p/V. Si porta a volume con acqua distillata e si legge l'assorbanza a 700 nm dopo 90 minuti d'incubazione a 30°C. La concentrazione di polifenoli in soluzione è calcolata tramite la seguente retta di taratura (Figura 4.1):

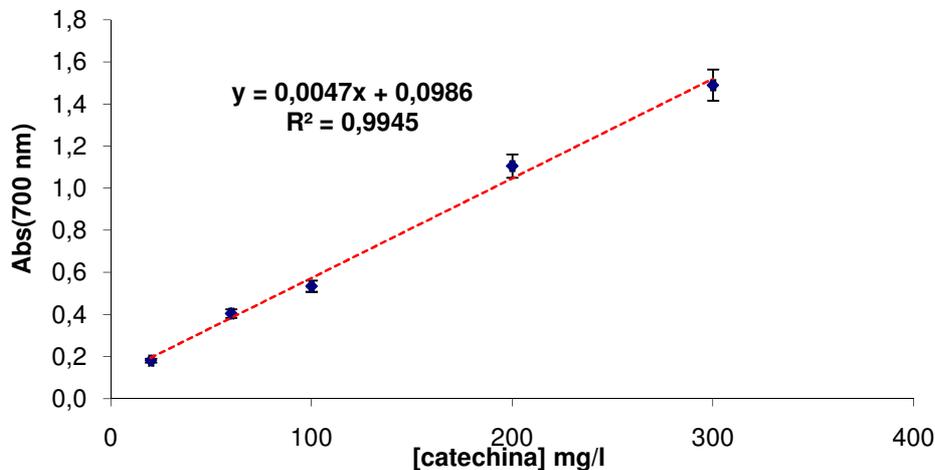


Figura 4.1. Retta di taratura per la determinazione dei polifenoli totali a 30°C.

$$[\text{Polifenoli}] \text{ (mg/l)} = (\text{Abs}_{700 \text{ nm}} - 0,0986) / 0,0047$$

Per la determinazione dei polifenoli totali campioni di acque di vegetazione AV1 e AV2, prima e dopo il processo di adsorbimento su matrice polimerica, al fine di eliminare sostanze organiche che possono interferire nella lettura, si effettua un

passaggio in cartuccia C-18 end-capped, Phenomenex-Strata, 1.0g/ 6ml, secondo il metodo descritto di seguito: si lava la cartuccia con 2 ml di metanolo e si condiziona con 5 ml di acido solforico 0,01 N. Si adsorbe 1 ml di campione, opportunamente diluito in acido solforico 0,1 N, e si aggiungono 2 ml d'acido solforico 0,01 N. Si collega la cartuccia ad un matraccio da 20 ml e si eluisce con 2 ml di metanolo e 5 ml d'acqua distillata. Al contenuto del matraccio si aggiunge 1 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu e, dopo 4 minuti, 4 ml di carbonato di calcio 10 % p/V portando poi a volume con acqua. Dopo 90 minuti si legge l'assorbanza a 700 nm, avendo cura di centrifugare il campione per allontanare il precipitato di carbonato che si forma, contro un bianco preparato in un matraccio da 20 ml contenente tutti i reagenti e 2 ml di metanolo, ma non contenente fenoli.

Detrminazione del contenuto di idrossitirosolo.

Per la determinazione della concentrazione di idrossitirosolo presente in acque di vegetazione trattate con processi di filtrazione a membrana, prima e dopo i processi di adsorbimento/desorbimento su matrice polimerica, è stata messa a punto un'analisi cromatografica tramite tecnica HPLC.

Le fasi mobili, la colonna utilizzata ed il metodo HPLC utilizzato vengono descritti di seguito:

- fase mobile A: acqua per HPLC con uno 0,5% di acido acetico glaciale e un 2% di acetonitrile per HPLC;
- fase mobile B: acetonitrile per HPLC con uno 0,5% di acido acetico glaciale;
- colonna: Gemini 3u C18 110A 100x4.60 mm 3,0±0,3 µm (PHENOMENEX);
- volume di iniezione: 20µl;
- velocità di flusso: 1ml/min.

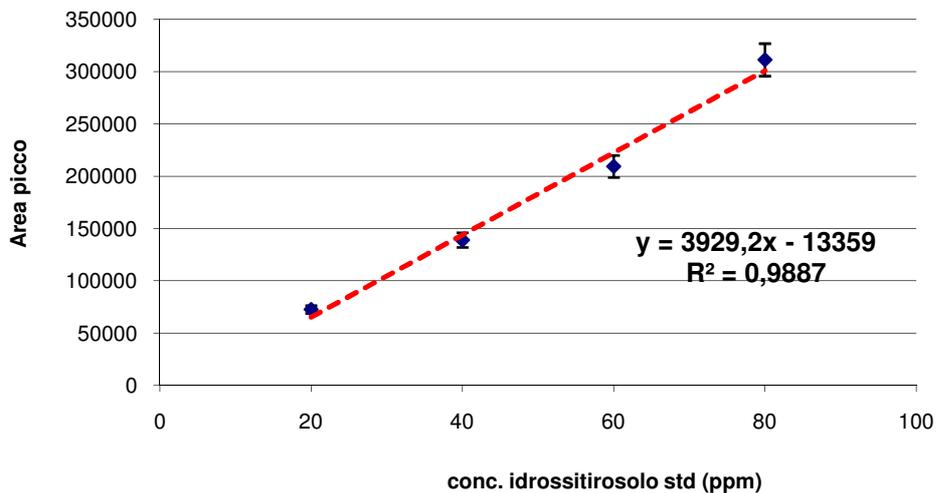
Il gradiente utilizzato è riportato in tabella 1, il tempo complessivo di analisi è di 60 minuti compresi 5 minuti per il ricondizionamento della colonna.

Tabella 4.1. Programmata per l'analisi HPLC.

STEP	% FASE A	% FASE B	TEMPO (min)
0	100	0	/
1	96	4	10
2	50	50	30
3	20	80	45
4	10	90	50
5	100	0	55
6	100	0	60

Il tempo di ritenzione stimato per l'idrossitirosolo è pari a circa 9,5 minuti.

Con la programmata sopra descritta è stato possibile costruirsi una retta di taratura utilizzando una soluzione madre di idrossitirosolo standard (98%, Extrasynthese, Francia) a 100 ppm in metanolo per HPLC al quale viene aggiunto uno 0,5% di acido cloridrico. La soluzione è stata poi opportunamente diluita nello stesso solvente in modo da ottenere soluzioni contenenti concentrazioni di idrossitirosolo pari a 20, 40, 60 e 80 ppm.

**Figura 4.2.** Retta di taratura dell'idrossitirosolo.

I campioni di acque di vegetazione provenienti da processi di filtrazione a membrana e trattati in processi di adsorbimento e successivo desorbimento, sono

stati analizzati previa diluizione in miscela di metanolo:acido cloridrico 95:5, e successiva filtrazione per allontanare eventuali precipitati.

I processi di adsorbimento sono stati condotti al 30% p/p di matrice polimerica rispetto alle acque di vegetazione, mentre i processi di desorbimento sono stati condotti al 6% p/v di matrice polimerica rispetto alla miscela estraente ottimale individuata per ogni adsorbente.

Trattamenti successivi di adsorbimento e desorbimento su matrici polimeriche adsorbenti di acque di vegetazione derivanti da processi di filtrazione a membrana.

Due diverse aliquote di acque di vegetazione derivanti da processi di filtrazione a membrana sono state trattate con due diverse tipologie di adsorbenti, una con Amberlite FPA 51, e l'altra con Amberlite XAD 16, posti ad una concentrazione del 30% rispetto al peso di acque da trattare, e sono state poste sotto agitazione per circa 20 ore per un primo processo di adsorbimento.

Trascorso tale periodo, le matrici adsorbenti sono state allontanate e le acque esauste sono state separate in due differenti aliquote e ritratte nel modo seguente:

- Acque derivanti da un primo trattamento con Amberlite XAD 16 ritratte con Amberlite XAD 16 sempre al 30%;
- Acque derivanti da un primo trattamento con Amberlite XAD 16 ritratte con Amberlite FPA 51 sempre al 30%;
- Acque derivanti da un primo trattamento con Amberlite FPA 51 ritratte con Amberlite FPA 51 sempre al 30%;
- Acque derivanti da un primo trattamento con Amberlite FPA 51 ritratte con Amberlite XAD 16 sempre al 30%.

I secondi processi di adsorbimento sono stati condotti sempre per un periodo pari a 20 ore circa.

Sia dopo il primo adsorbimento che dopo il secondo, le matrici polimeriche sono state trattate per i processi di desorbimento con la miscela estraente migliore individuata, a caldo e per un'ora. Per questi processi la concentrazione di adsorbente è del 6% p/v di miscela estraente.

Scarto agroindustriale solido: crusca di grano.Preparazione del substrato di xilano (from oat spelts, Fluka)

Per la preparazione delle soluzioni di substrato al fine di determinare le performances di diversi preparati enzimatici, è stato scelto un substrato modello costituito da xilano (from oat spelts, Fluka). Le soluzioni di substrato vengono preparate in tampone citrato-fosfato Mc Ilvine nei pH desiderati, e nelle concentrazioni p/V necessarie alle prove descritte in seguito. Lo xilano viene solubilizzato mantenendo la soluzione in ebollizione e sotto agitazione magnetica per 3 minuti. Trascorso tale tempo si lascia raffreddare il substrato fino a temperatura ambiente sotto costante agitazione e in seguito viene incubato a temperatura costante di 30°C sotto agitazione per 4 ore.

Determinazione degli zuccheri riducenti (Metodo dell'ADNS)

La procedura è basata sul metodo di Bailey *et al.* 1992¹⁰⁵ e consente la determinazione spettrofotometrica degli zuccheri riducenti liberati tramite reazione ossidativa con acido 3,5-dinitrosalicilico (ADNS)⁽¹⁾. La reazione che avviene tra il reattivo ADNS e uno zucchero alla base del metodo è riportata in Figura 4.3.

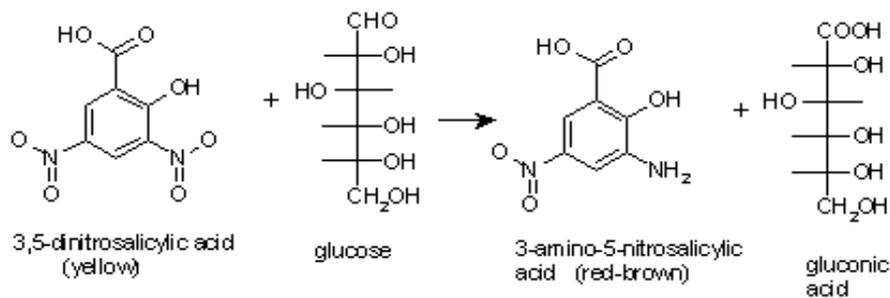


Figura 4.3. Reazione ossidoriduttiva fra glucosio e acido 3,5-dinitrosalicilico (giallo) con formazione di acido gluconico e acido 3-ammino-5-nitrosalicilico (rosso).

⁽¹⁾ 75g di sodio potassio tartrato vengono sciolti in 50 ml di NaOH 2M, portando a volume di circa 100 ml di acqua distillata. A questa soluzione si aggiungono 0,25 g di Acido Dinitrosalicilico (la dissoluzione di ADNS è lenta ma non bisogna riscaldare, e nemmeno ricorrere al bagno ultrasuoni). Quando ADNS è perfettamente sciolto si porta a volume fino a 250 ml con H₂O distillata e si conserva a 4°C e al riparo dalla luce.

Per determinare la concentrazione degli zuccheri riducenti di interesse presenti nei campioni si utilizza la retta di taratura preparata a partire da soluzioni di xilosio (M.W. 150.13 g/mol), riportata in Figura 4.4.

$$\text{Xilosio rilasciato [mg/ml]} = (\text{Abs}_{550\text{nm}} + 0.0236) / 1.3598$$

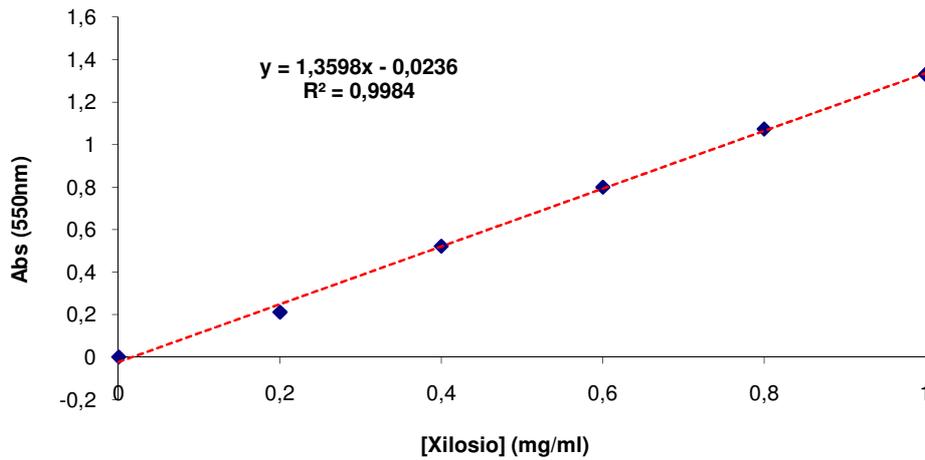


Figura 4.4. Retta di taratura per la determinazione dell'attività xilanasica

Per la determinazione degli zuccheri riducenti nei campioni si aggiungono a 400 µl di campione 600 µl di ADNS e si pone il tutto in acqua bollente per 7 minuti. Dopo raffreddamento e centrifugazione (13000 rpm per 5 min) si esegue la lettura spettrofotometrica a 550 nm contro un bianco preparato una soluzione di 1,8 ml di substrato e 0,2 ml di acqua distillata e da questa soluzione 400 µl vengono prelevati e aggiunti a 600 µl di ADNS.

Prove di attività xilanasica dei preparati enzimatici Fungamyl Super AX e Celluclast BG a diversi pH.

Al fine di determinare l'attività xilanasica a diversi pH, sono state preparate diluizioni in acqua pari a 1:1000 per i preparati enzimatici Fungamyl super AX e Celluclast BG (NOVOZYME).

Parallelamente si preparano soluzioni di xilano (from oat spelts, Fluka) allo 0,3% (p/V) in tampone Mc Ilvine a pH 3,8, e 5,0, come descritto in precedenza.

4. Materiali e metodi

La reazione enzimatica per entrambe i preparati enzimatici viene eseguita aggiungendo 0,2 ml di soluzione enzimatica a 1,8 ml di substrato che vengono incubati a 30°C sotto agitazione per 3 minuti. Trascorso questo periodo si determinano gli zuccheri riducenti come descritto in precedenza. La lettura spettrofotometrica viene effettuata contro un bianco preparato analogamente al batch di reazione, aggiungendo però a 1,8 ml di substrato 0,2 ml di acqua distillata. Le prove vengono eseguite in doppio.

La concentrazione di xilosio liberato si ottiene tramite la retta di taratura riportata in Figura 4.4. Da questa si può risalire all'attività xilanastica specifica e all'attività a saturazione dei due preparati considerati.

Determinazione dell'attività xilanastica dei preparati enzimatici Fungamyl Super AX e Celluclast BG a diverse temperature.

Si sono preparate soluzioni di xilano allo 0,3% (p/V) in tampone Mc Ilvine (0,135 g in 45 ml di tampone) a pH 3,8 e 5,0 come descritto in precedenza. Le soluzioni sono state poste a bagnomaria per portare ciascuna soluzione alla temperatura desiderata e mantenerla costante nel corso della prova; si è scelto di monitorare l'andamento dell'attività xilanastica alle temperature di 30, 40, 55,65 e 70°C. Una volta raggiunta la temperatura desiderata, alla soluzione di xilano sono stati aggiunti, mantenendo la soluzione sotto agitazione magnetica, 5 ml di soluzione di preparato enzimatico Fungamyl Super AX diluito 1:1000 in acqua. Si sono realizzati prelievi inizialmente ogni 30 secondi per 5 minuti e poi ad intervalli più lunghi, fino ad un'ora di reazione, per la determinazione degli zuccheri riducenti. Per il preparato enzimatico Celluclast Bg, sono state condotte le prove in maniera del tutto analoga a quanto appena descritto.

Prove di stabilità dei preparati Fungamyl Super AX e Celluclast BG a diverse temperature.

Si è preparata una soluzione di xilano allo 0,3% (p/V) in tampone Mc Ilvine a pH 3,8 e 5,0. Parallelamente vengono termostatati a diverse temperature (40 e 55°C) a bagnomaria 100 ml di acqua distillata per la successiva preparazione della soluzione di enzima. Una volta raggiunta la temperatura desiderata si sono

aggiunti sotto agitazione quantità di enzima in modo da ottenere una diluizione pari a 1:1000.

La reazione enzimatica viene eseguita come descritto nei paragrafi precedenti e in seguito si realizza la determinazione degli zuccheri riducenti.

Si procede in maniera analoga per entrambe i preparati enzimatici scelti.

Separazione cromatografica tramite adsorbimento e desorbimento su matrici polimeriche del bioliquefatto di crusca di grano.

La crusca viene posta a contatto con acqua in un rapporto 1:7, in bottiglie di vetro Pirex. Il sistema viene posto in autoclave ad una temperatura di 120°C per un periodo pari a 21 minuti, trascorso il quale una volta raggiunta la temperatura ambiente vengono aggiunti i preparati enzimatici Fungamyl Super AX e Celluclast BG (Novozyme) entrambi ad una concentrazione dell'1% p/p di crusca. La reazione enzimatica viene condotta per un periodo pari a circa 24 ore trascorse le quali, il sistema viene filtrato per allontanare il solido sospeso non idrolizzato.

Aliquote diverse di bioliquefatto vengono poste a contatto con le matrici polimeriche già ampiamente descritte in precedenza e fornite dalla ditta Rhom and Haas utilizzate in una concentrazione pari al 30% p/p di bioliquefatto di crusca in una prima fase di adsorbimento. Il processo viene condotto per circa 20 ore trascorse le quali i vari adsorbenti vengono allontanati dal bioliquefatto esausto e trattati per essere desorbiti con una miscela estraente costituita da un rapporto 50:50 di acqua ed etanolo acido per l'aggiunta di un 4% di acido cloridrico al 37%. In fase di desorbimento la matrice polimerica è utilizzata in una concentrazione pari al 6% p/V di miscela estraente.

Sul bioliquefatto di partenza, sui bioliquefatti esausti dopo il processo di adsorbimento e sugli estratti idroalcolici vengono eseguite le successive analisi per la determinazione del contenuto totale di polifenoli, della concentrazione di carboidrati totali e riducenti.

Per quanto riguarda gli estratti idroalcolici, questi vengono sottoposti ad evaporazione tramite rotavapor, riducendone il volume di circa la metà, al fine di allontanare il più possibile l'etanolo che può dare problemi per le determinazioni di carboidrati totali e riducenti.

Per il contenuto di polifenoli totali e zuccheri riducenti si eseguono le prove già descritte in precedenza.

Determinazione del contenuto di carboidrati totali (Metodo del Fenolo).

La procedura si basa sul metodo fenolo/solforico ricavata da una metodica di analisi dei carboidrati totali attraverso analisi spettrofotometrica^{106,107}.

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

A 200 µL di standard, posti in un tubo di reazione, si aggiungono 200 µL di soluzione acquosa di fenolo 5% p/v. Successivamente si aggiunge 1 ml di acido solforico concentrato (98%p/p) e rapidamente si chiude il tubo di reazione. Dopo una energica agitazione si lascia sviluppare la reazione per 30 min a 30°C e successivamente si effettuano le letture di assorbanza alla lunghezza d'onda di 490 nm contro un bianco costituito da 200 µL di H₂O distillata.

Dai valori di concentrazione degli standard e di assorbanza a 490 nm si costruisce una retta di taratura.

La retta in figura 4.5 è stata costruita operando un raffreddamento a 30 °C dei campioni all'interno dei tubi ma come si può osservare tale operazione non garantisce la linearità che si è invece ottenuta effettuando il saggio senza un raffreddamento dei campioni (Figura 4.6).

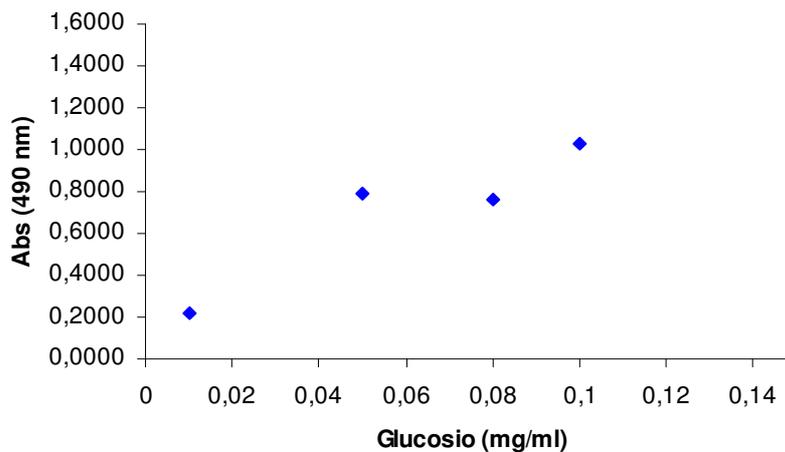


Figura 4.5. Retta di taratura per la determinazione dei carboidrati totali con il metodo fenolo/solforico e operando il raffreddamento a 30°C dei tubi dopo aggiunta di acido solforico concentrato.

4. Materiali e metodi

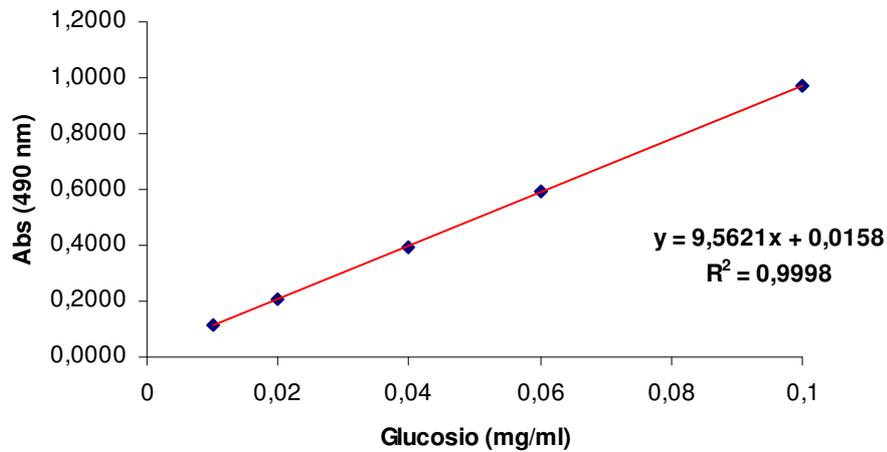


Figura 4.6. Retta di taratura per la determinazione dei carboidrati totali con il metodo fenolo/solforico non operando il raffreddamento dei tubi dopo aggiunta di acido solforico conc.

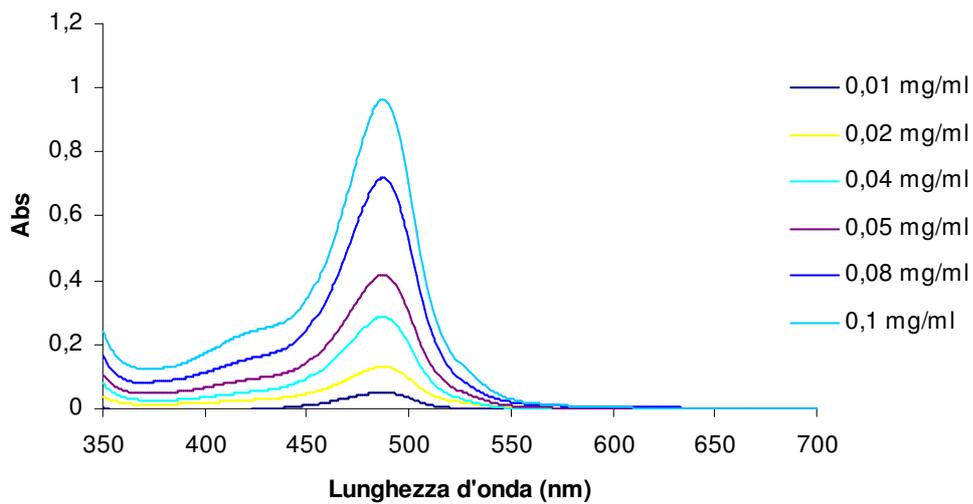


Figura 4.8. Spettri di assorbimento (350-700nm) dei campioni di standard trattati con il metodo fenolo/solforico.

Come si può osservare in figura 4.8 gli spettri di assorbimento dei campioni di standard di glucosio dopo il saggio fenolo/solforico hanno un massimo di assorbimento a lunghezze d'onda di 490 nm e inoltre si ha una proporzionalità diretta tra assorbanza e concentrazione di glucosio e ciò è in linea con i risultati ricercati in letteratura¹⁰⁸.

La retta di taratura di figura 4.7, relativa agli spettri di figura 4.8, verrà utilizzata per le determinazioni sui campioni reali di bioliquefatto di crusce di grano,

un'aliquota del quale verrà opportunamente diluita per ottenere concentrazioni rientranti nel range di linearità della retta di taratura.

Separazione per filtrazione a membrana

Lo strumento utilizzato per le prove di ultrafiltrazione è il Membralox Xlab 5 prodotto da Pall Exekia (Figura 4.9).

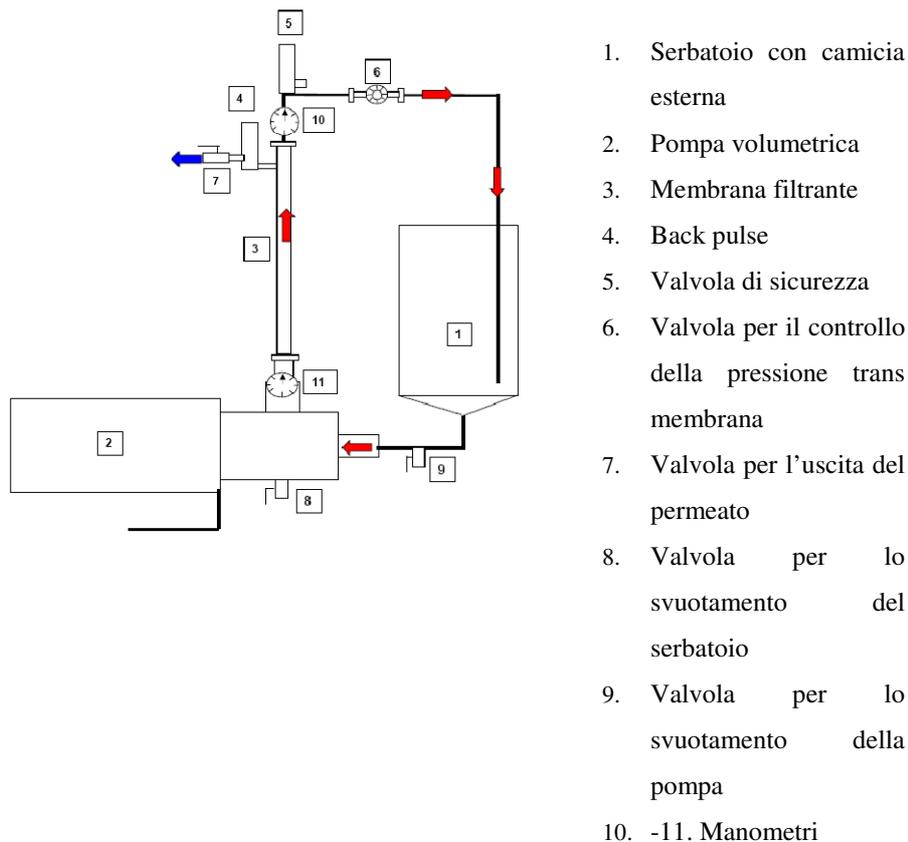


Figura 4.9. Rappresentazione schematica di Membralox Xlab 5.

Lo strumento è dotato di un serbatoio (capacità 3 litri), munito di camicia esterna che permette il controllo della temperatura, e di una pompa volumetrica (capacità: 1300 l/h, 0 bar – 880 l/h, 4 bar, temperatura < 80°C). Il flusso attraverso l'elemento filtrante può essere regolato variando la velocità della pompa e la pressione transmembrana. Questa può variare da un minimo di 0 bar a un massimo di 4 bar, a seconda di come viene regolata la valvola contrassegnata nello schema dal numero 6. Tuttavia l'entità del flusso dipende anche dalla

dimensione dei pori della membrana utilizzata, dalla temperatura di lavoro e dalla viscosità del liquido.

Le membrane a disposizione sono membrane in ceramica asimmetriche composte da un supporto poroso e uno strato filtrante. I materiali di cui sono costituite (α -allumina, zirconia e titania) garantiscono numerosi vantaggi quali:

- stabilità termica;
- resistenza nel tempo;
- possibilità di utilizzo a tutti i pH e compatibilità con una vasta gamma di composti chimici;
- resistenza alla corrosione;
- possibilità di sterilizzazione e sanitizzazione.

Le membrane a disposizione hanno porosità di 2 e 0,2 μm (in α allumina), 20 nm (in zirconia), 5 e 1 KDa (in titania).

Determinazione del contenuto di proteine totali (Metodo Bradford)

Per la determinazione delle proteine totali viene utilizzato un semplice saggio colorimetrico che utilizza il reattivo di Bradford (Sigma - Aldrich). La retta di taratura (Figura 4.6) è costruita con albumina di siero bovino (Protein standard, 2 mg BSA/ml, Sigma - Aldrich) alle concentrazioni di 0,25, 0,5, 1,0, 1,4 mg/ml. In una provetta si introducono 1,5 ml di reattivo di Bradford e successivamente 50 μl di campione standard di BSA. Si lascia sviluppare il colore per un tempo di circa 5 min e successivamente si effettuano le letture di assorbanza alla lunghezza d'onda di 595 nm contro un bianco costituito da 50 μl di acqua distillata e 1,5 ml di reattivo.¹⁰⁹

4. Materiali e metodi

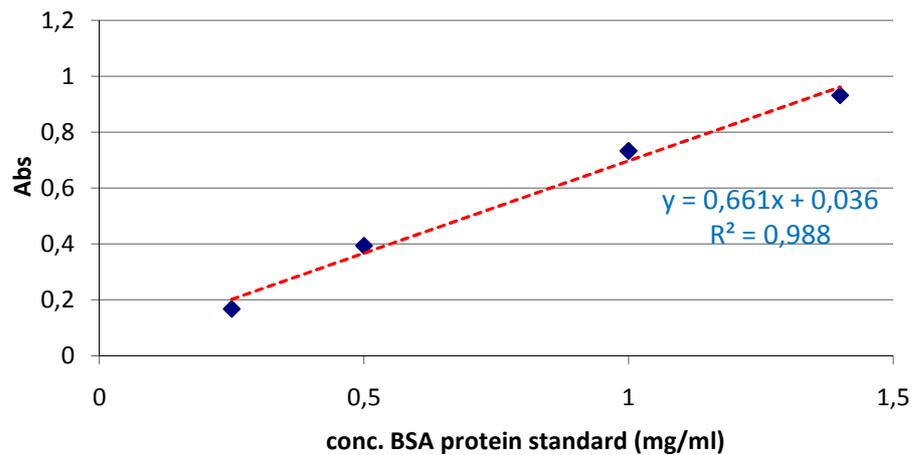


Figura 4.10. Retta di taratura per la determinazione delle proteine totali con il metodo di Bradford.

Per la determinazione delle proteine totali nei campioni, si introducono in una provetta 1,5 ml di reattivo di Bradford e successivamente 50 μ l di campione. Si lascia sviluppare il colore per un tempo di circa 5 min e successivamente si effettuano le letture di assorbanza alla lunghezza d'onda di 595 nm contro un bianco costituito da 50 μ l di acqua distillata e 1,5 ml di reattivo.

Stima delle dimensioni molecolari dei preparati enzimatici Fungamyl Super AX e Celluclast BG.

Sono state eseguite prove utilizzando membrane filtranti a 1kDa, 5 kDa, 20 nm e 0,2 μ m e 2 μ m. Nel serbatoio dello strumento sono stati posti 2 L di una soluzione acquosa di Celluclast BG diluito 1:500; l'enzima per queste prove è stato utilizzato ad una concentrazione maggiore rispetto alle precedenti per avere una risposta spettrofotometrica più evidente, anche nel caso di una sua parziale fuoriuscita col permeato o disattivazione dovuta al passaggio sottopressione attraverso la membrana. La pressione transmembrana è stata mantenuta a 1,3 bar e la temperatura a 18°C tramite ricircolo d'acqua nella camicia esterna del serbatoio. Appena azionato lo strumento e a intervalli di tempo successivi sono stati fatti prelievi sia dal batch di reazione che dal permeato raccolto (di volta in volta riunito al retentato); 0,2 ml di retentato prelevato sono stati uniti a 1,8 ml di xilano allo 0,3% in tampone Mc Ilvine a pH 5,0 preparato come descritto in

precedenza e si è fatta avvenire la reazione enzimatica per 3 minuti a 30°C. La quantità di zuccheri riducenti rilasciati è stata determinata con il metodo dell'ADNS. La stessa prova viene condotta anche sull'aliquota di permeato prelevato. Su quest'ultimo determinata anche il contenuto di proteine totali per verificare se un'eventuale mancanza di attività fosse dovuta all'assenza dell'enzima nel permeato o alla sua inattivazione.

Per il preparato Fungamyl Supern AX si opera in maniera analoga.

Stima delle dimensioni molecolari del substrato di xilano.

Una volta identificata la membrana che permette di trattenere l'enzima, è stato necessario fare lo stesso per determinare la distribuzione delle dimensioni molecolari delle catene polisaccaridiche dello xilano usato come sistema modello. Si sono quindi preparati 2 L di soluzione di xilano allo 0,3% p/v in tampone Mc Ilvine a pH 5,0. Il substrato è stato introdotto all'interno del serbatoio dello strumento e sono state impostate le condizioni sperimentali come per la prova descritta nel paragrafo precedente. Il permeato viene raccolto in continuo in un cilindro graduato. Ogni 10 ml un'aliquota di permeato è sottoposta alla determinazione della concentrazione di zuccheri riducenti prima e dopo reazione enzimatica eseguita con uno dei preparati enzimatici diluiti 1:1000.

Per la determinazione dei pesi secchi della soluzione di permeato, si è portato a peso costante in stufa a 70°C un'eppendorf di plastica da 1,5 ml, alla quale una volta raggiunto il peso costante, è stato aggiunto 1 ml di permeato raccolto. Il tutto è stato posto nuovamente in stufa fino ad ottenere un peso costante del permeato seccato. Dalla differenza dei due pesi si determina il peso secco del permeato raccolto.

La prova viene condotta per tutte le membrane a disposizione (1 KDa, 5 KDa, 20 nm, 0,2 e 2 micron) utilizzando per tutte un'unica soluzione all'0,3% (p/V) di xilano e cambiando di volta in volta solo l'elemento filtrante. Si è ottenuto così il frazionamento delle catene polisaccaridiche di xilano.

Stima delle dimensioni molecolari del prodotto di idrolisi enzimatica in presenza di Celluclast BG e/o Fungamyl Super AX

Sono stati preparati 2 L di una soluzione di xilano allo 0,3% (p/V) a pH 5,0, alla quale sono stati aggiunti 2 g di enzima (Celluclast BG o Fungamyl Super AX) al fine di ottenere una diluizione di enzima pari a 1:1000. La reazione è stata condotta per circa tre ore; trascorso tale periodo il sistema è stato portata all'ebollizione in modo da ottenere l'inattivazione dell'enzima.

Il tutto è stato poi introdotto all'interno del serbatoio del sistema di ultrafiltrazione e si è proceduto al frazionamento dei prodotti di reazione cambiando di volta in volta solo la membrana filtrante (da quella a taglio molecolare minore, 1 KDa, a quella con il superiore, 2 micron), sempre tramite analisi degli zuccheri riducenti con il metodo dell'ADNS. Le condizioni operative sono state mantenute a pressione transmembrana di 1,4 bar e temperatura di circa 25°C.

Il permeato è stato raccolto in continuo in un cilindro graduato e a intervalli di tempo si è prelevata un'aliquota su cui fare la determinazione degli zuccheri riducenti e del peso secco.

Per le prove realizzate utilizzando entrambi gli enzimi Celluclast BG e Fungamyl Super AX, queste vengono aggiunti al batch di reazione in quantità tali da avere una diluizione totale di biocatalizzatore pari a 1:1000. Anche in questo caso la reazione enzimatica è stata condotta a 55°C e protratta per alcune ore fino a disattivazione degli enzimi.

Determinazione delle condizioni operative ottimali del processo di ultra e nano filtrazione.

Le prove sono state eseguite su di un substrato di xilano all'1% in acqua preparato come descritto in precedenza e fatto reagire per circa tre ore con Fungamyl Super AX in modo da ottenere una diluizione finale pari a 1:1000. Il sistema è poi stato portato ad ebollizione per alcuni minuti per la disattivazione dell'enzima.

Il tutto è stato poi introdotto all'interno dello strumento Membralox XLab 3 (Pall), e tramite i controlli presenti sono state eseguite prove impostando diverse velocità di ricircolo (60, 120 e 180 l/h) e diverse TMP. È stato monitorato il

4. Materiali e metodi

sistema raccogliendo dati relativi al tempo necessario alla fuoriuscita di 15 ml di permeato fino a raccoglierne circa 150 ml.

Per quanto riguarda le prove in presenza ed in assenza di backpulse una volta preparato il substrato come nelle prove precedenti, oltre ad impostare velocità di ricircolo e TMP, è stato impostato il periodo di durata di backpulsing e l'intervallo di ripetizione dello stesso. È stato monitorato il sistema raccogliendo dati relativi al tempo necessario alla fuoriuscita di 15 ml di permeato fino a raccoglierne circa 150 ml.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ G. Carovita, J. Giliberto, Eco-energia: avanza la ricerca sul dopo-petrolio, "Il Sole 24 Ore", supplemento del 16/12/2004
- ² Dati IEA (International Energy Agency): www.iea.org
- ³ S. Achterholt, H. Priefert, A. Steinbüchel, „Identification of *Amycolatopsis* sp. strain HR167 genes, involved in the bioconversion of ferulic acid to vanillin”, 2000, *Appl Microbiol Biotechnol*, 54, 799-807.
- ⁴ US Patent n° 6,869,974 B1.
- ⁵ T. Ho Kim, C. Gi Han and C. Kun Song, “Instability of threshold voltage under constant bias stress in pentacene thin film transistors employing polyvinylphenol gate dielectric”, 2008, *Thin Solid Films*, 516, 6, 1232-1236.
- ⁶ F. Cherubini, “The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals”, *Energy Conversion and Management*, 51, 1412-1421, 2010.
- ⁷ G. Grassi e A.V. Bridwater, “Biomass for energy and environmental, agriculture and industry in Europe – A strategy for the future”, 1990, Commission of the European Communities.
- ⁸ The State of Food and Agriculture, FAO report (2005)
- ⁹ Dati ISTAT: www.istat.it
- ¹⁰ C. Di Blasi, V. Tanzi e M. Lanzetta, “A study on the production of agricultural residues in Italy”, 1997, *Biomass and Bioenergy*, 12, 321-331.
- ¹¹ Fonte COLDIRETTI: www.coldiretti.it
- ¹² D. Zanichelli, “Processi di biorefining per l'estrazione di secondary chemical building blocks da sottoprodotti dell'agroindustria”, Tesi di Dottorato di ricerca in Biocatalisi applicata e Microbiologie Industriale, Ciclo XX, 2008.
- ¹³ <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/plants/plantmodel.html>
- ¹⁴ K.J. Johnson, B.J. Jones, C.J. Shultz, A. Babic, “Non enzymatic cell wall (glycol) protein” , in THE PLANT CELL WALL Annual Plant Reviews, Vol. 8 pp.111-143, 2003.
- ¹⁵ C. B. Faulds, “Ferulic acid esterases from *Aspergillus niger*: their application in the biotransformation of agricultural residues”, PhD Thesis, University of East Anglia, 1997
- ¹⁶ S. Vorwerk, S. Somerville, C. Somerville; “The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance”, 2004, *Trends in plant science*, 9, 203-209.
- ¹⁷ R. Sharma, Y. Chisti, U. Chand Banerjee, “Production, purification, characterization, and applications of lipases”, 2001, *Biotechnology Advances*, 19, 627-662.

-
- ¹⁸ H.G. Shin, Y.M. Choi, H.K. Kim, Y.C. Ryu, S.H. Lee, B.C. Kim, “Tenderization and fragmentation of myofibrillar proteins in bovine longissimus dorsi muscle using proteolytic extract from *Sarcodon aspratu*’s, 2008, *Food Science and Technology*, 8, 1389-1395.
- ¹⁹ http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.4
- ²⁰ http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.78
http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.8
http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.151
- ²¹ http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.15
http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.11
http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=4.2.2.10
- ²² R. Singh Jayani, S. Saxena, R. Gupta, “Microbial pectinolytic enzymes: A review”, 2005, *Process Biochemistry*, 40 2931–2944.
- ²³ http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.15
http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.11
http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=4.2.2.10
- ²⁴ F. Carloni, “Valorizzazione degli scarti dell’industria olearia tramite il recupero di sostanze fenoliche e la produzione di alcool etilico per via fermentative”, Tesi di Laurea in Chimica Industriale, Università di Bologna, 2003-2004
- ²⁵ V.F. Crepin, C.B. Faulds, I.F. Connerton, “Functional classification of the microbial feruloyl esterases”, 2004, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63, 647–65.
- ²⁶ N. Mulinacci, A. Romani, C. Galardi, P. Pinelli, C. Giaccherini, F. F. Vincieri, “Polyphenolic Content in Olive Oil Waste Waters and Related Olive Samples”, 2001, *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 49, 3509-3514.
- ²⁷ M. Pizzichini, C. Russo, “Procedimento di Recupero Integrato di Componenti Chimiche delle Acque di Vegetazione con Tecnologie di Membrana”, Brevetto depositato il 16-06-2004 n. RM2004A000292.
- ²⁸ P.G. Pifferi, L. Setti, J. Bordado, “Plant for the treatment of waste waters”, European Patent n. WO 03/004419.
- ²⁹ C. Russo, “A new membrane process for the selective fractionation and total recovery of polyphenols, water and organic substances from vegetation waters (VW), 2007, *Journal of Membrane Science*, 288, 239–246.
- ³⁰ A. Agalias, P. Magiatis, A.L. Skaltsounis, E. Mirkos, A. Tsarbopoulos, E. Gikas, I. Spanos, T. Manios, “ A new process for the Management and Recovery of Natural Antioxidants”, 2007, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2671-2676.

-
- ³¹ J. A. Morillo, B. Antizar-Ladislao, M. Monteoliva-Sánchez, A. Ramos-Cormenzana, N. J. Russell, “Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes”, 2009, *Appl Microbiol Biotechnol*, 82, 25–39.
- ³² A. Agalias, P. Magiatis, A.L. Skaltsounis, E. Mirkos, A. Tsarbopoulos, E. Gikas, I. Spanos, T. Manios, “ A new process for the Management and Recovery of Natural Antioxidants”, 2007, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2671-2676.
- ³³ E. Ansaloni, D. Zanichelli, L. Setti, “Processo di valorizzazione dei sottoprodotti dell’agroindustria: approccio metodologico per il recupero di chemicals ad alto valore aggiunto”. Quaderni di ECOMONDO 2006 (Novembre 8-11, Rimini), a cura di L. Morselli, Maggioli Editore, Rimini, pp. 475-481.
- ³⁴ L. Setti. “Biorefining of the agro-food wastes for the recovery of phenols as chemical building blocks for the industrial chemistry to come”. Edited by L. Morselli, I. Vassura, F. Passarini. *Lectures of the summer school on Waste Recovery: Recycling and Waste to Energy*. Bologna. 25-30 June 2007. (pp. 93 - 101). Rimini: Maggioli Editore (2007)
- ³⁵ L. Setti, E. Ansaloni, D. Zanichelli, “Processi di biorefinery: recupero di secondary chemicals building blocks da scarti agroindustriali liquidi (acque di vegetazione delle olive)”, 2009, Quaderni di ECOMONDO 2009, Rimini 28-31 ottobre 2009.
- ³⁶ M. Pizzichini, C. Russo, E. Ferrero, E. Tuccimei, “Le tecnologie separative mediante membrana”, ENEA: Report RSE/2009/19.
- ³⁷ C. Charcosset, “Membrane processes in biotechnology: An overview”, 2004, *Biotechnology Advances*, 24, 482–492.
- ³⁸ www.lenntech.it
- ³⁹ www.pall.com
- ⁴⁰ A. Bianco, F. Buiarelli, G. Cartoni, F. Coccioli, R. Jasionowska, P. Margherita, Analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry of biophenolic compounds in olives and vegetation waters. Part I, *Journal of Separation Science*, 200, 26, 409–416.
- ⁴¹ F. Visioli, A. Romani, N. Mulinacci, S. Zarini, D. Conte, F.F. Vincieri, et al., “Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters, 1999, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3397–3401.
- ⁴² O. I. Aruoma, M. Deiane, A. Jenner, B. Halliwell, M. Kaur, S. Bnni, et al., “Effects of hydroxytyrosol found in extra virgin olive oil on oxidative DNA damage and low-density lipoprotein oxidation”, 1998, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 5181–5187.

-
- ⁴³ A. Petroni, M. Blasevich, M. Salami, N. Papini, G. F. Montedoro e C. Galli, 1995, "Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic component of olive oil", *Thrombosis Research*, 78, 151–160.
- ⁴⁴ G. Bisignano, A. Tomaino, R. Lo Cascio, G. Crisafi, N. Uccella, e A. Saija, 1999, "On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51, 971–974.
- ⁴⁵ A.S. Stasinakis, I. Elia, A.V. Petalas, C.P. Halvadakis, "Removal of total phenols from olive-mill wastewater using an agricultural by-product, olive pomace", 2008, *Journal of Hazardous Materials*, 160, 408–413.
- ⁴⁶ E. De Marco, M. Savarese, A. Paduano, R. Sacchi, "Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters", 2007, *Food Chemistry*, 104, 858–867.
- ⁴⁷ M. Fekia, N. Allouchea, M. Bouaziza, A. Gargoubia, S. Sayadi, "Effect of storage of olive mill wastewaters on hydroxytyrosol concentration", 2006, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 108, 1021–1027.
- ⁴⁸ R. Briante, M. Patumi, F. Febbraio, R. Nucci, "Production of highly purified hydroxytyrosol from *Olea europaea* leaf extract biotransformed by hyperthermophilic β -glycosidase", 2004, *Journal of Biotechnology*, 111, 67–77.
- ⁴⁹ G. Ciafardini and B.A. Zullo, "Microbiological activity in stored olive oil", 2002, *International Journal of Food Microbiology*, 75, 111 –118.
- ⁵⁰ G. Limousin, J.-P. Gaudet, L. Charlet, S. Szenknect, V. Barthe`s, M. Krimissa, "Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement", 2007, *Applied Geochemistry*, 22, 249-275.
- ⁵¹ M.A. Abdullah, L. Chiang, M. Nadeem, "Comparative evaluation of adsorption kinetics and isotherms of a natural product removal by Amberlite polymeric adsorbents", 2009, *Chemical Engineering Journal*, 146, 370–376.
- ⁵² E.F. Gris, E.A. Ferreira, L.D. Falcao, M.T. Bordignon-Luiz, "Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts in model systems", 2007, *Food Chemistry*, 100, 1289-1296.
- ⁵³ Q. Liu, W. Cai, X. Shao, "Determination of seven polyphenols in water by high performance liquid chromatography combined with preconcentration", 2008, *Talanta*, 77, 679-683.

-
- ⁵⁴ M.A. Abdullah, L. Chiang, M. Nadeem, “Comparative evaluation of adsorption kinetics and isotherms of a natural product removal by Amberlite polymeric adsorbents”, 2009, *Chemical Engineering Journal*, 146, 370-376.
- ⁵⁵ X. Zhang, A. Li, Z. Jiang, Q. Zhang, “Adsorption of dyes and phenol from water on resin adsorbents: Effect of adsorbate size and pore size distribution”, 2006, *Journal of Hazardous Materials*, B137, 1115-1122.
- ⁵⁶ H.J. Zhong, M. A.K. Williams, D.M. Goodall, M.E. Hansen, “Capillary electrophoresis studies of pectins”, 1998, *Carbohydrate Research*, 308, 1-8.
- ⁵⁷ R. Verhoef, Y. Lu, J.P. Knox, A.G. J. Voragen, H.A. Schols, “Fingerprinting complex pectins by chromatographic separation combined with ELISA detection”, 2009, *Carbohydrate Research*, 344, 1808-1817.
- ⁵⁸ C. Romero, M. Brenes, P. García, and A. Garrido, “Optimization of Simulated Ripe Olive Darkening in Presence of Manganese”, 2008, *Food Chemistry and Toxicology*, 65, 254-258.
- ⁵⁹ L. Setti, E. Ansaloni, D. Zanichelli, “Secondary chemical building blocks from novel biorefining of agrifood wastes for a future bio-based industrial chemistry”, 2008, 6th International Conference ORBIT 2008, 12th-15th of October, Wageningen, Weimar, Germany. pp 1157-1164.
- ⁶⁰ D. Zanichelli, F. Carloni, E. Hasanaj, N. D’Andrea and L. Setti, “Production of Ethanol by an Integrated Valorization of Olive Oil Byproducts: The Role of Phenolic Inhibition”, 2007, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 14(1), 5-6.
- ⁶¹ D. Di Gioia, L. Sciubba, L. Setti, F. Luziatelli, M. Ruzzi, D. Zanichelli and F. Fava, “Production of biovanillin from wheat bran”, 2007, *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 598-505.
- ⁶² C. Lequart, J.M. Nuzillard, B. Kurek, P. Debeire, “Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides”, 1999, *Carbohydrate Research*, 319, 102–111.
- ⁶³ D.J. Paulson, R.L. Wilson and D. Spatz, “Crossflow membrane technology and its applications”, 1984, *Food Technol.*, 111, 77–87.
- ⁶⁴ K.A. Sims and M. Cheryan, Continuous saccharification of corn starch in a membrane reactor. Part I, II”, 1992, *Starch/Stärke*, 44(9), 341–348.
- ⁶⁵ A. Grzeoekowiak-Przyweckaa, L. Slomińska, “Continuous potato starch hydrolysis process in a membrane reactor with tubular and hollow-fiber membranes”, 2005, *Desalination*, 184, 105–112

-
- ⁶⁶ A.M. Boudet, "Towards and understanding of the supramolecular organization of the lignified wall", in THE PLANT CELL WALL Annual Plant Reviews, 2003, 8, 155-182.
- ⁶⁷ C. B. Faulds, B. Bartolomé, G. Williamson, "Novel biotransformations of agro-industrial cereal waste by ferulic acid esterases", 1996, *Industrial Crops and Products*, 6, 367-374.
- ⁶⁸ L. Yu, K. Zhou, J. W. Parry, "Inhibitory effects of wheat bran extracts on human LDL oxidation and free radicals", 2005, *LWT*, 38, 463-470.
- ⁶⁹ A. Wen, P. Delaquis, K. Stanich, P. Toivonen, "Antilisterial activity of selected phenolic acids", 2003, *Food Microbiology*, 20, 305-311.
- ⁷⁰ A. Saija, A. Tomaino, D. Trombetta, A. De Pasquale, N. Uccella, T. Barbuzzi, D. Paolino, F. Bonina, "In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents", 2005, *International Journal of Pharmaceutics*, 199, 39-47.
- ⁷¹ S. Sakai, H. Ochiai, K. Nakajima, K. Terasawa, "Inhibitory effect of ferulic acid on macrophage inflammatory protein-2 production in a murine macrophage cell line raw264.7", 1997, *CYTOKINE*, 9, 242-248.
- ⁷² A. Suzuki, D. Kagawa, A. Fujii, R. Ochiai, I. Tokimitsu, and I. Saito, "Short- and Long-Term Effects of Ferulic Acid on Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats", 2002, *AJH*, 15, 351-357.
- ⁷³ Y.Z. Hou, J. Yang, G.R. Zhao, Y.J. Yuan, "Ferulic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation induced by angiotensin II", 2004, *European Journal of Pharmacology*, 499, 85-90.
- ⁷⁴ Z. Zhang, T. Wei, J. Hou, G. Lia, S. Yu, W. Xin, "Iron-induced oxidative damage and apoptosis in cerebellar granule cells: attenuation by tetramethylpyrazine and ferulic acid", 2003, *European Journal of Pharmacology*, 467, 41-47.
- ⁷⁵ Bernini R., Mincione E., Barontini M., Provenzano G., Setti L. "Obtaining of 4-vinylphenols by decarboxylation of natural cinnamic acids under microwave irradiation", 2007, *Tetrahedron*, 63, 9663-9667.
- ⁷⁶ V. Kitprechavanich, M. Hayashi, S. Nagai, "Purification and properties of endo-1,4-beta-xylanase from *Humicola lanuginosa*", 1984, *J. Ferment. Technol.* 62, 415-420.
- ⁷⁷ P. Rapp and F. Wagner, "Production and properties of xylan-degrading enzymes from *Cellulomonas uda*", 1986, *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 746-752.
- ⁷⁸ Bailey M.J., Biely P., Poutanen K., "Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity", 1992, *Journal of Biotechnology*, 23, 257-270.

-
- ⁷⁹ J. Szendefy, G. Szakacs, L. Christopher, "Potential of solid-state fermentation enzymes of *Aspergillus oryzae* in biobleaching of paper pulp" , 2006, *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1354 – 1360.
- ⁸⁰ E.-M. Dusterhoft, V. A. J. M. Linssen, A. G. J. Voragen, G. Beldman, "Purification, characterization, and properties of two xylanases from *Humicola insolens*" , 1997, *Enzyme and Microbial Technology*, 20, 437 – 445.
- ⁸¹ Marianna Turkiewicz, Halina Kalinowska, Maria Zielin´ ska, Stanislaw Bielecki, "Purification and characterization of two endo-1,4-b-xylanases from Antarctic krill, *Euphausia superba* Dana" , 2000, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 127, 325–335.
- ⁸² L. He, G. F. Bickerstaff, A. Paterson and J. A. Buswell, "Purification and partial characterization of two xylanases that differ in hydrolysis of soluble and insoluble xylan fractions" , 1993, *Enzyme and Microbial Technology*, 15, Issue 1, 13-18.
- ⁸³ B.P. Lavarack, G.J. Griffin, D. Rodman, "Measured kinetics of the acid-catalysed hydrolysis of sugar cane bagasse to produce xylose" , 2000, *Catalysis Today*, 63, 257–265.
- ⁸⁴ O. Turunen, M. Vuorio, F. Fenel, M. Leisola, " Engineering of multiple arginines into the Ser/Thr surface of *Trichoderma reesei* endo-1,4-beta-xylanase II increases the thermotolerance and shifts the pH optimum towards alkaline pH" , 2002, *Protein Eng.* 15, 141-145.
- ⁸⁵ J. Jaenis, J. Rouvinen, P. Vainiotalo, O. Turunen, V.L. Shnyrov, "Irreversible thermal denaturation of *Trichoderma reesei* endo-1,4-beta-xylanase II and its three disulfide mutants characterized by differential scanning calorimetry" , 2008, *Int. J. Biol. Macromol.* 42, 75-80
- ⁸⁶ U. Blum, B. R. Dalton and J. R. Shann, "Effect of ferulic and p-cumaric acids in nutrient culture of cucumber leaf expansion as influenced by pH" , 1985, *Journal of Chemical Ecology*, 11, 1567-1582.
- ⁸⁷ T. Masuda, Y. Nishimura, M. Tonegawa, K. Kitahara, S. Arai , J. Yamashita, N. Takai, "High-performance liquid chromatographic separation of carbohydrates on stationary phases prepared from polystyrene-based resin and tertiary amines. Effect of chemical structure of anion-exchange sorbents" , 1999, *Journal of Chromatography A*, 845, 401–408.
- ⁸⁸ T. Masuda, K. Kitahara, Y. Aikawa, S. Arai, "High-performance liquid chromatographic separation of carbohydrates on a stationary phase prepared from

polystyrene-based resin and novel amines”, 2002, *Journal of Chromatography A*, 961, 89–96.

⁸⁹ T. Masuda, K. Kitahara, Y. Aikawa, S. Arai, “Determination of Carbohydrates by HPLC-ECD with Novel Stationary Phase Prepared from Polystyrene-Based Resin and Tertiary Amines”, 2001, *Analytical Science*, 17, i895-i898.

⁹⁰ A. Schiebera, P. Hilt, P. Streker, H. U. Endre, C. Rentschler, R. Carle, “A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace”, 2003, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4, 99–107.

⁹¹ L. Majid Jahangir and O. Samuelson, “Chromatography in aqueous solution on styrene-divinylbenzene resins”, 1980, *Journal of Chromatography A*, 193, 197-206.

⁹² <http://www.brenda-enzymes.org>

⁹³ M. Li, Y. Zhao, S. Zhou, W. Xing, “Clarification of raw rice wine by ceramic microfiltration membranes and membrane fouling analysis”, 2010, *Desalination*, 256, 166–173.

⁹⁴ A. Vernhet, M. Moutounet, “Fouling of organic microfiltration membranes by wine constituents: importance, relative impact of wine polysaccharides and polyphenols and incidence of membrane properties”, 2002, *Journal of Membrane Science*, 201, 103–122.

⁹⁵ V. Jegatheesan, D.D. Phong, L. Shu, R. Ben Aim, “Performance of ceramic micro- and ultrafiltration membranes treating limed and partially clarified sugar cane juice”, 2009, *Journal of Membrane Science*, 327, 69–77.

⁹⁶ M. Prisciandaro, G. Mazziotti di Celso, “Back-flush effects on superficial water ultrafiltration”, 2010, *Desalination*, 256, 22–26

⁹⁷ R. Sondhi, R. Bhave, “Role of backpulsing in fouling minimization in crossflow filtration with ceramic membranes, 2001, *Journal of Membrane Science*, 186, 41–52.

⁹⁸ M. F.A. Goosen, S.S. Sablani, and R. Roque-Malherbe, “Membrane Fouling: Recent Strategies and Methodologies for Its Minimization”, 2008, *Handbook of Membrane Separations*, capitolo 11, 325-341.

⁹⁹ D. Zhang, Y. Hamazu, “Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and its antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking”, 2004, *Food Chemistry*, 88, 503-509.

¹⁰⁰ www.phenbiox.it

¹⁰¹ B. Kamm, M. Kamm, “Principles of biorefineries”, 2004, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 137–145.

-
- ¹⁰² S. Achterholt, H. Priefert, A. Steinbüchel, "Identification of *Amycolatopsis* sp. strain HR167 genes, involved in the bioconversion of ferulic acid to vanillin", 2000, *Appl Microbiol Biotechnol*, 54, 799-807.
- ¹⁰³ T. Ho Kim, C. Gi Han and C. Kun Song, "Instability of threshold voltage under constant bias stress in pentacene thin film transistors employing polyvinylphenol gate dielectric", 2008, *Thin Solid Films*, 516, 6, 1232-1236.
- ¹⁰⁴ Folin & Ciocalteu, "On tyrosine and triptophan determination in protein", V 1927, *Journal of biological chemistry*, 73, 627-650.
- ¹⁰⁵ Bailey M.J., Biely P., Poutanen K., "Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity", *Journal of Biotechnology*, 23, 257-270, 1992
- ¹⁰⁶ Chaplin M.F., Kennedy J.F., Colorimetric assay, *Carbohydrate analysis*, 1986.
- ¹⁰⁷ Mecozzi M., Acquistucci R., Amici M, Cardilli D., "Improvement of an ultrasound assisted method for the analysis of total carbohydrate in environmental and food samples", *Ultrasonics Sonochemistry*, 2002, vol. 9, 219-223.
- ¹⁰⁸ Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, Division of Biochemistry, University of Minnesota.
- ¹⁰⁹ Bradford, M.M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry* 72, 248-254, 1976.