

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**

Tesi di Laurea Magistrale

**Idrolisi della sansa di mela: confronto tra
diverse metodologie per la produzione di
un substrato da utilizzare per crescita
algale**



Relatori

prof.ssa Debora Fino
dott.ssa Silvia Fraterrigo Garofalo

Candidato

Martina Diana

Marzo 2024

*A mamma, papà e Anita,
mi estrella polar*

Indice

Indice delle figure	6
Indice delle tabelle	8
1. Introduzione.....	10
1.1.1 Dalla produzione allo scarto	11
1.2 Potenzialità della Sansa di Mela (SM)	15
1.3 L'alga Spirulina (AS).....	16
1.4 Vortex, la startup	17
1.4.1 Naste, il brand	18
1.5 Stato dell'arte	20
1.5.1 Utilizzo della SM	20
1.5.2 Coltivazione dell'AS.....	21
1.6 Scopo della tesi.....	22
2. Materiali e Metodi.....	23
2.1 Composti utilizzati	23
2.2 Caratterizzazione matrice	23
2.2.1 Contenuto di umidità	23
2.2.2 Ceneri	24
2.2.3 Proteine.....	25
2.2.4 Lipidi	25
2.2.5 Fibre	26
2.2.6 Carboidrati.....	26
2.3 Metodi di idrolisi.....	27
2.3.1 Idrolisi acida.....	27
2.3.2 Idrolisi basica	28
2.3.3 Idrolisi ad acqua subcritica.....	29
2.3.4 Idrolisi enzimatica	30
2.3.4.1 Saggio di Bradford	31
2.4 Caratterizzazione idrolizzati.....	32
2.4.1 Resa	33
2.4.2 Polifenoli totali.....	33
2.4.2.1 Calibrazione acido gallico	33
2.4.2.2 Determinazione TPC	35
2.4.3 Oligoelementi	35
2.4.4 Zuccheri.....	35
3. Risultati	37

3.1 Caratterizzazione matrice	37
3.2 Caratterizzazione idrolizzati.....	38
3.2.1 Risultati idrolisi acida.....	41
3.2.2 Risultati idrolisi basica	43
3.2.3 Risultati idrolisi ad acqua subcritica	44
3.2.4 Risultati idrolisi enzimatica.....	47
3.3 Confronto idrolisi	48
3.4 Confronto risultato idrolisi	53
4. Conclusioni.....	57
5. Riferimenti bibliografici	58

Indice delle figure

Figura 1.1 Anatomia della mela	10
Figura 1.2 Produzione di mele in UE per stato membro	11
Figura 1.3 Suddivisione dei rifiuti alimentari dell'UE-28 nel 2012 per settore; comprende alimenti e parti non commestibili associate agli alimenti	12
Figura 1.4 Costi associati con lo spreco alimentare per settore (valori in miliardi di euro)	13
Figura 1.5 Composizione nutritiva SM e mela intera, da fonte, dati rielaborati	16
Figura 1.6 Prodotti Mela Naste Beauty	18
Figura 1.7 Prodotti nocciola Naste Beauty.....	19
Figura 1.8 Linea spirulina Naste Beauty & ApuliaKundi	19
Figura 1.9 Potenzialità della SM nell'industria farmaceutica, da fonte.....	21
Figura 2.1 Sansa di mela essiccata	23
Figura 2.2 Residuo campione valutazione ceneri.....	24
Figura 2.3 Schema del principio base del metodo di Dumas, tratto dalla fonte	25
Figura 2.4 Strumentazione Soxhlet utilizzata per l'estrazione dei lipidi	26
Figura 2.5 Estratto liquido idrolisi acida.....	28
Figura 2.6 Estratto liquido idrolisi basica	29
Figura 2.7 Reattore batch pressurizzato Figura 2.8 Estratto idrolisi enzimatica prefiltrazione idrolisi ad acqua subcritica	30
Figura 2.9 Estratto liquido idrolisi enzimatica	31
Figura 2.10 Retta di taratura saggio di Bradford.....	32
Figura 2.11 Retta di calibrazione GA.....	34
Figura 3.1 Retta di taratura HPLC gruppo A	39
Figura 3.2 Retta di taratura HPLC gruppo B	39
Figura 3.3 Retta di taratura HPLC gruppo C	40
Figura 3.4 Grafico analisi HPLC idrolisi acida.....	40
Figura 3.5 Effetto di vari trattamenti di idrolisi acido-base trattamento sugli zuccheri riducenti della crusca di frumento, figura da fonte	42
Figura 3.6 Effetto di vari trattamenti di idrolisi acido-base trattamento sugli zuccheri riducenti della crusca di frumento, figura da fonte	44
Figura 3.7 Grafico di dispersione che rappresenta le rese di glucosio e fruttosio [g kg _{db} ⁻¹] nella frazione liquida dopo SubH ₂ O, figura da fonte	46
Figura 3.8 Dati sperimentali e curve calcolate per resa di monosaccaridi da LC tramite SWH a diverse temperature. Exp, dati sperimentali, Calc, curva calcolata, dati da fonte	47

Figura 3.9 Concentrazione degli zuccheri rilasciati a diversi intervalli di tempo per reattore batch miscelato con aria compressa a temperatura ambiente; carico iniziale di substrato 2 % secco p/, figura da fonte	48
Figura 3.10 Biomassa media di AS nei diversi terreni di coltura, dati da fonte	56

Indice delle tabelle

Tabella 1.1 Da fonte, stime residui annui nel settore agricolo e agroindustriale nazionale	14
Tabella 2.1 Campioni e risultati standard saggio di Bradford.....	32
Tabella 2.2 Campioni diluiti di GA a diverse concentrazioni.....	34
Tabella 2.3 Standard diluiti zuccheri HPLC	36
Tabella 3.1 Caratterizzazione matrice	37
Tabella 3.2 Caratterizzazione matrice, dati di letteratura	37
Tabella 3.3 tempi di eluizione standard zuccheri	38
Tabella 3.4 Risultati idrolisi acida.....	41
Tabella 3.5 Confronto valori glucosio SME - Bucce di Durian.....	42
Tabella 3.6 Risultati idrolisi basica	43
Tabella 3.7 Risultati idrolisi ad acqua subcritica	44
Tabella 3.8 Risultati idrolisi enzimatica.....	47
Tabella 3.9 Confronto metodi di idrolisi su matrice lignocellulosica, dati da fonte	52
Tabella 3.10 Risultati zuccheri idrolisi normalizzati	53
Tabella 3.11 Composizione terreno di coltura Zarrouk, dati da fonte	54
Tabella 3.12 Composizione terreno di coltura CFTRI, dati da fonte	54

1. Introduzione

1.1 La mela

La mela (*Malus domestica*) è un frutto e albero domesticato della famiglia delle rose, originaria delle zone temperate del globo; è uno dei frutti più prodotti e consumati a livello mondiale [1]. Si ritiene che la mela oggi coltivata sia stata addomesticata a partire da una mela selvatica originaria dell'Asia centrale da circa 4000-10000 anni. Da lì in poi si è diffusa in Europa occidentale lungo la Via della Seta e si è ibridata con diverse specie di *Malus* diffuse in varie parti d'Europa [2].

Nel corso dei secoli sono state selezionate le qualità migliori che sono poi state riconosciute come varietà distinte. In Europa, prima della colonizzazione delle Americhe, erano già riconosciute centinaia di varietà e quando gli insediamenti coloniali si spostarono in Nord America, furono accompagnati dalla distribuzione di varietà di mele da semina nel nuovo continente.

Nella prima metà del XXI secolo, a livello mondiale, si posizionano come maggiori produttori Cina, Stati Uniti e Turchia; per quanto riguarda la produzione in Italia, si posiziona, in Europa, al secondo posto a seguito della Polonia, come maggior produttore [3].

La mela è un frutto carnoso, in cui possiamo distinguere la zona del mesocarpo ovvero la polpa, l'endocarpo, ovvero la zona del torsolo contenente i semi e infine l'epicarpo che costituisce la buccia esterna del frutto (vedi **Fig. 1.1**). Al momento della raccolta, le mele sono solitamente tondeggianti, hanno un diametro di circa 10 cm e le tonalità possono variare dal rosso al giallo, e alcune varietà presentano una buccia di colore verde; variano in dimensioni, forma e acidità a seconda della varietà che differiscono ampiamente tra di loro non solo per colore e dimensioni ma anche in quanto ad aroma, consistenza e sapore [2].

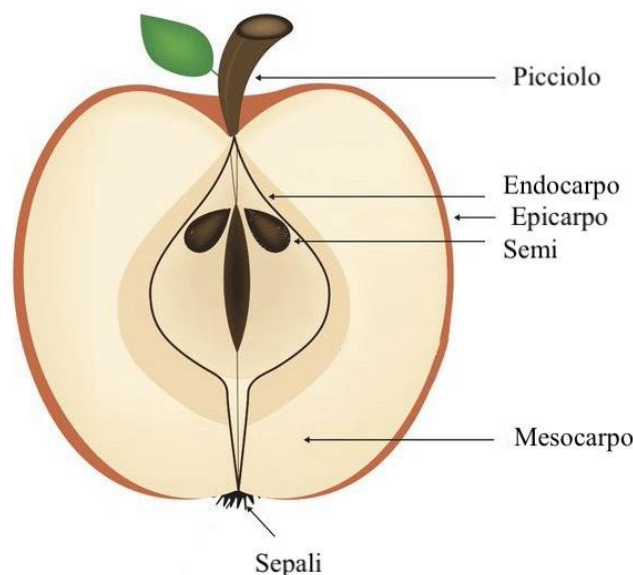


Figura 1.1 Anatomia della mela

Le mele sono tra le maggiori fonti di sostanze fotochimiche e antiossidanti all'interna della dieta umana. La composizione chimica delle mele varia, dipendendo dalla cultivar, dalla regione di

produzione e dalle pratiche orticole. In confronto con altri tipi di frutta, la mela, contiene quantità significanti di proteine e lipidi e risulta essere anche una buona fonte di fibre solubili, specialmente di pectina. [1].

1.1.1 Dalla produzione allo scarto

Ogni anno nel mondo vengono prodotti approssimativamente 70 milioni di tonnellate di mele [1]. L'Italia, in Europa, si assesta come secondo maggiore produttore negli ultimi anni (vedi Fig. 1.2).

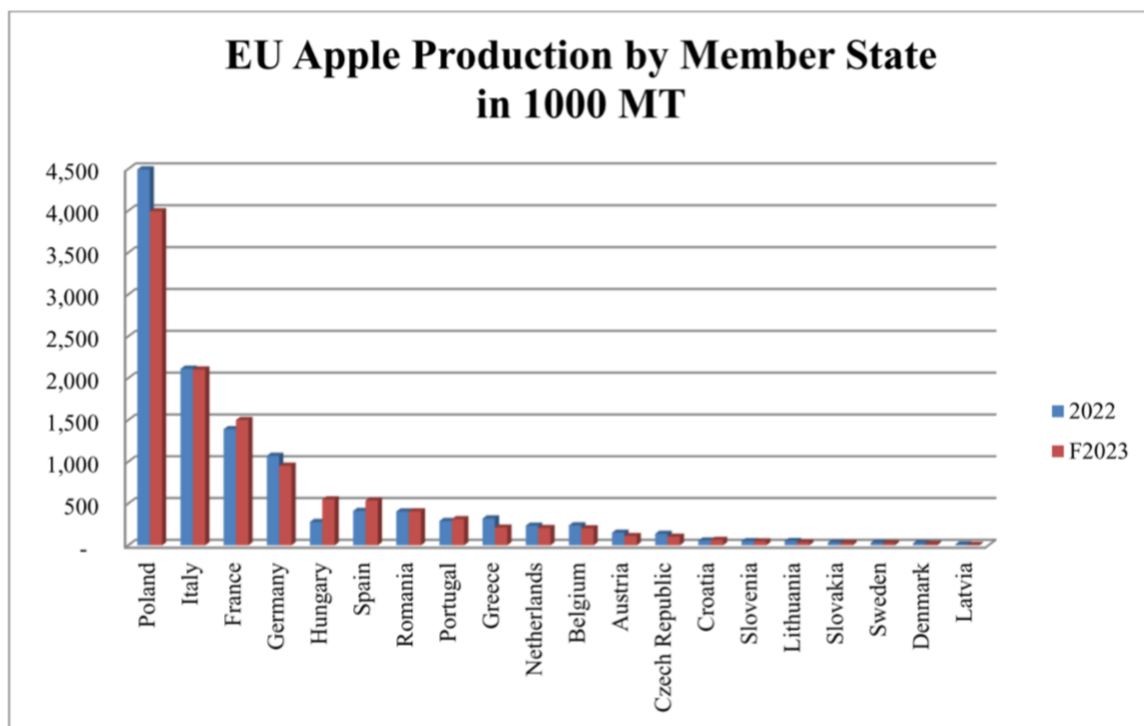


Figura 1.2 Produzione di mele in UE per stato membro [3]

La produzione totale definitiva di mele in Italia nel 2023, si assesta a 2.174.674 tonnellate, un valore leggermente superiore a quello dell'anno scorso. Della produzione totale la percentuale destinata alla trasformazione industriale diminuisce leggermente mentre aumenta, di poco, la disponibilità di mele per il mercato fresco[4].

La mela, oltre al suo consumo come frutto fresco, viene destinata, come sopra citato, alla trasformazione industriale, dove il suo maggiore impiego è destinato alla produzione di succhi di frutta e succhi di frutta concentrati. Ad oggi la mela rappresenta il frutto dominante nella produzione di succhi di frutta in quanto viene utilizzato non solo allo scopo di ottenere succhi di frutta di mela ma anche come dolcificante per altri succhi di frutta che risultano avere un livello zuccherino inferiore, evitando quindi di impiegare zuccheri raffinati. Questo suo vasto consumo è dovuto anche alla grande reperibilità del frutto stesso, permessa dagli elevati numeri di produzione durante tutto l'anno.

I succhi di frutta sono prodotti principalmente utilizzando lavorazioni meccaniche; nel momento della scelta della materia da lavorare per la produzione dei succhi, oltre alla selezione

della varietà, ove ciascuna presenta un rapporto zuccheri/acidità particolare, è importante andare a scegliere un frutto che risulti maturo e sano. Il livello di maturazione del frutto influisce direttamente sulle caratteristiche organolettiche, che si presenteranno anche sul prodotto finito, e sulla quantità di sostanza secca che determinerà la quantità di succo ottenibile. Inoltre, anche se il frutto è eccessivamente maturo, il processo di pressatura risulterà difficoltoso e inefficiente.

La produzione di succhi di frutta appartiene a quel settore dell'industria che produce un elevato quantitativo di sottoprodotti in rapporto con il quantitativo iniziale di materia lavorata, in particolare per questo determinato settore è stimata una produzione di circa il 25% di sottoprodotti. Per quanto riguarda la mela i principali sono la sansa, la buccia e i semi, dove la sansa risulta essere il più importante sottoprodotto ottenuto dalla trasformazione della mela.[manca citazione]

I sottoprodotti, per definizione, non sono rifiuti. Ad oggi è riconosciuta come una categoria non menzionata nelle prime direttive Europee sui rifiuti ed attualmente regolamentata a livello comunitario dall'art. 5 della WFD e a livello nazionale dall'art. 184-bis del D.lgs. n. 4/2001. 184-bis del D.lgs. n. 152/2006, di fatti, si tratta di una deroga alla regola generale, a condizione che vengano rispettate alcune direttive presentate nella definizione. Rimane, tuttavia, un certo margine d'interpretazione nella distinzione tra rifiuti e sottoprodotti; è da evidenziare però che la proposta di direttiva Europea contenuta nel pacchetto dell'economia circolare presenta una proposta a livello giuridico dei sottoprodotti al fine di renderne la definizione, e quindi la successiva applicazione, più semplice [5].

Lo spreco alimentare non si limita all'industria di processo, e quindi alla produzione di sottoprodotti, ma avviene a più livelli della nostra società. Come si può osservare nella **Fig. 1.3** oltre all'industria di processo il maggiore contributo di perdita di cibo avviene all'interno delle abitazione domestiche a cui seguono la produzione, i servizi di ristorazione ed infine il commercio all'ingrosso e al dettaglio. Lo scarto alimentare, perciò, non si limita solo alla produzione di sottoprodotti ma comprende anche tutti quegli alimenti che per ragioni estetiche non raggiungono in mercato.

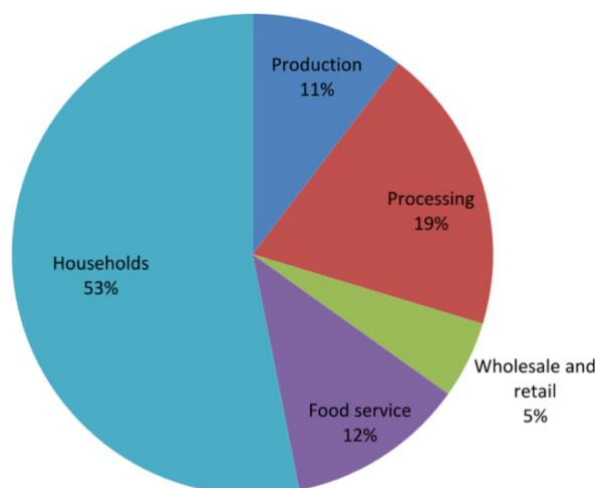


Figura 1.3 Suddivisione dei rifiuti alimentari dell'UE-28 nel 2012 per settore; comprende alimenti e parti non commestibili associate agli alimenti [6]

Secondo i dati pubblicati dalla FAO ad oggi circa 690 milioni di persone nel mondo soffrono la fame, nonostante ciò, la perdita e gli sprechi alimentare non sembrano diminuire

significativamente, si ha infatti che circa un terzo dei prodotti alimentari a livello mondiale, viene perso nel passaggio tra produttore e consumatore. A questo fenomeno possono essere associate tante cause, tra cui l'errata manipolazione, l'inadeguatezza delle modalità di trasporto e/o immagazzinamento, un'errata catena del freddo, l'esistenza di norme sull'aspetto estetico esterno, infine all'assenza di capacità di pianificazione e competenze culinarie tra i consumatori [7].

La riduzione di sprechi alimentari offre molteplici vantaggi alla persona e al pianeta, migliorerebbe la sicurezza alimentare, si andrebbe ad affrontare il cambiamento climatico, si risparmierebbe denaro [8], lo spreco alimentare genera infatti, non solo una perdita tangibile di cibo ma anche una perdita a livello economico (vedi **Fig. 1.4**).

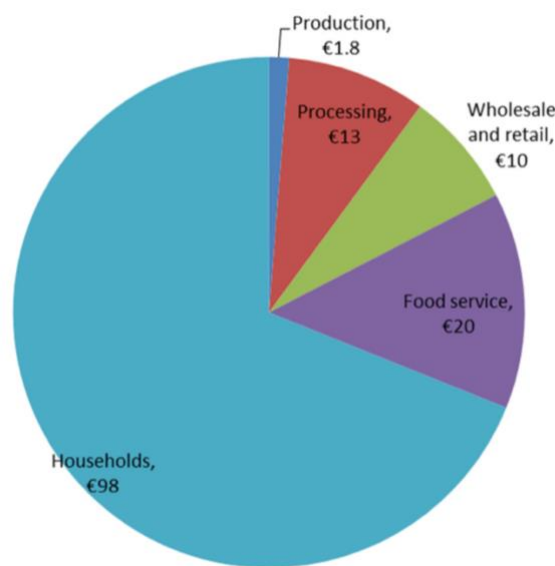


Figura 1.4 Costi associati con lo spreco alimentare per settore (valori in miliardi di euro) [6]

Inoltre, si ridurrebbero le pressioni su terra, acqua, biodiversità e sistemi di gestione dei rifiuti. Eppure, questo potenziale è stato finora poco sfruttato.

L'obiettivo di sviluppo sostenibile 12.3 (SDG 12.3) prevede l'impegno a dimezzare gli sprechi alimentari e ridurre le perdite di cibo lungo le catene di approvvigionamento. A questo scopo è stato redatto un rapporto sull'indice dello spreco alimentare che mira a far progredire i progressi dell'SDG in due modi.

In primis presenta la raccolta più completa ad oggi di dati sullo spreco alimentare, generando una stima dello spreco alimentare a livello globale che permette di ottenere una nuova visione dell'entità del problema e del sostanziale potenziale di prevenzione nei diversi Paesi.

In secondo luogo, questo rapporto pubblica una metodologia che consente ai singoli Paesi di misurare lo spreco alimentare, a livello di famiglie, servizi di ristorazione e vendita al dettaglio, al fine di monitorare i progressi nazionali verso il 2030 (Agenda 2030). I Paesi che utilizzano questa metodologia produrranno prove solide per guidare una strategia nazionale di prevenzione dello spreco alimentare, stime dello spreco alimentare sufficientemente sensibili

da rilevare i cambiamenti nello spreco alimentare su intervalli di due o quattro anni e che consentono confronti significativi tra i Paesi a livello globale [8].

A livello nazionale ed internazionale esistono quindi delle proposte mirate al fine di raggiungere questo obiettivo, tra le principali troviamo:

2015, a livello internazionale: Sviluppo dell'Agenda 2030 delle Nazioni Unite in particolare con l'SDG sopra citato. Lo scopo è "entro il 2030 dimezzare lo spreco alimentare globale a livello di vendita al dettaglio e dei consumatori e ridurre le perdite di cibo durante le catene di produzione e di fornitura, comprese le perdite del post-raccolto".

2016, Unione Europea: vengono adottate conclusioni che delineano iniziative per ridurre gli sprechi alimentari e si invitano gli Stati Membri a:

- Migliorare il monitoraggio e la raccolta dati;
- Concentrarsi sulla prevenzione delle perdite, invitando ad un maggiore utilizzo delle biomasse;
- Facilitare la donazione dei prodotti alimentari invenduti, al fine di garantire una maggiore sicurezza alimentare.

2016; Italia: a seguito dell'invito promosso dal Consiglio Europeo, in Italia è stata emanata la *Legge 19 agosto 2016, n° 166* nota con il nome Legge Gadda. La legge ha come scopo quello di ridurre gli sprechi per ciascuna delle fasi di produzione, trasformazione, distribuzione attraverso la facilitazione del recupero e nella donazione delle eccedenze alimentari, promuovendone il riutilizzo e riciclo.

Successivamente, nel 2018 e 2020 sono state condotte due valutazioni sui progressi effettuati. Da queste valutazioni si è potuto delineare quanto il tema dello spreco/perdita alimentare sia un tema centrale nella valutazione anche di altre tematiche come quello dei cambiamenti climatici. Per questo motivo il tema è stato inserito nel Green Deal Europeo mentre a livello nazionale fa parte degli obiettivi per la transizione ecologica [7].

Volendo dare uno sguardo alla situazione degli sprechi in Italia, secondo un'analisi di Federalimentare, nel 2017 la dimensione dei sottoprodotti derivanti dall'industria agroalimentare è stata rilevante: essi hanno rappresentato, in media, il 2-3% dell'intero volume dei prodotti "secchi" ed il 7-10% dei prodotti "umidi". I sottoprodotti considerati comprendono i residui delle operazioni di campo (paglie, patate, stocchi, ecc.) e gli scarti dell'industria agroalimentare derivanti dalla trasformazione di materie prime agricole (sanse, vinacce, pastazzo, borlande, lolla, ecc.) (vedi **Tab. 1.1**) [9].

Tabella 1.1 Da fonte, stime residui annui nel settore agricolo e agroindustriale nazionale

AREA	RESIDUI		
	Agricoli (t/anno)	Agroindustria (t/anno)	Totali (t/anno)
ITALIA	21.894.588	3.077.377	24.971.965

È proprio all'interno di questo rinnovamento dell'economia volto alla riduzione degli sprechi alimentari che nasce e prende forma l'economia circolare, avendo alla base l'idea del ricircolo

e del riutilizzo di sottoprodotti dell'industria al fine di potergli dare nuovo valore e reimmetterli all'interno del mercato.

1.2 Potenzialità della Sansa di Mela (SM)

La sansa di mela (SM) è il principale sottoprodotto della lavorazione industriale delle mele e ad oggi risulta essere un'importante risorsa per applicazione in diversi settori dell'industria tra cui alimentare, agricolo e biotecnologico.

La sansa di mele è principalmente costituita dalla buccia, residui di polpa, semi e gambi, in varie proporzioni dipendendo dalla metodologia impiegata per la lavorazione. Un'analisi dettagliata ne rivela una composizione complessa, che comprende umidità, grassi, proteine, ceneri, carboidrati, amidi e zuccheri totali, oltre alla presenza di minerali essenziali, quali calcio potassio e magnesio [1]. Notoriamente la SM contiene quantità significative di pectina, rendendola una preziosa risorsa per l'estrazione della stessa. Inoltre, è ricca di composti bioattivi come polifenoli, acido clorogenico e quercetina, che contribuiscono al suo valore nutrizionale e ne determinano le sue potenziali proprietà benefiche[10]. Inoltre, andando a confrontare i macronutrienti della sansa di mela rispetto a quelli del frutto intero, risulta che per tutte le classi i valori contenuti dalla SM sono superiori a quelli della mela in sé (vedi **Fig. 1.5**), questo è dovuto al fatto che si riescono ad ottenere tutti i nutrienti contenuti all'interno dei semi, che consumando il frutto fresco vengono invece scartati.

L'utilizzo della sansa di mela ha superato il suo tradizionale destino come rifiuto, ricercatori e industrie stanno infatti esplorando modi alternativi per andare ad utilizzarla sfruttando le sue potenzialità. Tra le sue applicazioni principali vi sono l'utilizzo per la produzione di integratori o additivi alimentari e alimenti funzionali, dovute al suo alto contenuto di fibre e composti bioattivi [11]. Inoltre, la sansa di mela ha trovato impiego anche all'interno dell'industria farmaceutica in quanto risulta essere materia d'interesse per l'estrazione di preziosi composti con proprietà antiossidanti, antinfiammatorie e antimicrobiche [12]. In agricoltura risulta essere una grande risorsa per l'alimentazione del bestiame perché fornisce nutrienti essenziali e fibra alimentare che permette di migliorare la salute degli animali. Infine, la SM può essere utilizzata per la produzione di biogas, la generazione di biocarburanti ma in generale contribuendo alle fonti di energia rinnovabile e alle pratiche di gestione sostenibile dei rifiuti.

La volontà di andare a riutilizzare la sansa di mela risiede anche nelle altrimenti problematiche pratiche di smaltimento. Questo, infatti, presenta diverse sfide ambientali, in particolare se si tratta di sistemi aperti come discariche o bacini. La fermentazione della SM, che è spontanea, risulta nel rilascio di metano e altri gas serra che contribuiscono al cambiamento climatico e al degrado ambientale [11]. Inoltre, si può avere contaminazione di corpi idrici con materia organica e nutrienti derivanti dalla sua decomposizione che può portare all'inquinamento delle acque. Per mitigare l'inquinamento prodotto dallo smaltimento dell'SM, come citato precedentemente, questa viene sempre di più riutilizzata trattandosi di una materia con elevate potenzialità. Inoltre, l'adozione di sistemi a ciclo chiuso e di approcci di bioraffinazione può migliorare l'efficienza delle risorse e ridurre al minimo la produzione di rifiuti, promuovendo un'economia circolare e la sostenibilità ambientale.

La ricerca futura dovrebbe quindi focalizzarsi sull'ottimizzazione dell'utilizzo della sansa di mela andando a migliorarne le tecniche di estrazione per l'estrazione di composti di valore e potenziando le pratiche per la gestione dei rifiuti. Dando priorità alla sostenibilità, all'innovazione e alla collaborazione interdisciplinare, si può sbloccare il pieno potenziale della

sansa di mele e creare un sistema alimentare più sostenibile e resiliente per le generazioni future.

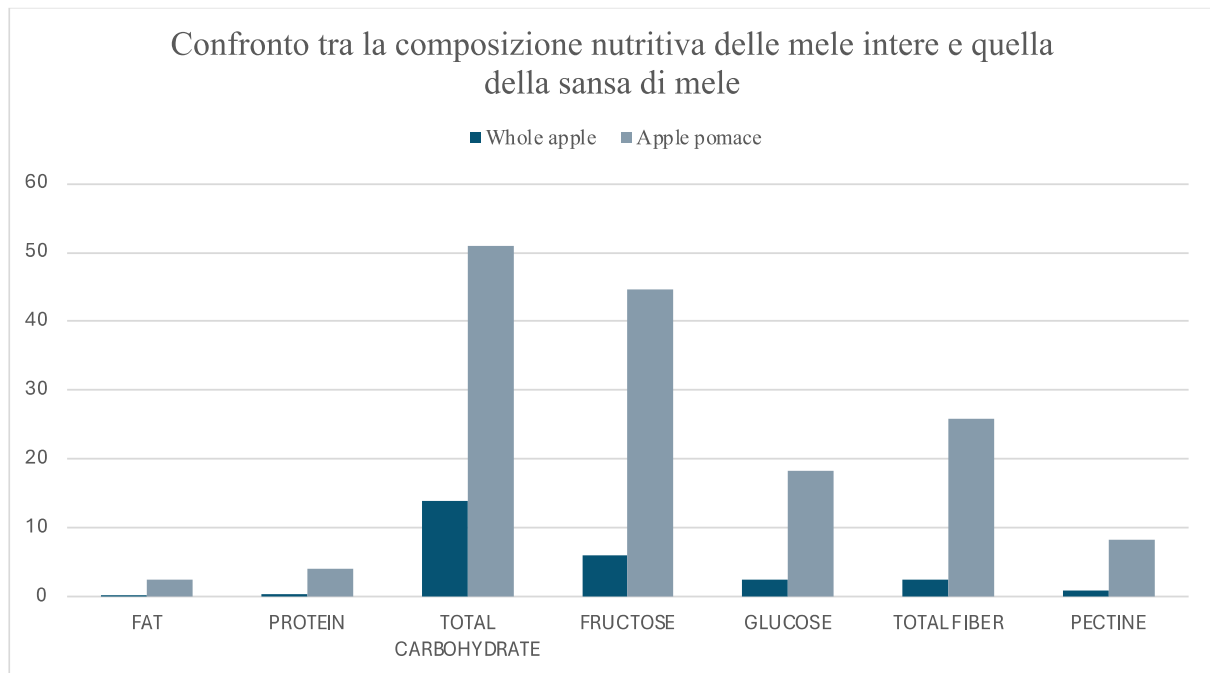


Figura 1.5 Composizione nutritiva SM e mela intera, da fonte, dati rielaborati [11]

1.3 L'alga Spirulina (AS)

La Spirulina è un tipo di alga blu-verde la cui importanza non è da riscontrare solo nel periodo moderno ma mette le sue radici già in antichità, questa è infatti riconosciuta come una delle più antiche forme di vita sulla terra [13]. Attrae l'attenzione del mondo scientifico e non per il suo notevole profilo nutrizionale e le svariate applicazioni e potenziali benefici per la salute [14]. La Spirulina è scientificamente classificata come cianobatterio multicellulare filamentoso caratterizzato da un particolare colore verde-blu, è fotosintetica; quindi, autotrofa ed è caratterizzata da filamenti di forma elicoidale, chiamati tricomi che si mantengono solo in ambiente liquido o in un terreno di coltura [15].

L'ambiente ideale per la sua crescita è un ambiente in condizioni alcaline, con livelli di pH compresi tra 9 e 11, il che la rende adatta alla coltivazione in laghi stagni e vasche alcaline, anche se non è limitata unicamente a queste condizioni [13].

La composizione della spirulina si distingue per l'elevato contenuto proteico che può raggiungere il 70% del suo peso secco; oltre alle proteine, l'AS contiene vitamine, minerali, aminoacidi e acidi grassi essenziali, che la rendono un prezioso integratore alimentare per l'uomo e per gli animali [14].

Per la coltivazione della spirulina vengono impiegate diverse tecniche che possono essere suddivise in due grandi gruppi: i sistemi aperti, come stagni e laghi, e i sistemi chiusi come i bioreattori fotovoltaici. I sistemi aperti offrono semplicità e costi contenuti, ma sono suscettibili di contaminazione da parte di altri microrganismi e richiedono un attento monitoraggio e pratiche di gestione per garantire la purezza. Al contrario, i bioreattori chiusi offrono un maggiore controllo sui parametri ambientali, tra cui l'apporto di anidride carbonica, la temperatura, l'intensità della luce fornita, il pH e lo scambio di gas, importanti parametri che

permettono di ottimizzare le condizioni di crescita, inoltre il sistema chiuso permette di ridurre al minimo i rischi di contaminazione. Risulta importante avere un'elevata purezza nella colture, questo perché, nonostante la Spirulina non produca sostanze nocive, altre specie di alghe blu-verdi ne producono per cui è necessario mantenerle separate dalla Spirulina anche in vista della sua commercializzazione, un sistema chiuso permette di avere un maggior controllo a riguardo. Le variabili di crescita come l'intensità della luce, la temperatura, il pH e la salinità possono avere un'influenza importante sul contenuto di lipidi e pigmenti nelle cellule di spirulina, che determina la composizione dei nutrienti nella biomassa di spirulina e dipende da questi parametri di crescita [13].

La disponibilità di nutrienti è fondamentale per la coltivazione della spirulina: carbonio, azoto, fosforo e micronutrienti che svolgono un ruolo chiave nel metabolismo e nella crescita. Tuttavia, il costo per i nutrienti dei terreni è spesso elevato, per cui per migliorare la sostenibilità della produzione, anche dal punto di vista economico, sono state studiate fonti di nutrienti efficaci dal punto di vista dei costi, come ad esempio l'utilizzo di acque di scarto con un doppio obiettivo quello di andare a ripulirle sfruttando la crescita dell'AS stessa.

1.4 Vortex, la startup

Vortex SRL SB è una start up italiana innovativa nata dalla volontà di dare nuova vita a sottoprodotti derivanti dall'industria agro-alimentare. L'obiettivo è quello di andare a valorizzare materie che sarebbero altrimenti destinate allo smaltimento ma che possiedono ancora un alto potenziale. Alla base del progetto è radicato il concetto di economia circolare attraverso la quale, si è impegnata sin dalla nascita nel panorama, inizialmente a livello prettamente regionale, per poi successivamente espandersi sul territorio Nazionale, andando a recuperare i già citati sottoprodotti alimentari e attraverso differenti processi industriali, trasformandoli in materie dall'alto valore aggiunto impiegabili all'interno dei settori pet, food, cosmetico, nutraceutico. Vortex è oggi presente sul mercato con il brand Naste Beauty e come rivenditore di materie (come le chiamo? perché non sono propriamente materie prime).

La start up nasce nel marzo del 2021 dall'unione delle idee di Lorenzo Picco e Simone Piccolo, il primo affonda la sua esperienza nell'azienda agricola "Magna Rosa" a Barge in provincia di Cuneo (Piemonte) con una particolare attenzione nei confronti della green economy e sostenibilità; S. Piccolo arriva invece da un percorso di studi legati a management e sostenibilità, trovando quest'ultima come punto di incontro.

La fondazione della startup arriva a seguito della precedente esperienza e grazie alla consapevolezza acquisita riguardo all'elevata produzione di sottoprodotti alimentari. Dalle mele raccolte in azienda, utilizzate per la produzione di succhi di frutta tramite spremitura a freddo, residuava una notevole quantità di materia prima destinata allo smaltimento; e così dalla presa d'atto di ciò L. in unione con S. Picco, unitamente alla collaborazione ed esperienza dell'azienda cosmetica Reynaldi SRL sono andati a sviluppare il primo ingrediente funzionale, a partire dalla sansa di mele, ad utilizzo cosmetico.

Da questa prima implementazione nasce il brand Naste Beauty che utilizza all'interno di formulazioni cosmetiche, materie provenienti da economia circolare, che, grazie alle tecnologie brevettate, oltre all'innovativo studio sulle stesse materie prime, ha permesso di sfruttare le ancora elevate proprietà benefiche non denaturate durante i processi di trasformazione. Vortex è inoltre impegnata a ridurre le emissioni di CO₂ utilizzando processi di lavorazione alimentati

da energie rinnovabili; ricerca, innovazione e sostenibilità sono le keywords alla base dei processi produttivi portati avanti quotidianamente.

1.4.1 Naste, il brand

Il brand, ad oggi ampliato, nasce con una prima linea per la cura del viso a base di sansa di mela 100% upcycled, composto inizialmente da 4 prodotti (vedi **Fig. 1.6**) e successivamente ampliata.



Figura 1.6 Prodotti Mela Naste Beauty

L'ingrediente principale di questa linea è la pasta di mele ottenuta a partire dalla sansa di mele, sottoprodotti dei succhi di frutta prodotti da mele certificate BIO. La sansa viene essiccata a temperature idonee alla non denaturazione dei composti bioattivi presenti naturalmente all'interno della mela e, attraverso una lavorazione alimentata da energia rinnovabile, otteniamo un ingrediente naturalmente antiossidante, ricco di sostanze nutritive e di composti bioattivi, in particolare polifenoli, fibre, vitamine e carotenoidi.

Successivamente si è andati a sviluppare due nuove linee andandosi leggermente ad allontanare dal mondo mela. La seconda linea sviluppata è una linea a base di nocciola, in particolare è

stato implementato l'utilizzo di farina disoleata di nocciola per andare a creare una linea per i capelli (vedi Fig. 1.7)



Figura 1.7 Prodotti nocciola Naste Beauty

Infine, l'ultima linea proposta torna ad avvicinarsi al mondo mela, proponendo un blend di pasta di mele e spirulina in collaborazione con ApuliaKundi SRL, originando una linea per la cura del corpo (vedi Fig. 1.8)



Figura 1.8 Linea spirulina Naste Beauty & ApuliaKundi

1.5 Stato dell'arte

1.5.1 Utilizzo della SM

Come presentato precedentemente, la sansa di mela è un sottoprodotto dell'industria con ampie potenzialità e ampi campi di implementazione, osserviamo più nel dettaglio in che ambiti è ad oggi utilizzata.

Utilizzo nell'industria alimentare

Nell'industria alimentare la SM risulta essere un ingrediente versatile in vari prodotti alimentari, ne possiamo vedere il suo utilizzo a partire da prodotti da forno, dove la sua aggiunta permette di andare ad aumentare le fibre del prodotto finito, oltre ad aggiungere aroma naturalmente; inoltre risulta essere un ottimo dolcificante naturale il che significa non dover ricorrere, o poterne abbassare il quantitativo, di zuccheri raffinati, nella produzione di torte, biscotti, snack... Inoltre, la sansa di mela è una fonte ricca di pectina e di composti fenolici, che trovano applicazione come agenti gelificanti, emulsionanti e antiossidanti naturali nei prodotti alimentari. I prodotti da forno arricchiti con la SM presentano attributi organolettici migliori e proprietà salutari, rispondendo alla crescente domanda di opzioni alimentari nutrienti e funzionali da parte dei consumatori [12]. Altra implementazione interessante della SM a livello food è quella dell'utilizzo nel cioccolato e nei suoi derivanti, risulta infatti che grazie alle sue proprietà antiossidanti permetta di mantenere meglio il prodotto senza degradarne però la qualità finale [16]

Valorizzazione di rifiuti e sostenibilità

Una delle prime applicazioni della SM che possiamo ritrovare in letteratura è legata all'uso della sansa per il compostaggio. Veniva prodotto, tramite l'utilizzo di microrganismi anaerobici un compost di alta qualità, che poteva essere considerato un valido sostituto dei fertilizzanti e un miglioratore della qualità del suolo. Uno studio più recente ha dimostrato che l'applicazione del compost di sansa di mela può migliorare la resa e l'accumulo di microelementi nel cavolo cinese piantato in un terreno tipicamente carente in zinco. Questo studio dimostra che l'applicazione della sansa di mele è vantaggiosa sia per la conservazione dell'azoto nel compost che per la qualità dei fertilizzanti. Inoltre, la SM viene utilizzata per la produzione di prodotti ad alto valore aggiunto come ad esempio i biocarburanti [1].

Industria farmaceutica

Come abbiamo già evidenziato la SM è ricca di composti bioattivi che estratti possono trovare largo e importante impiego all'interno dell'industria farmaceutica (vedi **Fig. 1.9**). La cellulosa può ad esempio essere utilizzata come eccipiente per le formulazioni, alcuni

oligosaccaridi possono essere utilizzati in probiotici, come anche la pectina trova largo interesse in questo settore dell'industria [12].

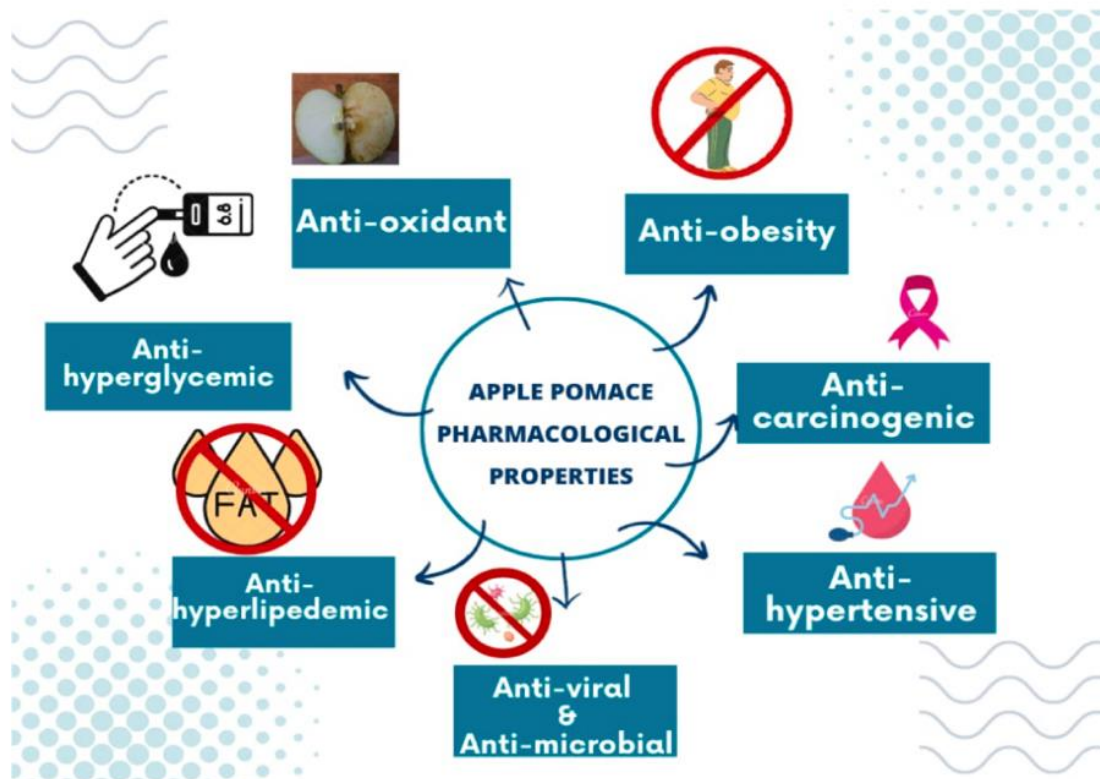


Figura 1.9 Potenzialità della SM nell'industria farmaceutica, da fonte[16]

Applicazione in processi microbici

Dato l'elevato contenuto di carboidrati nella sansa di mele, questa risulta essere un'interessante substrato per i processi microbici, che portano alla produzione di prodotti a valore aggiunto. Microrganismi come funghi e lieviti vengono utilizzati per fermentare la frazione di carboidrati della sansa di mele, con conseguente produzione di acidi organici, enzimi, proteine unicellulari, etanolo, bevande a basso contenuto alcolico e pigmenti.

Vediamo ora diversi esperimenti condotti al fine di coltivare AS in diverse condizioni del medium.

1.5.2 Coltivazione dell'AS

La coltivazione dell'Alga Spirulina come precedentemente citato avviene non solo attraverso l'impiego di acqua pura, al contrario, oggi giorno la coltivazione della Spirulina nelle acque reflue rappresenta una strada promettente per la produzione di biomasse, permettendo al contempo di rimuovere inquinanti organici e inorganici presenti nelle acque andando quindi a rimuovere lo step di purificazione delle stesse.

Utilizzo delle acque reflue di amido Sago

Un altro esperimento ha studiato il potenziale delle acque reflue di amido Sago (amido estratto dal midollo di diverse specie di palma) come medium di crescita per l'AS, queste sono

caratterizzate da un elevato rapporto C/N, per la coltivazione di alghe. È stata utilizzata la fermentazione anaerobica per migliorare la composizione dei nutrienti delle acque reflue, che hanno poi supportato la crescita di Spirulina. Il tasso di crescita specifico e la produttività della biomassa delle microalghe sono stati paragonabili a quelli osservati in ambiente inorganico, evidenziando l'idoneità delle acque reflue di amido Sago come fonte di nutrienti per la coltivazione di alghe.

Utilizzo delle acque reflue della fabbrica di noodle fermentati

Lo studio ha esplorato ulteriormente l'utilizzo delle acque reflue fermentate, in questo caso si tratta di acque provenienti da una fabbrica di noodle, come fonte di nutrienti per la coltivazione di Spirulina. Il terreno è stato modificato, sono stati aggiunti nitrati, fosfati, potassio e carbonato di sodio, questa modifica ha favorito una crescita ottimale delle microalghe. L'analisi della biomassa ha rivelato un elevato contenuto di clorofilla, proteine e ficocianine, proteine responsabili della colorazione tipica dall'AS, paragonabile a quello ottenuto con i terreni di coltura convenzionali. Questi risultati sottolineano il potenziale dell'utilizzo delle acque reflue industriali come fonte di nutrimento conveniente per la coltivazione delle alghe.[14]

Utilizzo di mele marce come terreno di coltura

Con un approccio nuovo, è stata studiata la mela marcia come terreno di coltura per Spirulina. Questo esperimento mira a esplorare substrati alternativi per la coltivazione delle alghe, riducendo, come citato nel capitolo 1.3, potenzialmente i costi di produzione e permettendo di gestire la materia che sarebbe destinata ai rifiuti, in maniera più consapevole e produttiva. I risultati preliminari suggeriscono che la mela marcia potrebbe servire come terreno di coltura vitale, fornendo i nutrienti essenziali per la crescita delle alghe. [17]

1.6 Scopo della tesi

Lo scopo di questo lavoro sperimentale è quello di andare ad effettuare il confronto tra diversi tipi di idrolisi a partire dalla sansa di mela essiccata proveniente da economia circolare. L'obiettivo è quello di definire se uno o più idrolizzati risultano essere idonei per l'utilizzo nel medium di coltura per la coltivazione di Alga Spirulina al fine di valutarne l'efficacia. L'utilizzo di un idrolizzato derivante da un sottoprodotto dell'industria alimentare, caratterizzato dal punto di vista di quantitativo di polifenoli, monosaccaridi e metalli, potrebbe permettere di coltivare l'alga spirulina in maniera innovativa, andando appunto a riutilizzare una materia che sarebbe altrimenti destinata allo smaltimento e possibilmente andando a rendere economicamente più sostenibile la realizzazione del medium di coltura, l'inserimento dei macronutrienti necessari alla crescita risulta infatti essere uno degli step più dispendiosi durante il processo di coltivazione.

2. Materiali e Metodi

2.1 Composti utilizzati

La biomassa utilizzata per portare avanti tutti gli esperimenti descritti in questo lavoro di tesi è la sansa di mela essiccata (SME) (vedi Fig. 2.1), sottoprodotto industriale della lavorazione della mela per la produzione di succhi di frutta tramite pressatura a freddo successivamente essiccata a 58°C, fornita da Vortex Startup S.R.L. I composti chimici utilizzati sono stati acquistati da Sigma-Aldrich e, come riportato in etichetta, presentano tutti un grado di purezza superiore al 99%.



Figura 2.1 Sansa di mela essiccata

2.2 Caratterizzazione matrice

Una prima analisi della matrice si è dedicata alla determinazione della composizione della stessa. Si è andati a valutare il contenuto di umidità, ceneri, proteine, lipidi, fibre e carboidrati.

In seguito, verranno descritte le metodologie per la determinazione di ciascuno.

2.2.1 Contenuto di umidità

La valutazione del contenuto di umidità è stata effettuata attraverso l'utilizzo di un metodo gravimetrico seguendo i "Metodi di analisi utilizzati per il controllo chimico degli alimenti" (Rapporti ISTISAN 96/34) approvato dall'Istituto Superiore di Sanità [18].

I campioni solidi, dopo essere stati pesati su bilancia analitica, vengono essiccati in stufa ad aria alla temperatura di 103°C per una notte. Questa operazione permette all'acqua residua nel

campione di evaporare, ottenendo così un campione totalmente secco ed utilizzando la (2.1) possiamo valutare il contenuto percentuale di umidità.

$$\text{Umidità \%} = \frac{(E-m)}{E} * 100 \quad (2.1)$$

Dove E rappresenta la massa iniziale, in grammi, del campione, e m è la massa, in grammi, del campione secco.

2.2.2 Ceneri

La valutazione delle ceneri segue anche essa i "Metodi di analisi utilizzati per il controllo chimico degli alimenti" (Rapporti ISTISAN 96/34) approvato dall'Istituto Superiore di Sanità, ed è anch'essa condotta impiegando un metodo gravimetrico. Il metodo prevede l'incenerimento di una aliquota del campione in analisi alla temperatura di $550 \pm 10^\circ\text{C}$ fino a completa combustione della sostanza organica ed al raggiungimento di una massa costante [18]. I campioni pesati vengono inseriti all'interno di un forno a muffola, la cui temperatura aumenta in maniera graduale, una volta raggiunto il set point di temperatura, indicato come $550 \pm 10^\circ\text{C}$ il campione rimane all'interno del forno per 4-6 ore durante le quali avviene la combustione completa del campione. Una volta terminata la combustione i campioni vengono fatti raffreddare per poi procedere con la pesata in modo da valutare il valore delle ceneri.

Il contenuto di ceneri, espresso in percentuale, viene calcolato tramite la (2.2).

$$\text{Ceneri \%} = \frac{m_1}{m_0} * 100 \quad (2.2)$$

Dove m_0 rappresenta la massa, in grammi, del campione d'analisi e m_1 la massa in grammi del residuo (vedi **Fig. 2.2**).



Figura 2.2 Residuo campione valutazione ceneri

2.2.3 Proteine

Per la valutazione delle proteine è stato impiegato il metodo Dumas, conosciuto anche con il nome di metodo di combustione; è un metodo primario di determinazione dell'azoto e delle proteine ufficialmente riconosciuto da AOAC, AACC, ISO, DIN, ASBC, AOCS, OIV [19].

Il campione pesato e omogeneizzato viene bruciato alla temperatura di 1000°C con l'aggiunta di ossigeno puro, viene prodotta una miscela costituita principalmente da acqua, biossido di carbonio, ossidi di azoto e azoto, che attraversa un gas di trasporto, generalmente costituito da elio. A questo punto la miscela attraversa una camera nella quale, attraverso l'impiego di rame, gli ossidi di azoto vengono ridotti ad azoto elementare, comportando la separazione di acqua e anidride carbonica. Il contenuto totale di azoto viene misurato attraverso un detector a conducibilità termica (TCD) che va a misurare la differenza di tensione che va a crearsi alla variazione della composizione della miscela [20]. Al fine di valutare il quantitativo percentuale di proteine è necessario utilizzare un fattore moltiplicativo convenzionale pari a 4,4 per cui la formula per il calcolo risulta essere la (2.3).

$$\text{Proteine \%} = N\% * 4,4 \quad (2.3)$$

Lo schema del processo di base del metodo Dumas è descritto in (Fig. 2.3)

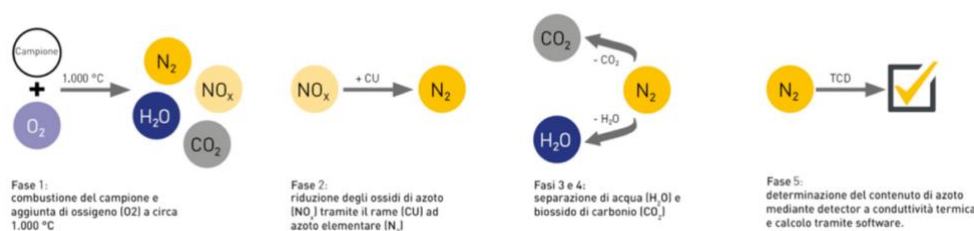


Figura 2.3 Schema del principio base del metodo di Dumas, tratto dalla fonte [20]

2.2.4 Lipidi

Per la determinazione dei lipidi sono stati seguiti i "Metodi di analisi utilizzati per il controllo chimico degli alimenti" (Rapporti ISTISAN 96/34) approvato dall'Istituto Superiore di Sanità, in particolare è stato utilizzato il metodo Soxhlet. Il campione essiccato e finemente macinato è stato pesato all'interno dei ditali da estrazione a cui poi è stata addizionata la stessa quantità di solfato di sodio anidro e miscelata con una bacchetta in vetro. La bacchetta è stata poi accuratamente pulita con un tampone di cotone sgrassato, utilizzato successivamente per coprire il campione all'interno del ditale. Il ditale è stato poi posto all'interno di un estrattore Soxhlet, vedi (Fig. 2.4), all'interno del quale è stata portata avanti l'estrazione tramite l'impiego di etere di petrolio durante 6-8 ore. L'estratto è stato raccolto nel pallone sottostante, e attraverso un evaporatore rotante è stato allontanato il solvente presente in miscela. Il pallone contenente il residuo è stato poi posto ad essiccare in stufa ad aria alla temperatura di 100°C, per poi procedere con la pesata e la determinazione dei lipidi una volta raffreddatosi il campione [18].

La quantità di lipidi è stata valutata tramite la (2.4):

$$\text{Lipidi \%} = \frac{P_{tot} - P}{M} * 100 \quad (2.4)$$

Dove P_{tot} è il peso in grammi del pallone contenente la materia grassa estratta, P è il peso in grammi del pallone vuoto e, infine, M è il peso in grammi del campione utilizzato per l'analisi.



Figura 2.4 Strumentazione Soxhlet utilizzata per l'estrazione dei lipidi

2.2.5 Fibre

La procedura per la determinazione delle fibre segue anch'essa i "Metodi di analisi utilizzati per il controllo chimico degli alimenti" (Rapporti ISTISAN 96/34) approvato dall'Istituto Superiore di Sanità, ed è stata eseguita seguendo lo standard del Kit Sigma-Aldrich per il saggio delle fibre alimentari totali impiegando una combinazione di metodi enzimatici e gravimetrici [21]. I campioni di sansa di mela essiccata vengono gelatinizzati attraverso l'impiego di α -amilasi stabile al calore, successivamente subisce una digestione enzimatica con proteasi e amiloglicosidasi con lo scopo di rimuovere dal campione proteine ed amido. Si ha l'aggiunta di etanolo che precipita le fibre solubili, il residuo viene poi filtrato ed essiccato. Da qui si ha la valutazione delle fibre dopo aver detratto proteine e ceneri attraverso la (2.5) [18].

$$\text{Fibra alimentare totale \%} = \frac{\frac{R_1 + R_2 - P - AB}{2}}{\frac{m_1 + m_2}{2}} * 100 \quad (2.5)$$

Dove P rappresenta la massa, in grammi, delle proteine, A la massa delle ceneri e B il bianco, R_1 e R_2 sono rispettivamente il risultato della prima e seconda pesata della massa del residuo, infine, m_1 e m_2 sono la prima e la seconda pesata della massa del campione.

2.2.6 Carboidrati

Il valore totale dei carboidrati è stato valutando seguendo i criteri previsti da FAO "Food energy - methods of analysis and conversion factors". La valutazione è condotta attraverso il calcolo per differenza piuttosto che analizzato direttamente. Secondo questo approccio vengono infatti valutati gli altri costituenti dell'alimento, le cui procedure di valutazione sono riportate nei

precedenti paragrafi, che vengono sommati e sottratti dal peso totale dell'alimento, questo dato ottenuto viene definito carboidrato totale ed è valutato secondo la (2.6) [22].

$$\text{Carboidrati \%} = 100 - \text{umidità \%} - \text{ceneri\%} - \text{proteine\%} - \text{lipidi\%} \quad (2.6)$$

Risulta importante sottolineare che il valore dei carboidrati così determinato include le fibre, così come alcuni componenti che non sono propriamente carboidrati, come ad esempio acidi organici.

2.3 Metodi di idrolisi

Come precedentemente descritto nel capitolo introduttivo lo scopo di questo lavoro di tesi è quello di andare a delineare le caratteristiche di diversi tipi di estratti al fine di poter valutarne l'utilizzo ottimale per la crescita dell'alga spirulina. Con questo obiettivo sono stati condotti quattro esperimenti di idrolisi di differente tipo che sono poi state caratterizzate dal punto di vista di contenuto in zuccheri, polifenoli e metalli.

Le idrolisi effettuate sono state idrolisi acida, idrolisi basica, idrolisi ad acqua subcritica e idrolisi enzimatica, le cui procedure sono descritte di seguito.

2.3.1 Idrolisi acida

Il primo tipo di estrazione effettuato è stato attraverso un'idrolisi acida secondo la procedura ottimale descritta S. Pal, J. Handa e U. K. Jain [23].

Per la prova è stato impiegato acido solforico diluito al 5%. È stata poi pesata un'aliquota di SME andando ad unirli ad un dato volume di soluzione acida all'interno di un pallone in vetro, in proporzioni 1:10 mg/mL. Il pallone immerso in un bagno di olio silconico è stato poi posto su una piastra riscaldante magnetica che ha permesso di condurre la prova di idrolisi alla temperatura di 100°C per la durata di due ore. La temperatura è stata misurata attraverso l'utilizzo di una sonda di temperatura e lo slurry all'interno del pallone è stato agitato tramite l'inserimento di un'ancoretta magnetica che ha favorito il mass transfer e facilitato quindi l'estrazione.

Alla fine delle due ore, il campione è stato rimosso dal bagno caldo e fatto raffreddare. Una volta raggiunta temperatura ambiente, tramite l'impiego di una pompa da vuoto si è andati a filtrare l'estratto in modo da ottenere una fase liquida (vedi **Fig. 2.5**) priva di sostanze disperse residue che potesse essere successivamente analizzato, perciò è stato conservato in Falcon. La parte solida rimasta trattenuta dal filtro è stata poi essiccata al fine di utilizzarla per valutare la resa dell'estrazione tramite questo tipo di idrolisi.



Figura 2.5 Estratto liquido idrolisi acida

2.3.2 Idrolisi basica

La seconda tipologia di idrolisi effettuata è stata quella basica, anch'essa condotta secondo le condizioni ottimali e i parametri descritti da S. Pal, J. Handa e U.K. Jain [23].

In questo caso il solvente utilizzato è stato l'idrossido di sodio diluito al 5%. All'interno di un pallone di pyrex sono stati miscelati un'aliquota di SME e un dato volume di solvente in rapporto 1:10 mg/mL. L'idrolisi è stata condotta in condizioni di agitazione, ottenute attraverso l'impiego di un'ancoretta magnetica posta all'interno del pallone, alla temperatura di 100°C mantenuta utilizzando una sonda di temperatura in un bagno di olio silconico su una piastra riscaldante magnetica. Il pallone è rimasto all'interno del bagno per due ore e poi è stato rimosso e fatto raffreddare.

Anche in questo caso come per l'idrolisi acida, una volta raggiunta la temperatura ambiente, il campione è stato filtrato utilizzando una pompa da vuoto andando così a separare il residuo solido, utilizzato poi, una volta essiccato per la valutazione della resa dell'esperimento, e una fase liquida (vedi **Fig. 2.6**), conservata all'interno di Falcon, su cui sono poi stati effettuati gli esperimenti per la caratterizzazione.



Figura 2.6 Estratto liquido idrolisi basica

2.3.3 Idrolisi ad acqua subcritica

Per quanto riguarda l'esperimento condotto per l'idrolisi ad acqua subcritica, è stato fatto riferimento alla procedura descritta in J. Pains, V. Benedetti, L. Menin, M. Baratieri, and F. Patuzzi [24].

L'idrolisi è stata svolta all'interno di un reattore batch pressurizzato attraverso elio (vedi **Fig. 2.7**), provvisto di termocoppia per la misurazione della temperatura operativa e con un trasduttore relativo alla pressione. Il sistema di riscaldamento consisteva di una camicia termostata regolata tramite un controllore PID.

Per la prova è stata pesata un'aliquota di SME miscelata con un volume di acqua in rapporto 1:30, l'esperimento è stato poi condotto alle condizioni operative di $T=100^{\circ}\text{C}$ e $p=10$ bar per la durata di 30 minuti.

Una volta terminato il ciclo il reattore è stato vuotato e l'idrolizzato lasciato raffreddare fino a temperatura ambiente. Una volta portato a temperatura, risultando particolarmente denso, il campione è stato centrifugato in modo da facilitare la successiva filtrazione. Il campione post-centrifugazione e prefiltrazione si presenta come riportato in **Fig. 2.8**.

Come per le precedenti idrolisi il campione ottenuto è stato filtrato tramite l'impiego di una pompa da vuoto, così separando il residuo solido, utilizzato per valutare la resa dell'idrolisi, e l'estratto liquido successivamente caratterizzato.



Figura 2.7 Reattore batch pressurizzato



Figura 2.8 Estratto idrolisi enzimatica
prefiltrazione idrolisi ad acqua subcritica

2.3.4 Idrolisi enzimatica

L'ultima prova di idrolisi condotta è stata un'idrolisi enzimatica tratta da R. Gama, J. S. Van Dyk, and B. I. Pletschke [25].

In questo caso sono stati utilizzati due differenti enzimi in rapporto volumico 50:50 con una concentrazione totale di 0,076 mg/ml. Essendo due enzimi liquidi, al fine di determinare la quantità necessaria per raggiungere la concentrazione necessaria, è stato necessario determinare tramite *saggio di Bradford* [26] la concentrazione di proteine di partenza di ciascuno degli enzimi.

Una volta valutato il quantitativo di proteine e quindi la concentrazione di ciascun enzima, si è andati a creare una soluzione acquosa contenente entrambi (Vizcozyme L, Cellucast 1.5L) a cui è stata miscelata un'aliquota di SME in concentrazione 0,5% (w/v) all'interno di un matraccio in pyrex.

L'idrolisi è stata condotta in condizioni di agitazione, andando ad inserire nel matraccio un'ancoretta magnetica, e a temperatura ambiente per 24h. Importante evidenziare come la prova sia stata condotta a temperatura ambiente senza necessità di fornire calore esternamente, questo perché nello studio di R. Gama et al. è stata verificata l'attività degli enzimi a differenti temperature stabilendo la possibilità di operare a temperatura ambiente (25°C) in quanto non si presentavano variazioni rilevanti.

Una volta terminato il tempo della prova, l'idrolizzato è stato filtrato come nei precedenti esperimenti con l'utilizzo di una pompa da vuoto separando il residuo solido dall'estratto liquido (vedi Fig. 2.9).

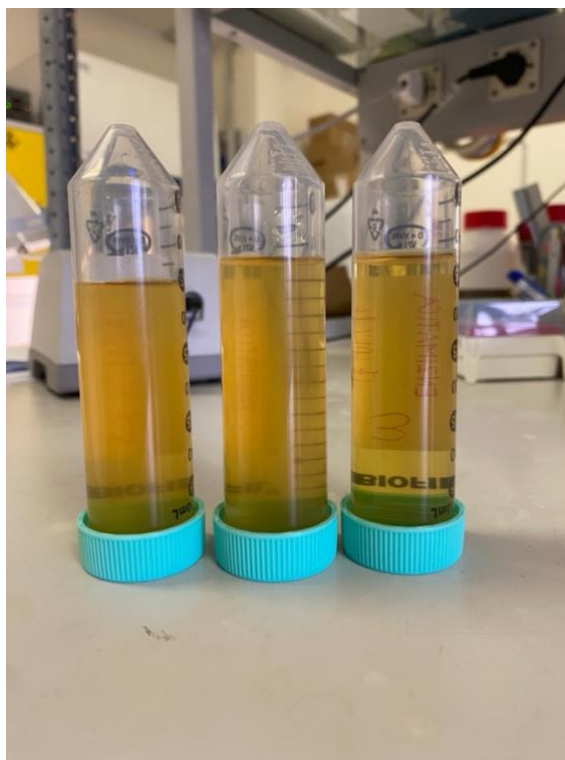


Figura 2.9 Estratto liquido idrolisi enzimatica

2.3.4.1 Saggio di Bradford

Il saggio proteico di Bradford anche noto come saggio di Bradford è un metodo cromatografico che permette la determinazione delle proteine in una soluzione. Nel caso di studio specifico è stato effettuato su due enzimi liquidi, di cui non si conosceva la concentrazione del contenuto proteico, impiegati poi per l'idrolisi enzimatica per la quale era necessario conoscere il contenuto proteico degli enzimi impiegati.

La procedura si basa sulla formazione di un complesso tra il colorante utilizzato, il Brilliant Blue G, e le proteine in soluzione. La soluzione assume una colorazione blu-stra la cui intensità dipende dalla quantità di proteine presenti, maggiore è la concentrazione più intenso risulta il colore blu. In particolare, il complesso colorante-proteina provoca una variazione dell'assorbanza che si sposta da 465 nm a 595 nm, e l'assorbanza stessa dipende dalla quantità di proteina presente.

La valutazione della concentrazione delle proteine diventa quindi possibile andando a definire una retta di taratura attraverso l'analisi di una proteina come standard, in particolare è stata utilizzata la BSA (bovine serum albumine). Sono stati preparati 6 campioni a diversa concentrazione di BSA, da ciascuno sono stati prelevati 100 μ L e uniti a 3 mL di reagente di Bradford, è stato preparato anche un bianco dove al posto di 100 μ L di campione è stata utilizzata una quantità equivalente di acqua.

Si è andati poi ad analizzare i 6 campioni in uno spettrofotometro UV-Vis a 590 nm, i valori ottenuti per ciascun campione (vedi **Tab 2.1**) hanno permesso di costruire la retta di taratura (**Fig. 2.10**).

Tabella 2.1 Campioni e risultati standard saggio di Bradford

Campione	Concentrazione standard BSA (mg/mL)	Campione (mL)	Reagente di Bradford (mL)	Assorbanza (590 nm)
A	2	0,1	3	0,842
B	1	0,1	3	0,339
C	0,5	0,1	3	0,164
D	0,25	0,1	3	0,089
E	0,1	0,1	3	0,019
F	0,05	0,1	3	0,009

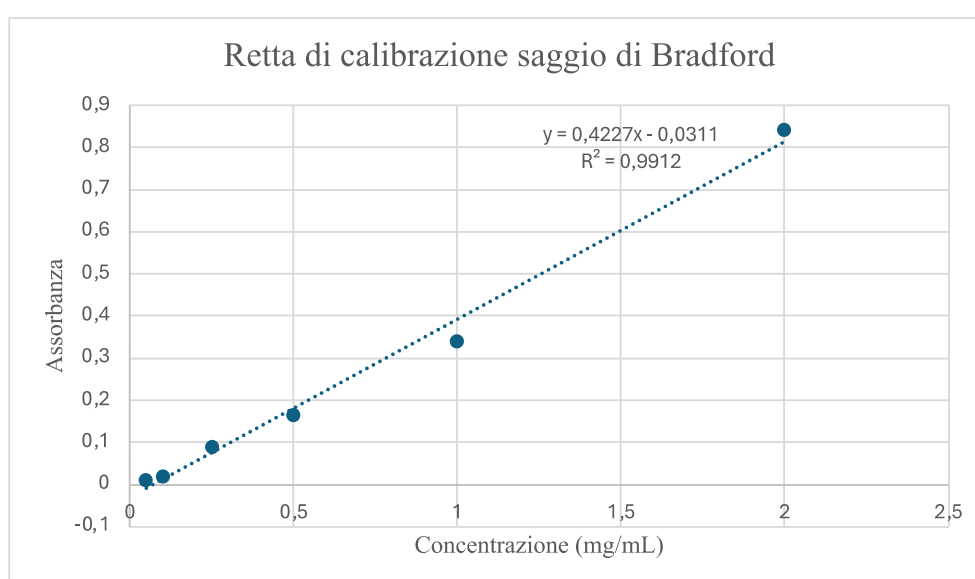


Figura 2.10 Retta di taratura saggio di Bradford

Questa retta è stata poi utilizzata per la determinazione della concentrazione delle proteine negli enzimi Viscozyme e Cellulase. Si è andati a preparare per ciascun enzima 4 campioni a diverse concentrazioni, come per la valutazione dei valori per la retta di taratura è stata prelevata per ciascun campione una quantità pari a 0,1 mL a cui sono stati aggiunti 3mL di reagente di Bradford. Lasciati riposare per un'ora i campioni sono poi stati analizzati allo spettrofotometro UV-Vis a 590 nm per andare a collezionare i risultati ottenuti.

Utilizzando l'equazione della linea di tendenza (riportata nel grafico) con ascissa la concentrazione e ordinata l'assorbanza valutiamo i valori della concentrazione corrispondenti alle assorbanze valutate per Viscozyme e Cellulase.

2.4 Caratterizzazione idrolizzati

Gli estratti liquidi ottenuti tramite i quattro diversi esperimenti di idrolisi, illustrati nei paragrafi precedenti, sono stati caratterizzati e sono state valutate la resa, i polifenoli, i metalli e gli zuccheri secondo le procedure qui sotto descritte.

2.4.1 Resa

La resa di ciascuna prova di idrolisi è stata valutata attraverso la quantificazione del residuo solido separato dall'estratto liquido tramite filtrazione.

Conoscendo la quantità di SME utilizzata per condurre ciascun esperimento e pesando il filtro prima di utilizzarlo nella filtrazione si può valutare la percentuale di sansa disciolta (SD) durante la prova rispetto al campione iniziale, andando a fare essiccare il residuo solido e applicando la (2.7).

$$SD \% = \frac{c-(r-f)}{c} * 100 \quad (2.7)$$

Dove c, è il peso in grammi del campione di SME utilizzato nella prova, r è il peso del residuo secco più il peso del filtro (in quanto non vengono separati per evitare una perdita di residuo) ed f è il peso del filtro.

2.4.2 Polifenoli totali

Per la quantificazione dei polifenoli totali (TPC) dagli estratti di SME si è fatto riferimento alla procedura prevista dalla normativa ISO 14502-1:2005 (E) [27]. Si è utilizzato un metodo colorimetrico che prevedeva l'impiego del reagente Folin-Ciocalteu.

Il reagente contiene infatti acidi fosfotungstici che operano come agenti ossidanti, producendo un colore blu, dovuto alla formazione di blu di tungsteno e molibdeno, a seguito dell'ossidazione dei gruppi idrossilici fenolici con un ampio assorbimento massimo a 765 nm.

In particolare, si ha che il reagente fenolico di Folin-Ciocalteu reagisce con un'ampia gamma di composti polifenolici e, utilizzando l'acido gallico come standard di calibrazione è possibile ottenere dati sul contenuto di polifenoli totali.

Per la prova sono stati utilizzati 0,5 mL di estratto liquido, utilizzato a diverse diluizioni, a cui sono stati miscelati 2,5 mL di reagente di Folin-Ciocalteu (10% v), dopo aver atteso tra i 3 e gli 8 minuti, sono stati addizionati 2,5 mL di una soluzione di carbonato di sodio Na₂CO₃ (7,5% w/v). Le falcon utilizzate sono state agitate per favorire la miscelazione e lasciate riposare per un'ora a temperatura ambiente e lontano dalla luce. Allo stesso modo il procedimento è stato ripetuto per un'ulteriore campione dove reagenti sono stati aggiunti ad acqua distillata, ottenendo così il bianco necessario per la valutazione zero.

Una volta trascorsa l'ora necessaria alla reazione si può osservare una diversa colorazione nei campioni a diversa diluizione dipendente dalla concentrazione di polifenoli contenuta. Per ciascun campione è stata misurata l'assorbanza, tramite spettrofotometro UV-Vis, a 765nm. I valori sono stati tarati allo zero ottenuto tramite l'analisi del bianco e il TPC è stato calcolato a partire dalla curva di calibrazione ottenuta con l'acido gallico. Il risultato viene espresso in mg di acido gallico equivalente rispetto ai g di campione secco SME.

2.4.2.1 Calibrazione acido gallico

Per la retta di calibrazione per la valutazione del contenuto totale di polifenoli possono essere utilizzati l'acido gallico monoidrato o quello anidro, in questo caso è stato impiegato il monoidrato, ed è generalmente da preferire per la sua maggiore solubilità e per le sue ridotte proprietà igroscopiche. La retta è necessaria in quanto il TPC è espresso in quantità di acido gallico equivalente a partire dai valori di assorbanza registrati tramite spettrofotometro UV-Vis.

Si è proceduto andando a preparare una soluzione madre di acido gallico, pesando $0,110 \pm 0,001$ e miscelandolo in un matraccio da 100mL, andando poi a diluirlo con l'aggiunta di acqua distillata. A partire da questa soluzione madre sono state poi preparate 5 diverse soluzioni standard diluite di acido gallico a concentrazioni differenti (vedi **Tab. 2.2**)

Tabella 2.2 Campioni diluiti di GA a diverse concentrazioni

Campione	Volume GA (mL)	Volume H ₂ O (mL)	Volume totale (mL)	Concentrazione (µg/mL)
1	1,0	9,0	10	10
2	2,0	8,0	10	20
3	3,0	7,0	10	30
4	4,0	6,0	10	40
5	5,0	5,0	10	50

Per l'analisi in spettrofotometro è stato prelevato 0,5 mL di ciascuna soluzione standard diluita e inserito in una Falcon è stato poi preparato un bianco in cui è stato utilizzato 0,5 mL di acqua distillata, a ciascun campione sono poi stati aggiunti 2,5 mL di reagente di Folin-Ciocalteu (10% v), dopo aver atteso dai 3 agli 8 minuti sono stati aggiunti 2 mL della soluzione di carbonato di sodio Na₂CO₃ (7,5% w/v) e sono stati lasciati reagire per un'ora a temperatura ambiente, lontano dalla luce.

Sono poi stati analizzati tramite spettrofotometro Uv-Vis a 765 nm. I valori ottenuti sono stati utilizzati per creare la retta di calibrazione visibile in **Fig. 2.11**.

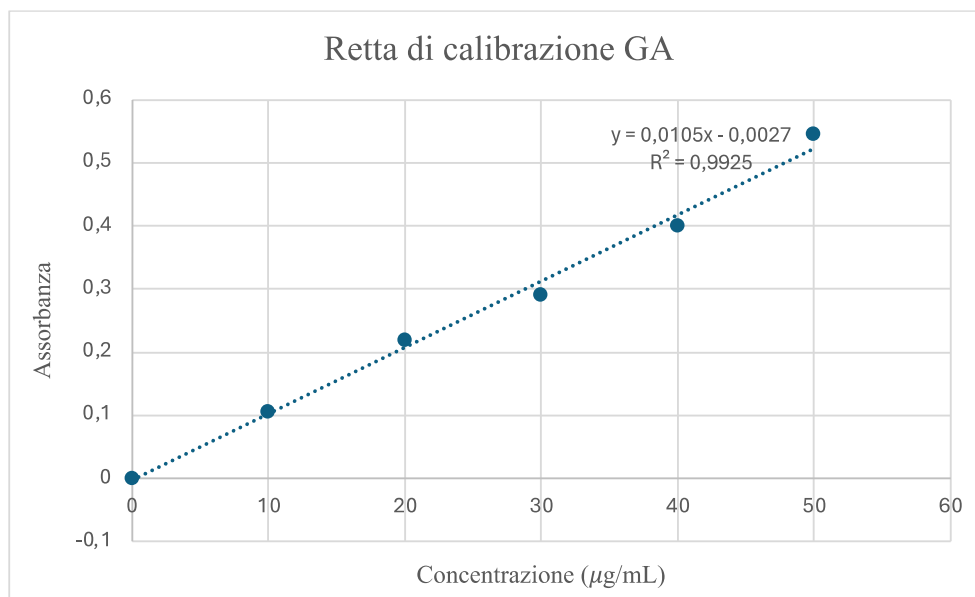


Figura 2.11 Retta di calibrazione GA

2.4.2.2 Determinazione TPC

L'ottenimento della retta di calibrazione ci permette di andare a valutare il TPC dei nostri estratti diluiti di SME.

Si valuta l'assorbanza (A) dei campioni diluiti come descritto nel paragrafo 2.4.2. È fondamentale che la densità ottica risulti nel range di calibrazione ottenuto nella retta di calibrazione, se così non fosse sarebbe necessario effettuare nuovamente l'analisi con una diluizione maggiore del campione, e in generale il risultato non deve essere maggiore di 1 in quanto non si potrebbe più affermare con certezza la linearità della relazione.

Si valuta ora la concentrazione di acido gallico equivalente contenuta nel campione espressa come $\mu\text{GAE}/\text{mL}$ note la pendenza della retta di calibrazione (m) e l'intercetta (q) utilizzando la relazione:

$$\frac{\mu\text{gGAE}}{\text{mL}} = \frac{A-q}{m} \quad (2.8)$$

Mentre i μgGAE vengono valutati andando a moltiplicare il volume di diluizione tramite la relazione (2.9)

$$\mu\text{gGAE} = \frac{\mu\text{gGAE}}{\text{mL}} * V_d \quad (2.9)$$

La concentrazione di GAE contenuta nel campione d'interesse ed espressa come $\mu\text{gGAE}/\text{mgSME}$ può essere valutata, noto il peso del campione secco di partenza, tramite la (2.10).

$$\text{TPC} \left(\frac{\mu\text{gGAE}}{\text{mgSME}} \right) = \frac{\mu\text{gGAE}}{\text{mgSME}} * V \quad (2.10)$$

Dove V è il volume in millilitri utilizzati nell'estrazione.

2.4.3 Oligoelementi

I campioni idrolizzati liquidi sono stati debitamente diluiti e analizzati tramite ICP-MS Thermo Fisher icapQ per la determinazione P, Mn, Fe e Mg. Ai risultati ottenuti si è andato a sottrarre il valore di questi oligoelementi presenti nell'acqua distillata utilizzata per l'idrolisi.

2.4.4 Zuccheri

Infine, per quanto riguarda la caratterizzazione degli estratti di SME è stato valutato il contenuto zuccherino con particolare interesse nei confronti del contenuto di glucosio, utilizzando come letteratura di riferimento "*Evaluation of Apple Pomace as a Raw Material for Alternative Applications in Food Industries*" [28].

L'analisi è stata portata avanti tramite l'impiego di HPLC con una colonna Resez acid Roa, HPLC shimatzu Nexera con rivelatore ad indice di rifrazione al fine di andare ad individuare i singoli analiti.

Al fine di poter fare ciò è stato necessario andare a definire gli standard in modo da conoscere, nel momento di analisi del campione liquido di SME, a cosa corrispondesse ciascun picco individuato dall'analisi in HPLC.

Sono stati individuati 7 zuccheri quali : Glucosio, Fruttosio, Xilosio, Galattosio, Acido malico, Arabinosio e Ramnosio al fine di definire gli standard, si è quindi andati a miscelare il reagente ad una concentrazione 5% v con acqua distillata; da queste soluzioni madre sono poi state

effettuate successive diluizioni per ottenere gli standard diluiti (vedi **Tab. 2.3**) da utilizzare all'interno dell'HPLC. La fase mobile utilizzata è L'H₂SO₄ con concentrazione 0,003 M, flusso 0,6 $\frac{ml}{min}$, la prova è stata condotta alla temperatura di 50°C con un'iniezione di 10 microlitri. L'HPLC mostra tre picchi principali: il primo per il glucosio, il secondo come somma di fruttosio, xilosio, galattosio, e acido malico ed il terzo come somma di Arabinosio e Ramnosio.

Tabella 2.3 Standard diluiti zuccheri HPLC

Campione	Volume Campione (mL)	Volume H₂O (mL)	Volume totale (mL)	Concentrazione (%)
A	10 (soluzione madre diluita)	0	10	5
B	2 (A)	8	10	1
C	1 (A)	9	10	0,5
D	1 (B)	9	10	0,1
E	1 (C)	9	10	0,05
F	1 (D)	9	10	0,01
G	1 (E)	9	10	0,005%

3. Risultati

3.1 Caratterizzazione matrice

Le analisi descritte al paragrafo 2.2 volte alla caratterizzazione della matrice sono state effettuate in triplicato andando ad ottenere 3 risultati di cui in **Tab. 3.1** sono stati riportati per ciascuna analisi il valore medio tra i tre ottenuti e la corrispondente deviazione standard.

Tabella 3.1 Caratterizzazione matrice

	%	Deviazione standard
Umidità	7,77	0,028E-02
Ceneri	1,66	0,002
Proteine	2,361	0,547
Lipidi	1,02	7,336E-05
Fibre	32,95	-
Carboidrati	87,19	0,498

I valori ottenuti, se confrontati con quelli presenti in letteratura (**Tab. 3.2**), risultano essere coerenti e affidabili.

Tabella 3.2 Caratterizzazione matrice, dati di letteratura [29]

	%	Riferimenti
Umidità	4,4	Wang et al. (2019) [30]
	5,8	Jin et al. (2002)[31]
	10,5	Jannati et al. (2018) [32]
	7,1	Ktenioudaki et al. (2013) [33]
Ceneri	1,8	Wang et al. (2019) [30]
	1,5	Jin et al. (2002)[31]
	2,5	Jannati et al. (2018) [32]
	1,7	Ktenioudaki et al. (2013) [33]
Proteine	3,8	Wang et al. (2019) [30]
	4,7	Jin et al. (2002)[31]
	1,2	Jannati et al. (2018) [32]
	2,4	Ktenioudaki et al. (2013) [33]
Lipidi	3,8	Wang et al. (2019) [30]
	4,7	Jin et al. (2002)[31]
	0,6	Jannati et al. (2018) [32]
	2,7	Ktenioudaki et al. (2013) [33]

Fibre	26,5	Wang et al. (2019) [30]
	ND ¹	Jin et al. (2002)[31]
	14,5	Jannati et al. (2018) [32]
	42,5	Ktenioudaki et al. (2013) [33]
Carboidrati	45,1	Wang et al. (2019) [30]
	83,8	Jin et al. (2002)[31]
	ND ¹	Jannati et al. (2018) [32]
	ND ¹	Ktenioudaki et al. (2013) [33]

¹: Dato Non Disponibile

É ben visibile che la matrice utilizzata è ricca di carboidrati, per cui possiamo affermare che risulta essere un'ottima base di partenza per ottenere una fonte di zuccheri utilizzabili per la coltura dell'alga spirulina. Andando a operare un'idrolisi si va a scindere zuccheri più complessi in zuccheri più semplici con l'obbiettivo di ottenere monosaccaridi costituenti, ovvero zuccheri che risultano essere fonte di carbonio disponibile per la crescita delle alghe.

3.2 Caratterizzazione idrolizzati

Come riportato nel paragrafo 2.4, per andare a caratterizzare i diversi idrolizzati ottenuti si è andati a valutare il contenuto totale di polifenoli (TPC), gli oligoelementi e gli zuccheri. In particolare, per quanto riguarda la determinazione dei polifenoli si è impiegata la retta di taratura dell'acido gallico mentre per quanto riguarda la valutazione degli zuccheri si è ricorso all'utilizzo dell'HPLC analizzando gli standard di alcuni zuccheri individuati in modo da poter valutare la curva ottenuta in HPLC dei diversi idrolizzati.

In primo luogo, si è andati a valutare i tempi di eluizione di ciascun analita riportati in **Tab. 3.3**.

Confrontando i picchi ottenuti con i valori presenti in letteratura [28] possiamo affermare che i valori corrispondono.

Tabella 3.3 tempi di eluizione standard zuccheri

Zucchero	Tempo di eluizione (min)
Glucosio	10,55
Galattosio	11,15
Mannosio	11,2
Xilosio	11,2
Acido malico	11,3
Arabinosio	12
Ramnosio	12

Dai risultati ottenuti si è valutato di andare a raggruppare gli zuccheri con un tempo di eluizione circa uguale, si sono ottenuti tre gruppi; la retta di taratura tracciata per ciascun gruppo (vedi **Fig. 3.1, 3.2, 3.3**) tiene conto della somma delle aree sottese dai grafici di ciascun analita appartenente a tale gruppo e della somma delle concentrazioni.

Gruppo A: Glucosio;

Gruppo B: Galattosio, Mannosio, Xilosio e Acido malico;

Gruppo C: Arabinosio e Ramnosio.

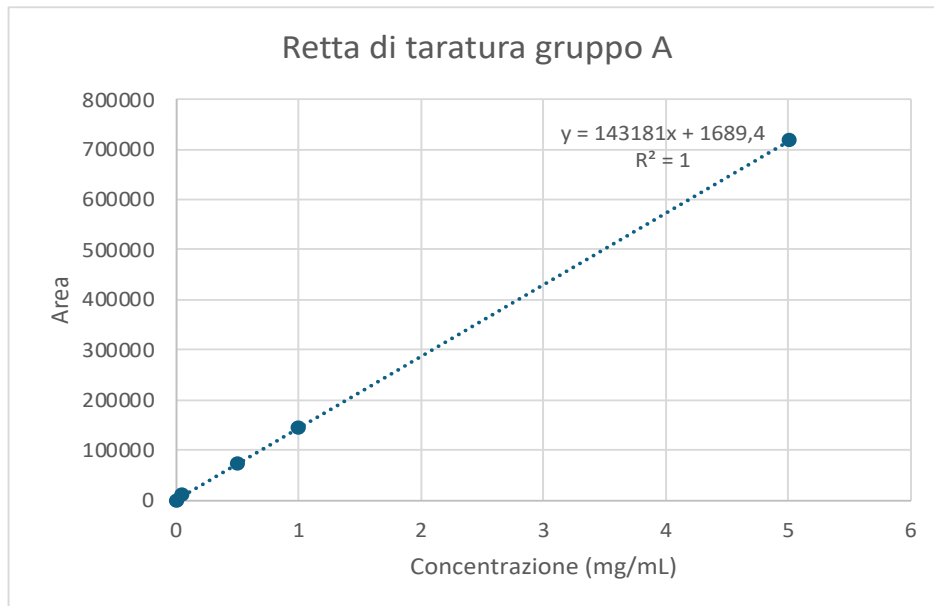


Figura 3.1 Retta di taratura HPLC gruppo A

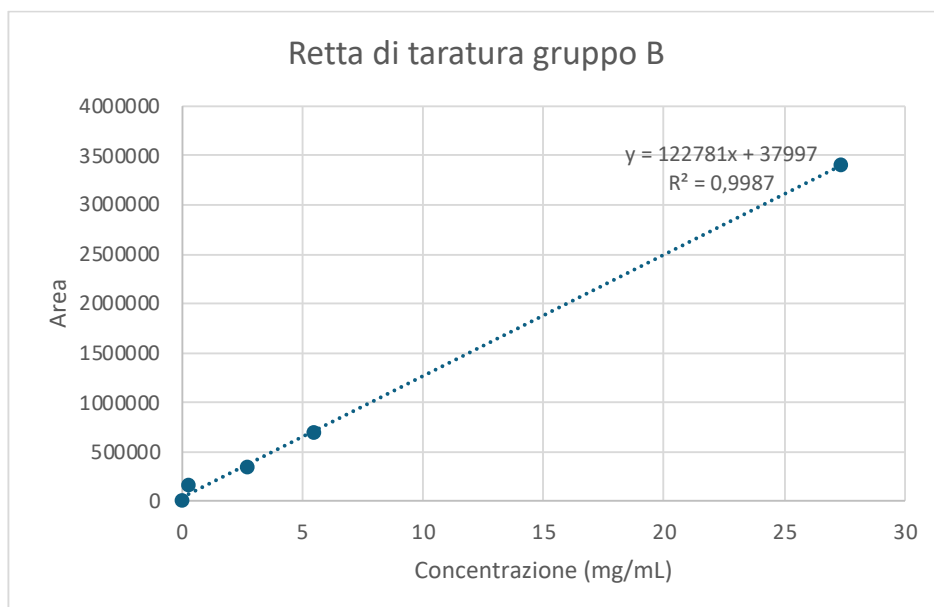


Figura 3.2 Retta di taratura HPLC gruppo B

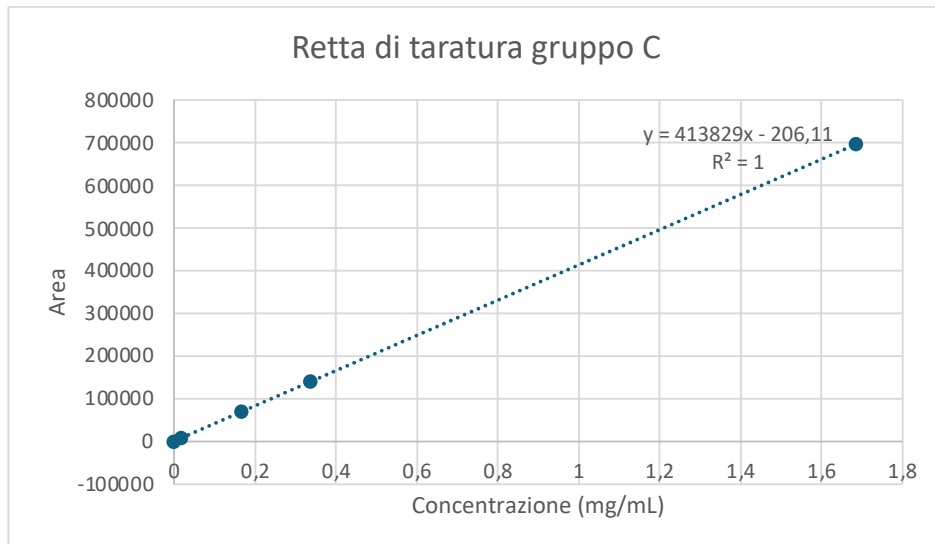


Figura 3.3 Retta di taratura HPLC gruppo C

L'operazione di raggruppamento degli zuccheri ha permesso di valutarli un volta mandati in analisi in HPLC i campioni degli idrolizzati. Il grafico che si ottiene dall'analisi HPLC per qualsiasi campione di idrolizzato consistere in una linea continua caratterizzata dalla presenza di picchi di aree differenti a tempi differenti (vedi **Fig. 3.4**), essendo che più zuccheri eluiscono allo stesso tempo non è possibile analizzare con questa tecnica la quantità esatta di ciascun analita per cui si ricorre alla metodologia del raggruppamento, in modo da poter ottenere un valore indicativo per ciascun gruppo.

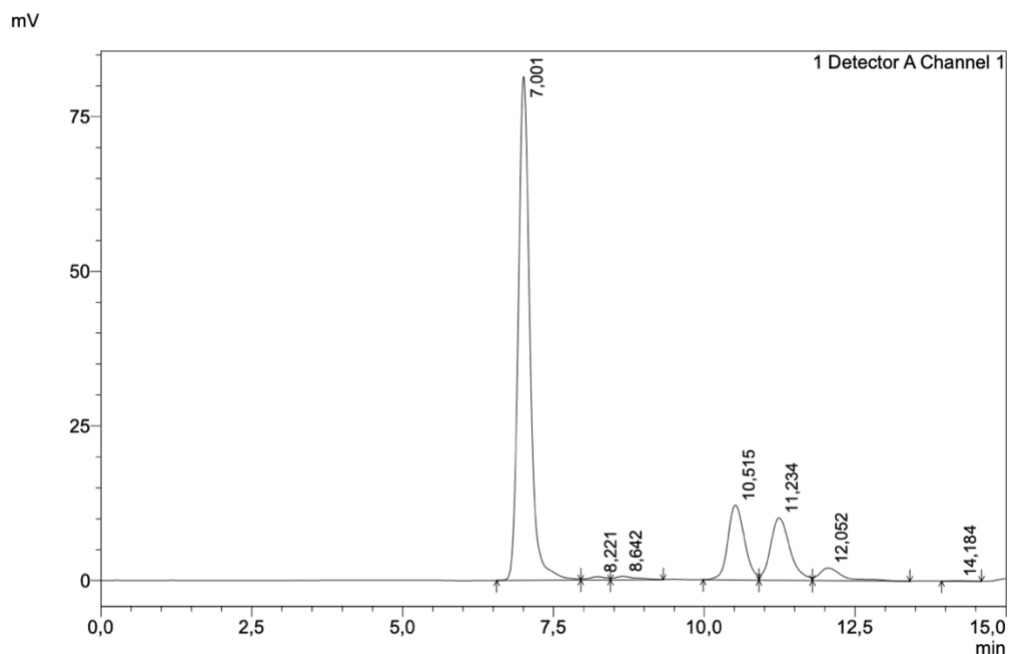


Figura 3.4 Grafico analisi HPLC idrolisi acida

Andiamo ora a vedere quali sono stati i valori ottenuti per ciascun tipo di idrolisi.

3.2.1 Risultati idrolisi acida

L'idrolisi acida effettuata sulla nostra matrice può essere definita idrolisi acida diluita in quanto impiega basse concentrazioni di acido in soluzione e bassi tempi di idrolisi ma allo stesso tempo necessita di essere svolta ad elevate temperature.

Sono riportati in **Tab. 3.4** i valori ottenuti nella caratterizzazione dell'idrolisi acida, ciascun risultato è riportato come media e corrispettiva deviazione standard in quanto ciascuna prova è stata effettuata in triplicato.

Tabella 3.4 Risultati idrolisi acida

Oligoelementi	Media (ppm)	Deviazione standard
K	1017,53	9,12
Mn	0,28	0,02
Fe	1,17	0,19
Mg	31,80	2,40
Zuccheri	Media (mg/mL)	Deviazione standard
Glucosio	23,605	0,093
Fruttosio, Xilosio, Mannosio, Galattosio	1,674	0,133
Ramnosio e Arabinosio	1,514	0,183
Polifenoli	MEDIA (acido gallico equivalente mg/mL)	Deviazione standard
TPC	1,097	0,071

Si può notare dai valori riportati in tabella che l'idrolisi acida presenta un valore nettamente superiore di glucosio, se confrontato con i valori degli altri zuccheri. Questo risulta essere un primo indicatore della possibile bontà dell'utilizzo di questa idrolisi per poi utilizzare l'idrolizzato nella coltura dell'alga.

Si può anche notare un valore elevato per quanto riguarda il potassio (K), questo risultato è stato influenzato dall'utilizzo di soluzioni acide e basiche per la variazione del ph.

L'idrolisi acida effettuata risulta essere l'ottimizzazione per il rilascio di glucosio a partire da crusca di grano dello studio di. S. Pal, J. Handa e U. K. Jain [23], già descritta nel capitolo 2. Osservando i risultati presenti nello studio (**Fig. 3.5**), si può notare che il valore maggiore di glucosio ottenuto tramite idrolisi acida si ha nelle stesse condizioni operative di concentrazione solvente e temperatura ma a un tempo inferiore rispetto a quello utilizzato per svolgere le analisi in questo studio di tesi, che coincide con le condizioni contornate in rosso, si può quindi supporre che utilizzando un tempo di estrazione inferiore anche per l'idrolisi della SME avremmo ottenuto un contenuto superiore di glucosio.

In generale, è interessante osservare come, variando la matrice su cui viene effettuata l'idrolisi, variano le quantità di zuccheri ridotti estratti. Il motivo è da ricercare nel tipo di carboidrati e di fibre (che nel conteggio contengono la lignina, che può decomporsi a zuccheri ridotti) che compongono le due matrici, ad esempio sappiamo che la crusca di grano è ricca in cellulosa che idrolizzerà in glucosio [34].

Reducing sugar concentration	H ₂ SO ₄ (mg/mL)	HCl (mg/mL)	NaOH (mg/mL)
Cold treatment 5%	140,75	116,75	69,5
Hot treatment 5% (60 min)	188,25	154,75	113,25
Hot treatment 5% (120 min)	171	151	137,75

Figura 3.5 Effetto di vari trattamenti di idrolisi acido-base trattamento sugli zuccheri riducenti della crusca di frumento, figura da fonte [23]

Proponendo un nuovo confronto possiamo andare ad analizzare lo studio di Matura et al. [35] in cui viene proposto un DOE per l'idrolisi acida di bucce di durian, frutto tipico del sud-est asiatico. In particolare, vengono messi a confronto tre differenti reagenti, operando per ciascuno differenze condizioni operative e definendo i valori ottimali, al fine di ottenere il maggior valore di zuccheri ridotti, per ciascuno.

In particolare, osserviamo i risultati che vengono ottenuti impiegando come solvente l'acido solforico (H₂SO₄) ovvero lo stesso utilizzato nell'idrolisi condotta per il presente lavoro di tesi. L'idrolisi delle bucce di durian è stata portata avanti con le seguenti condizioni operative:

- Tempo di estrazione: 30 minuti
- Concentrazione solvente: 2%
- Concentrazione matrice: 10% (w/v)

I risultati ottenuti in termine di glucosio (mg/mL) sono molto simili a quelli ottenuti per la SME, nonostante il tempo di idrolisi, la concentrazione del solvente e la quantità di carboidrati presenti nella matrice di partenza fossero inferiori.

Operiamo sui risultati in modo da ottenerli in percentuale, applicando la (3.1) in modo da poterli confrontare (vedi **Tab. 3.5**).

$$Risultati (\%) = Zuccheri \frac{mg}{mL} * \frac{Volume idrolisi mL}{Campione SME utilizzato mg} * 100 \quad (3.1)$$

Tabella 3.5 Confronto valori glucosio SME - Bucce di Durian

Matrice	Glucosio (%)
SME (2g, 20mL)	23,6
Bucce di Durian (10g, 100mL)	20,4

La somiglianza dei risultati ottenuti coincide non solo in valutazione mg/mL ma anche una volta in percentuale.

3.2.2 Risultati idrolisi basica

Anche in questo caso, come accade per le idrolisi acide, anche le idrolisi basiche possono essere classificate in due categorie, idrolisi basiche diluite e idrolisi basiche concentrate. Le prime presentano concentrazioni di soluto (la base utilizzata) sono basse, tempi di estrazione dell'ordine dei minuti e temperatura elevate mentre le seconde utilizzano concentrazioni elevate di base, tempi di residenza elevati e temperature basse.

Come già visto per l'idrolisi precedentemente analizzata, riportiamo in **Tab. 3.6** i risultati della caratterizzazione dell'idrolisi basica

Tabella 3.6 Risultati idrolisi basica

Oligoelementi	Media (ppm)	Deviazione standard
K	22927,05	1782,76
Mn	0,03	0,01
Fe	0,64	0,01
Mg	77,11	0,54
Zuccheri	Media (mg/mL)	Deviazione standard
Glucosio	2,022	0,082
Fruttosio, Xilosio, Mannosio, Galattosio	0,157	0,010
Ramnosio e Arabinosio	2,594	0,026
Polifenoli	MEDIA (acido gallico equivalente mg/mL)	Deviazione standard
TPC	3,641	0,007

In questo caso il valore degli zuccheri non risulta essere elevato per nessuno dei tre gruppi individuati, si ipotizza, anche facendo riferimento all'analisi sensoriale (vedi **Fig. 2.6**) del campione, che a causa dell'idrolisi la maggior parte degli zuccheri presenti nel campione si siano caramellati, si può infatti osservare un colore bruno molto scuro oltre ad avere il campione un forte odore di zucchero bruciato.

Anche in questo caso come precedentemente evidenziato nell'idrolisi acida, si ha un valore elevato di potassio legato all'utilizzo di reagenti che modificano il ph della soluzione.

Come per il caso precedente di idrolisi acida, l'idrolisi bassa condotta in questo lavoro di tesi fa riferimento all'idrolisi basica ottimizzata dello studio di S. Pal, J. Handa e U. K. Jain [23] descritta al paragrafo 2. In questo caso come possiamo notare in **Fig. 3.6** alle condizioni operative utilizzate si ha, per quanto riguarda l'idrolisi basica, il maggior contenuto di glucosio possibile, per cui andando a modificare il tempo di estrazione non possiamo predire un possibile aumento della quantità di glucosio per la SME.

Reducing sugar concentration	H ₂ SO ₄ (mg/mL)	HCl (mg/mL)	NaOH (mg/mL)
Cold treatment 5%	140,75	116,75	69,5
Hot treatment 5% (60 min)	188,25	154,75	113,25
Hot treatment 5% (120 min)	171	151	137,75

Figura 3.6 Effetto di vari trattamenti di idrolisi acido-base trattamento sugli zuccheri riducenti della crusca di frumento, figura da fonte [23]

In questo caso l'idrolisi basica effettuata sulla mela non ha riportato risultati significativi come quelli ottenuti per l'idrolisi acida.

In generale possiamo affermare che l'idrolisi basica, facendo riferimento alla letteratura, risulta essere meno utilizzata rispetto all'idrolisi acida in quanto presenta rese di zuccheri ridotti inferiori; tuttavia, l'idrossido di sodio risulta utile in un possibile pretrattamento della matrice. In generale il trattamento alcalino è considerato un efficace trattamento volto alla delignificazione di sottoprodotti agricoli; nel migliore dei casi questa può operare a condizioni di temperatura e pressioni blande presentando inoltre una bassa degradazione degli zuccheri. La rimozione parziale della lignina permette di aumentare il contenuto di cellulosa migliorando quindi la digeribilità degli zuccheri totali a zuccheri ridotti [36].

3.2.3 Risultati idrolisi ad acqua subcritica

In **Tab. 3.7** sono riportati i risultati ottenuti per la caratterizzazione dell'idrolisi subcritica.

Tabella 3.7 Risultati idrolisi ad acqua subcritica

Oligoelementi	Media (ppm)	Deviazione standard
K	205,34	17,81
Mn	0,28	0,02
Fe	0,02	0,00
Mg	31,79	2,40
Zuccheri	Media (mg/mL)	Deviazione standard
Glucosio	3,992	0,443
Fruttosio, Xilosio, Mannosio, Galattosio	14,0262	1,094
Ramnosio e Arabinosio	NR ¹	NR ¹

Polifenoli	MEDIA (acido gallico equivalente mg/mL)	Deviazione standard
TPC	0,039	0,006

¹: Non Rilevato

Per quanto riguarda l'idrolisi ad acqua subcritica risulta esserci un valore relativamente elevato di zuccheri per il gruppo B. Si ipotizza inoltre che il basso valore di glucosio sia dovuto a un'idrolisi non completa, il campione presentava una consistenza gelatinosa, a differenza degli altri che risultavano liquidi, questo potrebbe essere un indicatore del fatto che l'idrolisi si è fermata alla pectina non riuscendo a scinderla ulteriormente.

L'idrolisi subcritica operata in questo lavoro di tesi si basa sullo studio di J. Pains, V. Benedetti, L. Menin, M. Baratieri, and F. Patuzzi [24]., descritta nel capitolo due. Tuttavia, le condizioni utilizzate non sono esattamente identiche a quelle presentate nello studio per limitazioni del reattore impiegato. In particolare, nella prova svolta sono stati utilizzati come parametri operativi:

- Tempo di estrazione: 30 minuti
- Fattore di diluizione (DF): 30
- Temperatura: 100°C
- Pressione: 10 bar

Osservando i risultati riportati nello studio (vedi **Fig. 3.7**) notiamo come le rese di fruttosio e glucosio ottenute da J. Pains risultino essere inferiori rispetto a quelle ottenute nella nostra prova d'idrolisi. Per ottenere un risultato migliore, non essendo quello avuto ottimale si può ipotizzare che un aumento della pressione rispetto alla prova effettuata possa permettere l'aumento degli zuccheri ridotti nell'idrolizzato, mentre l'operazione di aumentare eccessivamente la temperatura potrebbe non portare al risultato desiderato in quanto potrebbe verificarsi una degradazione degli zuccheri stessi. Con aumentare eccessivamente la temperatura si intende utilizzare condizioni operative che prevedono un set point di temperatura superiore ai 200°C per cui nel caso delle prova effettuata per questa ricerca si hanno a disposizione ancora 100°C [37].

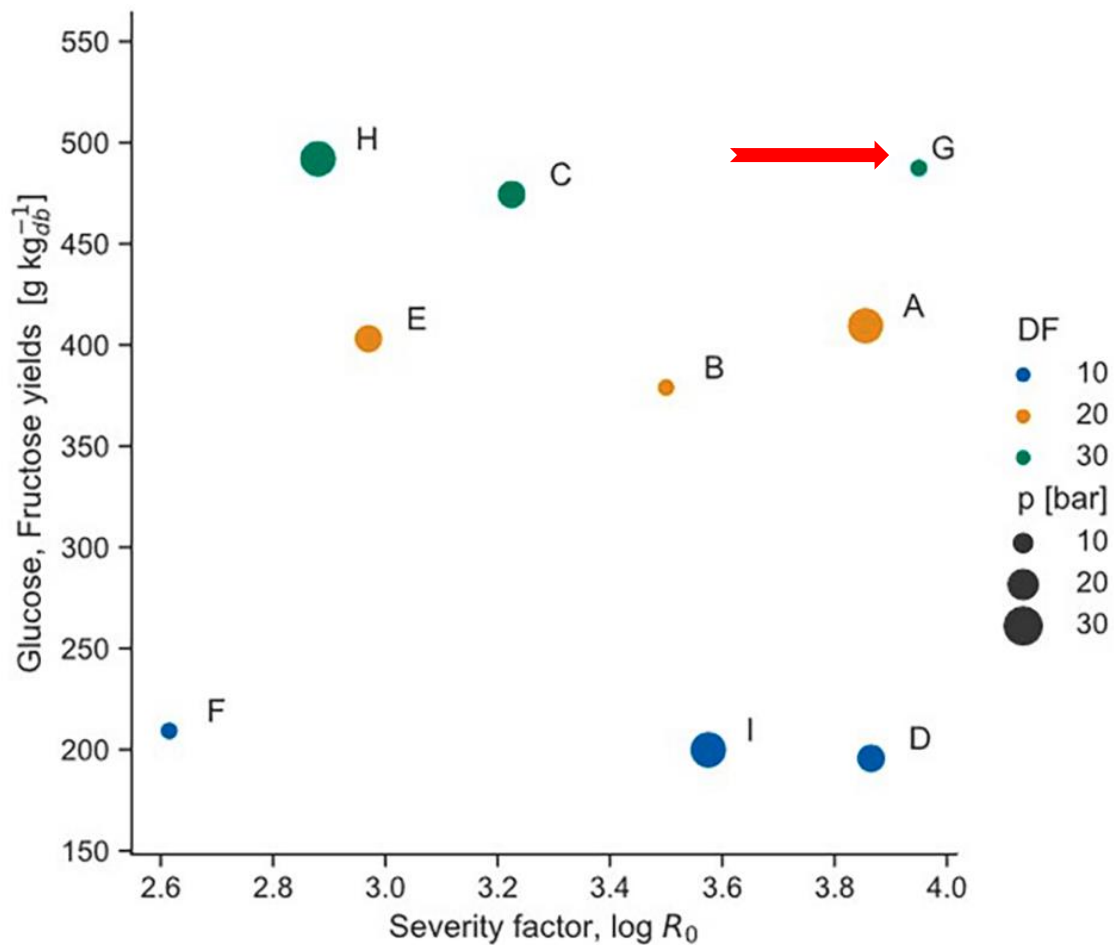


Figura 3.7 Grafico di dispersione che rappresenta le rese di glucosio e fruttosio [g kg_{db}⁻¹] nella frazione liquida dopo SubH₂O, figura da fonte [24]

Dove il fattore di severità è dato dalla formula (3.2)

$$R_0 = \log \int_0^t \exp\left(\frac{T-100}{14,75}\right) dt \quad (3.2)$$

Con t tempo dell'esperimento [s] incluso il tempo necessario per arrivare alla temperatura di set point e T temperatura all'interno del reattore (variabile dipendente dal tempo) [°C]. Il risultato è espresso come grammi su kg di substrato; considerando l'utilizzo di sola acqua possiamo andare ad approssimare il risultato da g/kg in mg/mL con una conversione 1:0,001.

Per valutare la severità nel caso della prova svolta per il lavoro di tesi è necessario valutare l'integrale riportando i valori di temperatura ottenuti a ciascun tempo, per calcolarlo è possibile utilizzare un'approssimazione dell'integrale come, ad esempio, la formula del trapezio.

Andando a confrontare i risultati con la letteratura disponibile potrebbe essere che l'idrolisi subcritica risulti essere una metodologia più adatta all'estrazione di altri componenti come, ad esempio, sostanze fitochimiche piuttosto che per l'estrazione di zuccheri ridotti [38].

Nonostante ciò, secondo lo studio di Nurfatimah Mohd Thani et al. [37] a seconda della matrice utilizzata è possibile ottenere zuccheri ridotti attraverso la sola idrolisi ad acqua subcritica, in

questo caso lo studio utilizza come matrice la rimanenza di panificati di un panificio, in particolare croissants e ciambelle. Lo studio citato suggerisce appropriato allo scopo un utilizzo di condizioni operative più severe dal punto di vista di temperatura e pressione, dove la prima varia tra i 100°C e i 200°C e la pressione utilizzata è pari a 50 bar con un fattore di diluizione (DF) pari a 10. In **Fig. 3.8** possiamo osservare i risultati ottenuti sperimentalmente e analiticamente.

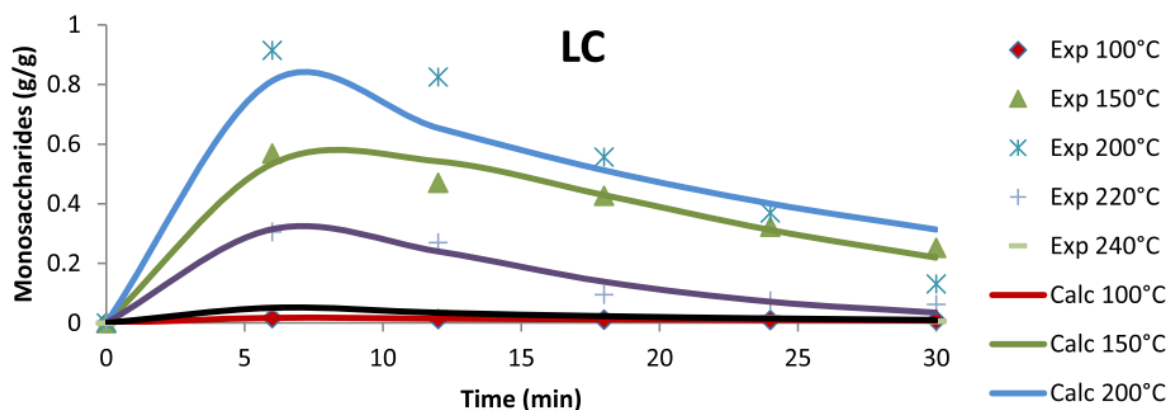


Figura 3.8 Dati sperimentali e curve calcolate per resa di monosaccaridi da LC tramite SWH a diverse temperature. Exp, dati sperimentali, Calc, curva calcolata, dati da fonte [37]

3.2.4 Risultati idrolisi enzimatica

In **Tab. 3.8** sono riportati i risultati della caratterizzazione dell'idrolisi enzimatica.

Tabella 3.8 Risultati idrolisi enzimatica

Oligoelementi	Media (ppm)	Deviazione standard
K	13625,87	13,74
Mn	0,46	0,05
Fe	1,63	0,23
Mg	31,60	2,40
Zuccheri	Media (mg/mL)	Deviazione standard
Glucosio	1,03	0,01
Fruttosio, Xilosio, Mannosio, Galattosio	1,73	0,33
Ramnosio e Arabinosio	-	-
Polifenoli	MEDIA (acido gallico equivalente mg/mL)	Deviazione standard
TPC	0,015	0,001

L'idrolisi enzimatica risulta non avere valori elevati soprattutto per quanto riguarda gli zuccheri che in questo caso sono il risultato che più ci interessa per la coltivazione algale.

Andando a confrontare i risultati ottenuti con quelli riportati nello studio di Repson Gama et al. (vedi Fig. 3.9) possiamo notare che quelli ottenuti nella prova descritta risultano essere inferiori a quelli riportati nello studio. Una motivazione risulta essere lampante nel confronto, nella prova caratterizzata all'HPLC non è stato valutato il contenuto di acido galatturonico che invece nello studio di riferimento risulta lo zucchero ridotto più presente nell'idrolizzato. Altra motivazione, non così evidente, in cui è possibile ricercare il motivo per cui i valori ottenuti risultano essere inferiori è la temperatura operativa. Come descritto nel paragrafo 2 nello studio di riferimento è esplicitata la possibilità di condurre la prova di idrolisi senza effettuare un controllo di temperatura ma svolgendola a temperatura ambiente; tuttavia, vengono indicati come temperatura ambiente i 25°C, andando ad osservare la prova che si è invece andati ad effettuare si può evidenziare che essendo stata svolta in periodo invernale, in un ambiente climatizzato ma con temperature inferiori ai 25°C, questa condizione può essere andata ad influire sull'attività degli enzimi non performando allo stesso modo.

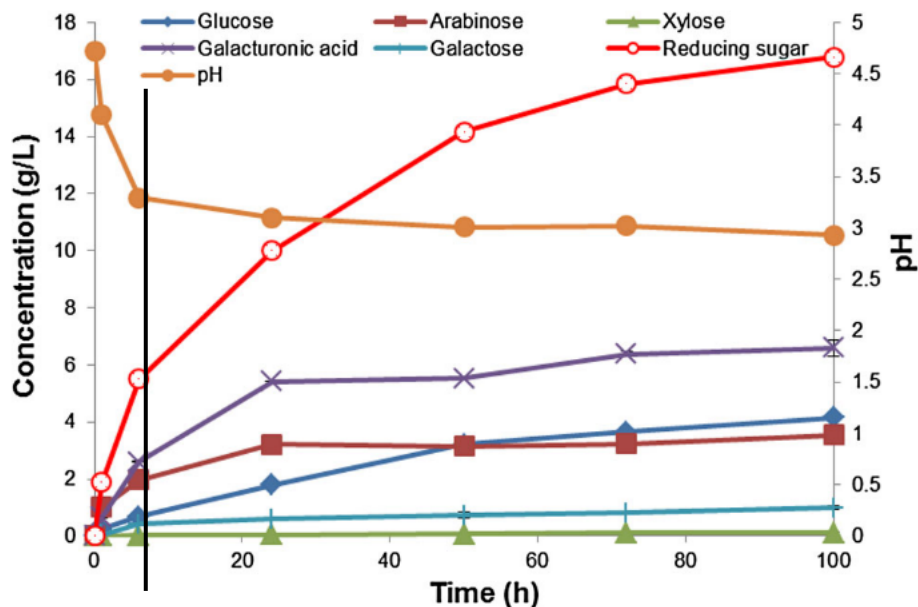


Figura 3.9 Concentrazione degli zuccheri rilasciati a diversi intervalli di tempo per reattore batch miscelato con aria compressa a temperatura ambiente; carico iniziale di substrato 2 % secco p/, figura da fonte [25]

3.3 Confronto idrolisi

La sansa di mela contiene infatti un elevato contenuto di solidi totali, questo suggerisce che a seguito di un pretrattamento della matrice potrebbe presentare un contenuto di zuccheri più elevato, in quanto contiene cellulosa, emicellulosa e lignina. La presenza di zuccheri fermentabili in quantità significative può fungere da nutriente essenziale da nutriente essenziale per la crescita di organismi e pone le sanses come potenziali candidati per l'utilizzo a questo scopo [39]. La sansa di mele, in questo particolare caso, può essere definita una matrice lignocellulosica in quanto è costituita non solo dai residui di polpa, ma sono presenti nello sfarinato utilizzato anche semi e stami che ne aumentano la percentuale di lignina presente [40],

questo è un dato importante da segnalare in quanto la scelta del tipo di idrolisi migliore da utilizzare dipende anche dalla composizione della matrice da idrolizzare.

Vediamo ora come si distinguono i tipi di idrolisi implementati nel presente studio.

L'idrolisi acida è forse attualmente considerato il metodo tecnologicamente più maturo per il rilascio di zuccheri dalla biomassa.

L'idrolisi acida rilascia oligomeri e monosaccaridi ed è stata storicamente modellata come una reazione omogenea in cui l'acido catalizza la scissione della cellulosa in glucosio, a seconda del tempo di estrazione la scissione può continuare e si ha glucosio rilasciato per formare HMF e altri composti di degradazione. Inoltre, l'utilizzo di acidi forti permette di ridurre la regione cristallina ma porta alla degradazione del glucosio.

Il processo di idrolisi basato sull'acido solforico (acido utilizzato nello studio) funziona in due condizioni diverse:

- un processo che utilizza un'alta concentrazione di acido solforico e opera a una temperatura più bassa;
- un processo che utilizza una bassa concentrazione di acido solforico e opera a una fase di temperatura più alta è ottimizzato per l'idrolisi della porzione di cellulosa della materia prima.

Il vantaggio principale dell'idrolisi con acido diluito è che risulta essere più rapida dell'idrolisi condotta con acido concentrato e quindi può essere utilizzata come processo continuo. Lo svantaggio di questo metodo è che l'efficienza di conversione dello zucchero è al massimo del 50% circa. I fattori critici necessari per rendere questo processo economicamente vantaggioso sono l'ottimizzazione del recupero dello zucchero e il recupero economico dell'acido per il riciclo.

Il processo che utilizza acido concentrato utilizza temperature relativamente basse, tempi di reazione in genere molto più lunghi rispetto al processo ad acido diluito e concentrazioni di acidi molto più elevate, che vanno da circa il 30% al 70%. Il vantaggio principale del processo con acido concentrato è la possibilità di ottenere un'elevata efficienza di recupero dello zucchero.

Una delle complicazioni che si può presentare all'utilizzare acido solforico o cloridrico concentrato è che questi risultano essere difficili da lavorare e al fine di rendere economico il processo è necessario recuperare e riconcentrare tutto l'acido impiegato.

Per quanto riguarda l'idrolisi della cellulosa con acido diluito convenzionale, si può dire che la metodologia viene poco apprezzata perché si ha che gli zuccheri si decompongono nelle condizioni richieste per l'idrolisi della cellulosa, cioè alta temperatura e basso pH.

La sfida principale per i processi di idrolisi con acido diluito è quella di riuscire ad aumentare le rese di glucosio oltre il 70% in un processo industriale economicamente sostenibile, mantenendo un alto tasso di idrolisi della cellulosa e riducendo al minimo la decomposizione del glucosio.

Anwar et al. hanno anche scoperto che l' H_2SO_4 è un catalizzatore più efficiente rispetto all'acido cloridrico (HCl) per la degradazione dello xilosio, inoltre hanno scoperto che la fibra H_2SO_4 può essere utilizzata al 5% a 121 °C per 1 ora come pretrattamento della matrice; questo processo ha facilitato un processo di idrolisi impiegante enzimi commerciali, i quali hanno idrolizzato altamente i componenti rimanenti di amido ed emicellulosa senza generare inibitori come il furfurolo e l'idrossimetilfurfurolo (HMF), composti generalmente considerati inibitori

per i microrganismi fermentativi e quindi indesiderati se l'obiettivo è quello di riutilizzare gli zuccheri ottenuti.

L'idrolisi basica risulta essere efficace per rimuovere i gruppi acetilici e la lignina. È un processo lento che richiede la neutralizzazione e il recupero degli alcali aggiunti.

L'idrolisi basica è più adatta per le colture erbacee e i sottoprodotti agricoli mentre non è adatta per le biomasse legnose a causa del loro maggiore contenuto di lignina.

Ottenere un'elevata resa di zucchero mediante idrolisi alcalina è molto difficile perché i carboidrati mono- e dimerici, come il glucosio, il fruttosio o il cellobiosio, sono gravemente attaccati dagli alcali a temperature inferiori ai 100 °C. Durante l'idrolisi si formano anche acidi organici; che portano al consumo degli alcali, il che allo scopo di avere un'idrolisi condotta a una data concentrazione rappresenta un problema.

Data la sua capacità di rimuovere la lignina si può andare ad effettuare un pretrattamento con NaOH diluito della biomassa lignocellulosica, questo provoca rigonfiamento, con conseguente aumento dell'area superficiale interna, diminuzione della cristallinità, separazione dei legami strutturali tra lignina e carboidrati e rottura della struttura della lignina permettendo conseguentemente di operare un'idrolisi (generalmente acida o enzimatica) avente rese maggiori [41].

A seguito dell'analisi delle due tipologie di idrolisi che posso essere definite più tradizionali, che risultano essere metodi relativamente veloci che permettono di produrre alte concentrazioni di zuccheri andiamo ora ad osservare le caratteristiche di due tecniche di idrolisi che cercano di sostituirsi a queste ponendo rimedio ai problemi ambientali causati da idrolisi acida e basica. Infatti, come già precedentemente illustrato le complicazioni legate all'utilizzo di queste metodologie sono differenti: il mezzo di reazione deve essere neutralizzato dopo il processo, generando rifiuti solidi, si va incontro alla corrosione delle apparecchiature, inoltre si ha una scarsa riciclabilità dei catalizzatori e può avvenire il fenomeno di degradazione degli zuccheri. Le tecnologie alternative proposte sono l'idrolisi ad acqua subcritica e l'idrolisi enzimatica.

Un approccio fisico-chimico consiste nell'utilizzare acqua sub/supercritica come mezzo di reazione. Questo processo permette di avere una minore degradazione degli zuccheri rispetto all'idrolisi acida e alcalina, non genera residui solidi, è veloce e non necessita obbligatoriamente di una fase di pretrattamento della matrice.

Questa metodologia prende il nome di idrolisi in acqua sub/supercritica (SCWH). Si definisce fluido supercritico qualsiasi sostanza le cui condizioni operative di temperatura e pressione risultano essere superiori ai loro valori critici, rispettivamente T_c e P_c . Nel caso dell'acqua, tali condizioni diminuiscono il momento di dipolo, aumentano il prodotto ionico (K_w) di tre ordini di grandezza, diminuiscono il valore del pH di tre unità, diminuiscono la viscosità, aumentano la diffusività e influenzano la costante dielettrica (ϵ) e la densità. Queste proprietà consentono all'acqua di agire contemporaneamente come reagente e catalizzatore nella regione intorno al punto critico.

Nell'intervallo supercritico, l'acqua presenta le proprietà di un solvente non polare. Tuttavia, la struttura di una singola molecola rimane invariata, cioè è ancora una molecola polare che può interagire, ad esempio, con gli ioni.

L'acqua subcritica si comporta in modo ulteriormente diverso sia rispetto all'acqua a temperatura ambiente sia all'acqua supercritica. Tuttavia, presenta ancora delle caratteristiche proprie dell'acqua supercritica. Pertanto, anche l'acqua subcritica è stata ampiamente utilizzata come mezzo di reazione. In particolare, può essere utilizzata come pretrattamento per il

frazionamento di cellulosa, emicellulosa e lignina o come mezzo di reazione per idrolizzare direttamente i polimeri in zuccheri.

La SCWH è un metodo di idrolisi pulito e veloce che si è dimostrato tecnicamente fattibile e presenta i vantaggi, rispetto alle tecniche più tradizionali, di non necessitare di pretrattamenti, avere tempi di reazione più brevi, presentare minore corrosione, minore generazione di residui, non si impiegano solventi tossici e si ottiene una minore formazione di prodotti di degradazione [42]. Inoltre, ponendo a confronto le due tipologie di SCHW possiamo evidenziare che l'acqua subcritica risulta essere meno corrosiva in confronto all'acqua supercritica pur mantenendo proprietà di questa, come una bassa costante dielettrica e un alto prodotto ionico, che risultano essere le proprietà chiave che ne influenzano polarità e capacità solvente. In presenza di valori elevati di prodotto ionico, si è infatti dimostrato che l'acqua possiede l'effetto di un catalizzatore acido.

I risultati degli studi hanno rivelato che la tecnologia dell'acqua subcritica è una tecnica promettente ed è fortemente candidata a diventare una via alternativa non solo per l'idrolisi della cellulosa, ma anche per altre conversioni di biomassa. Nonostante il costo energetico associato alla tecnologia dell'acqua subcritica, questa tecnica presenta vantaggi immediati rispetto alle tecniche di idrolisi tradizionali, in quanto rappresenta un processo flessibile grazie alla possibilità di cambiare continuamente la potenza del solvente dell'acqua subcritica. Inoltre, consente di eliminare i solventi acidi inquinanti e il costoso post-trattamento degli idrolizzati per l'eliminazione dei solventi [43].

Tuttavia, la tecnologia non è ancora completamente sviluppata per poter essere scalata a livello industriale. Il processo deve essere migliorato attraverso una migliore comprensione dei meccanismi in atto, che ne consentirà un'ottimizzazione nella progettazione delle apparecchiature e dei parametri di processo. Inoltre, la sua applicazione ai residui agricoli è un compito impegnativo perché i tassi di idrolisi e i rendimenti dipendono dalle caratteristiche del sottoprodotto, tra cui la composizione e la struttura della parete cellulare, nonché i monosaccaridi presenti e il tipo di legami che questi hanno con la lignina. Pertanto, ogni materia rappresenta una sfida tecnologica che deve essere studiata singolarmente, poiché le condizioni ottimali di processo possono variare per i diversi tipi di residui. Infine, per questa metodologia si ha il problema del consumo d'acqua che deve essere risolto per migliorare la fattibilità economica del processo, in particolare, devono essere affrontate questioni come l'elevato rapporto tra solvente e alimento, necessario per un corretto pompaggio [42].

L'idrolisi enzimatica è spesso preferita all'idrolisi acida in quanto presenta diversi vantaggi come una maggiore conversione, una minima formazione di sottoprodotti indesiderati, una minore corrosione degli impianti e un minore fabbisogno energetico. Questo metodo è anche considerato ecologico grazie alla biodegradabilità degli enzimi e alle condizioni operative più miti (45-55 °C e pH 4,5-5,5). Inoltre, il maggiore vantaggio dell'idrolisi enzimatica rispetto a quella acida è la prevenzione della degradazione degli zuccheri.

L'idrolisi enzimatica comporta la scissione dei legami della cellulosa e genera glucosio utilizzando le cellulasi un tipo particolare di enzimi idrolasi. Le emicellulose sono più suscettibili all'idrolisi rispetto alla cellulosa a causa della loro natura amorfa e ramificata. Tuttavia, la degradazione delle emicellulose richiede sistemi complessi di xilanasi ed enzimi accessori a causa dei diversi tipi di legami presenti nelle loro catene.

Ad oggi una delle maggiori complicazione per l'idrolisi enzimatica riguarda i costi dovuti agli enzimi, che ne limita l'aumento di scala del processo stesso. Sono stati compiuti grandi sforzi di ricerca per ridurre il costo del consorzio enzimatico, alcuni autori suggeriscono l'uso di additivi per ridurre il dosaggio dell'enzima. Come possibili additivi sono stati indicati, tensioattivi non ionici, proteine non catalitiche e sali, e si è andati anche a valutare la loro

capacità di migliorare l'idrolisi di diversi materiali lignocellulosici. L'effetto di questi additivi è stato studiato soprattutto per sottoprodotti e agricoli (come la canna da zucchero, la paglia di grano e la paglia di mais) pretrattati principalmente mediante idrolisi idrotermale o idrolisi acida diluita [44].

Osserviamo ora un confronto tra i diversi metodi di idrolisi (**Tab. 3.9**)

Tabella 3.9 Confronto metodi di idrolisi su matrice lignocellulosica, dati da fonte [41], [45]

Metodo di idrolisi	Condizioni	Resa di glucosio (%)	Vantaggi	Svantaggi
ACIDA DILUITA	<1%, H ₂ SO ₄ , 215°C, 3 min	50-70	Elevata resa di zuccheri Velocità di reazione elevata	Problemi ambientali e di corrosione Decomposizione zuccheri a temperature elevate Costi elevati a temperature elevate Costi elevati per utilizzo di acidi
ACIDA CONCENTRATA	30-70%, H ₂ SO ₄ , 40°C, 2-6 h	90	Elevata resa di zuccheri Velocità di reazione elevata	Problemi ambientali e di corrosione Costi elevati per recupero acidi
BASICA	18 % NaOH, 100°C, 1h	30	Velocità di reazione elevata	Bassa resa di glucosio Decomposizione degli zuccheri per via di attacco da alcani
ENZIMATICA	Cellulase, 70°C, 1,5 giorni	75-95	Alta resa zuccheri Condizioni ambientali miti Nessun problema ambientale e di corrosione	Necessità di pretrattamento della matrice Alto costo enzimi Velocità di reazione bassa
ACQUA SUBCRITICA	100-374°C, 10-200 bar, 10-50 min	30%	Soluzione a problemi ambientali	Tecnologia non ancora ottimizzata

	Non necessita di pretrattamento	Alto consumo d'acqua
	Velocità di reazione elevata	Bassa resa

Da questo confronto possiamo riportare che, sebbene i processi di idrolisi acida siano una tecnologia matura, i processi enzimatici hanno costi comparabili e la possibilità di ridurre i costi in futuro con il miglioramento della tecnologia, oltre ad avere un impatto ambientale nettamente inferiore. La ricerca futura è necessaria per sviluppare catalizzatori adatti a facilitare l'idrolisi della cellulosa a temperature relativamente basse per ridurre al minimo la decomposizione dei prodotti zuccherini.

3.4 Confronto risultato idrolisi

Per andare a confrontare realmente i valori caratteristici per ogni idrolisi è necessario valutarne la percentuale, il valore di zuccheri è infatti riportato come mg/mL, ciascuna idrolisi è stata però effettuata in rapporti di volume differenti, con un contenuto di SME di partenza anch'esso differente. Applicando la (3.1) possiamo andare ad ottenere i valori in percentuale, permettendoci di effettuare un confronto tra i risultati.

I valori percentuali sono riportati in **Tab. 3.10**.

Tabella 3.10 Risultati zuccheri idrolisi normalizzati

Idrolisi	Glucosio (%)	Fruttosio, Xilosio, Mannosio, Galattosio (%)	Ramnosio e Arabinosio (%)
Acida (2g, 20 mL)	23,6	0,1	1,7
Basica (2g, 20 mL)	02,0	0,1	0,2
Acqua subcritica (10g, 300mL)	11,7	1,3	42,1
Enzimatica (0,5g, 100mL)	20,6	34,6	-

In questo modo i valori possono essere confrontati, e valori che apparente si presentavano come nettamente superiori, risultano in realtà allineati ad altri. Lo possiamo notare in particolare confrontando la quantità di glucosio presente nell'idrolizzato acido e in quello enzimatico. Confrontando i valori mg/mL la quantità di glucosio nell'idrolizzato acido è 23 volte più elevato che quello valutato nell'idrolizzato enzimatico. In realtà una volta normalizzati i valori i quantitativi risultano essere pressoché identici.

Essendo lo scopo della tesi l'utilizzo degli idrolizzati come substrato alternativo per la crescita di alga spirulina andiamo ora a valutarne la fattibilità. Per fare ciò ricaviamo dalla letteratura delle possibili composizioni di terreno utilizzabili. Utilizziamo la composizione del terreno proposta da Zarrouk di cui vediamo la composizione in **Tab. 3.11.**, che risulta essere una composizione largamente utilizzata in quanto al suo utilizzo si riscontra un'elevata crescita della biomassa, ma presenta lo svantaggio di essere un terreno caro [46].

Tabella 3.11 Composizione terreno di coltura Zarrouk, dati da fonte [47]

Costituenti	Composizione g/L
K₂HPO₄	1,0
NaNO₃	2,5
K₂HPO₄	0,5
NaCl	1,0
MgSO₄ 7H₂O	0,2
CaCl₂ 2H₂O	0,04
FeSO₄ 7H₂O	0,01
EDTA (NA)	0,08
A₅ MICRONUTRIENT SOL.	1 ml
NaHCO₃	16,8

La soluzione di micronutrienti A₅ consiste di H₃BO₃ 2,86; MnCl₂ 4H₂O 1,81; ZnSO₄ 4H₂O 0,222; Na₂MoO₄ 0,0177; CuSO₄ 5H₂O 0,079 (g/L)

Per far fronte al costo legato all'utilizzo del terreno di Zarrouk, nello studio di Jin L et al. [46], viene utilizzato a confronto un altro terreno, con composizioni differenti, che risulta essere più economico, questo è però legato anche a un valore nutritivo del terreno inferiore, si ottiene infatti che la crescita della biomassa coltivata con il terreno CFTRI, la cui composizione è riportata in **Tab. 3.12.**, è minore.

Tabella 3.12 Composizione terreno di coltura CFTRI, dati da fonte [46]

Costituenti	Composizione g/L
NaHCO₃	4,5
K₂HPO₄	0,5
NaNO₃	1,5
K₂SO₄	1,0
NaCl	1,0
MgSO₄ 7H₂O	1,2
CaCl₂ 2H₂O	0,04
FeSO₄ 7H₂O	0,01

In particolare, l'obiettivo di tale studio è andare a valutare se, arricchendo questo secondo terreno con del glucosio, la crescita della biomassa potesse migliorare e di quanto rispetto ai risultati ottenuti per il terreno di Zarrouk.

L'utilizzo del glucosio come fonte di carbonio, necessario per la crescita delle microalghe, è possibile in quanto questi organismi riescono ad utilizzare fonti di carbonio sia organiche che inorganiche. In particolare, il glucosio si caratterizza come fonte organica di carbonio e ne risulta essere un'eccellente fonte che aumenta la resa della biomassa e il contenuto di sostanze utili nelle microalghe. Fornendo una fonte di carbonio organico, la produttività della biomassa viene migliorata aumentando l'efficienza della crescita e la densità cellulare.

Il modo di utilizzo della fonte di carbonio organico può essere suddiviso in due tipologie, a seconda della presenza (mixotrofica) o dell'assenza (eterotrofica) di luce. La coltivazione mixotrofica è preferita a causa di alcuni inconvenienti che presenta la coltivazione eterotrofica. Quando si coltivano microalghe in condizioni eterotrofiche, l'ambiente bloccato dalla luce rende impossibile la fotosintesi, per cui l'unica fonte di energia è il carbonio organico, con conseguente rilascio di CO₂. In condizioni eterotrofiche, la CO₂ rilasciata non può essere utilizzata come fonte di carbonio per la fotosintesi, da cui si ha un conseguente abbassamento del pH della coltura causato dalla CO₂ emessa. Questa variazione del pH influisce sul tasso di crescita delle microalghe, influenzando direttamente la produttività della biomassa [48].

Nello studio svolto da Jin L. et al. [46], come anticipato, si è analizzato un terreno di coltura CFTRI modificato al fine di ridurre i costi della coltivazione dell'AS. Al fine di verificare se il glucosio può accelerare il tasso di crescita e migliorare l'accumulo di materia organica, l'AS è stata inoculata nel terreno di Zarrouk, nel terreno CFTRI o nel terreno CFTRI con 1g/L di glucosio con lo stesso valore iniziale di densità ottica a 560 nm di 0,2. Durante i primi due giorni di coltura, non ci sono state differenze evidenti nella densità tra i tre gruppi, ottenendo un valore di OD560 di 0,3, il che indica che il tasso di crescita nelle tre colture era simile alla situazione iniziale. È stato aggiunto ulteriore glucosio dopo il secondo giorno di coltura per mantenere la concentrazione di glucosio a 1 g/L.

Procedendo con la coltura si è osservato che la densità ottica nel terreno CFTRI con glucosio risultava molto più alta rispetto a quella degli altri due gruppi, raggiungendo un picco di 1,4 al giorno 12 per poi stabilizzarsi, rivelando che il glucosio può aumentare significativamente il tasso di crescita dell'AS.

Si è inoltre verificato se la biomassa potesse crescere al buio con il glucosio per ridurre ulteriormente i costi di coltura. Due fiasche di AS sono state inoculate in terreno CFTRI e in terreno CFTRI con 1g/L di glucosio e coltivate in assenza di luce. Il tasso di crescita del gruppo al buio era molto più lento rispetto alla crescita che si verificava, nelle rispettive stesse condizioni di terreno, alla luce. Nel gruppo al buio senza glucosio, la OD560 è rimasta quasi invariata, indicando che la luce è necessaria per la crescita dell'alga spirulina. Durante la coltura al buio con glucosio, l'AS si è moltiplicata all'inizio, ma dopo il terzo giorno il valore di OD560 è rimasto pressoché invariato, nonostante sia stato aggiunto ulteriore glucosio replicando l'esperimento con la luce.

Tali risultati indicano che la crescita è, sì limitata dall'assenza di luce, ma che l'AS riesce a consumare il glucosio in maniera eterotrofica in quanto i risultati risultano essere migliori rispetto alla coltura in assenza di glucosio. Dopo 14 giorni di coltura è stata rimossa la biomassa ottenuta dai terreni di coltivazione e si è andati a pesare la massa secca per misurare la biomassa ottenuta. **Dalla Fig. 3.10** possiamo osservare come il migliore risultato di crescita della biomassa si sia ottenuto per il terreno CSTRI (più economico di quello di Zarrouk) addizionato con glucosio in presenza di luce, e che per la coltura in assenza di luce si ha un miglioramento

della crescita in presenza di glucosio ma che non porta a risultati interessanti come quelli ottenuti nelle coltivazioni con luce [46].

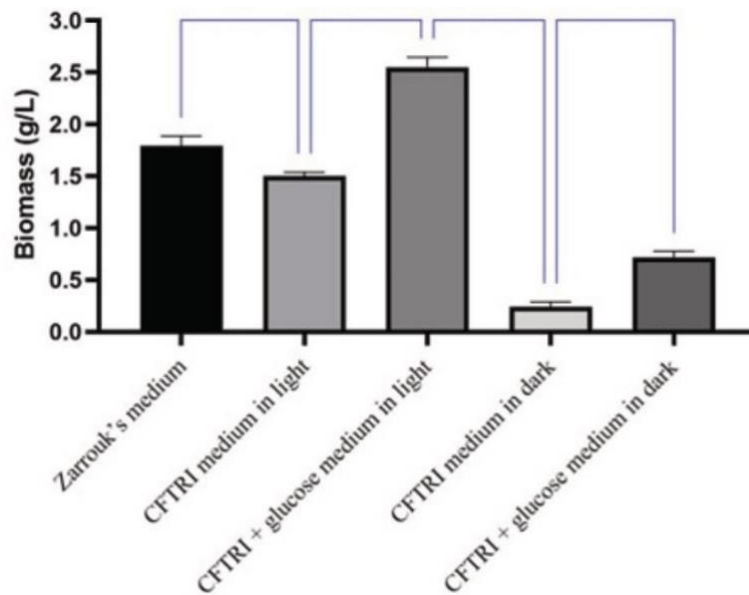


Figura 3.10 Biomassa media di AS nei diversi terreni di coltura, dati da fonte [46]

Questi risultati suggeriscono che i nostri idrolizzati potrebbero essere utilizzati per arricchire terreni più economici, andando a migliorarne le proprietà nutritive aumentando le fonti di carbonio organico disponibile, permettendo quindi una riduzione del costo del terreno stesso senza però dover sacrificare una buona crescita di biomassa. L'utilizzo dell'idrolizzato di SME deve essere comunque confermato da ulteriori studi a riguardo e non se ne può affermare, ad ora un effettivo funzionamento in quanto ancora non è stato testato, ma le quantità di glucosio presente ne suggeriscono l'impiegabilità. La complicazione principale a cui si può andare incontro è la scalabilità del processo, per piccole colture le quantità non sarebbero troppo elevate, nel momento in cui fosse necessario uno scale up, le quantità aumenterebbero ed aumenterebbero anche i costi, soprattutto nel caso delle due idrolisi individuate (acida ed enzimatica).

4. Conclusioni

La presente attività sperimentale ha avuto come obiettivo quello di valorizzare i sottoprodotti industriali della mela, derivante dal processo di spremitura per la produzione di succhi di frutta, al fine di ottenere un possibile sostituto alle fonti di carbonio presenti nei terreni di coltura per la crescita della spirulina.

Lo studio condotto, risultato di quattro differenti prove di idrolisi riporta risultati che potrebbero essere ottimizzati ma che presentano già una loro potenzialità per lo scopo. In particolare, gli idrolizzati ottenuti dalle idrolisi acida ed enzimatica sono i due che presentano risultati migliori. Alla caratterizzazione effettuata all'HPLC presentano infatti il livello di glucosio, sommato ad altri zuccheri ridotti, più elevato.

La possibilità di essere utilizzato, per ora a livello laboratoriale, per la coltivazione dell'alga spirulina è una prospettiva possibile mentre per quanto riguarda lo scale up risulta essere più complicato a causa dei relativi costi che si avrebbero relazionati al processo di idrolisi.

La prospettiva futura di questo lavoro di tesi è quello di procedere con lo studio dell'implementazione degli idrolizzati ottenuti in un terreno di coltura e valutarne i risultati ottenuti alla variazione delle condizioni operative. Al contempo uno sviluppo ulteriore delle tecnologie utilizzate per l'idrolisi enzimatica potrebbe aprire le porte ad una possibile riduzione dei costi permettendo di utilizzare una soluzione non inquinante ma allo stesso tempo scalabile.

5. Riferimenti bibliografici

- [1] S. Vidović, A. Tepić Horecki, J. Vladić, Z. Šumić, A. Gavarić, and A. Vakula, “Apple,” in *Valorization of Fruit Processing By-products*, Elsevier, 2020, pp. 17–42. doi: 10.1016/B978-0-12-817106-6.00002-2.
- [2] “Apple | Description, Cultivation, Domestication, Varieties, Uses, Nutrition, & Facts | Britannica.” Accessed: Feb. 08, 2024. [Online]. Available: <https://www.britannica.com/plant/apple-fruit-and-tree>
- [3] “THIS REPORT CONTAINS ASSESSMENTS OF COMMODITY AND TRADE ISSUES MADE BY USDA STAFF AND NOT NECESSARILY STATEMENTS OF OFFICIAL U.S. GOVERNMENT POLICY,” 2023.
- [4] “Assomela.” Accessed: Feb. 07, 2024. [Online]. Available: http://www.assomela.it/asso_news.php?id=152&p=&search=#ontitle
- [5] P. Azzurro, S. Gaiani, and M. Vittuari, “Italy-Country Report on national food waste policy Status: Final Italy-Country report on national food waste policy | 2 Colophon Title Italy-Country report on national food waste policy,” 16AD.
- [6] “Estimates of European food waste levels”.
- [7] “Masaf - Sprechi alimentari - Legge N.166/2016.” Accessed: Feb. 08, 2024. [Online]. Available: <https://www.politicheagricole.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/16886#>
- [8] “UNEP Food Waste Index Report 2021 | UNEP - UN Environment Programme.” Accessed: Feb. 13, 2024. [Online]. Available: <https://www.unep.org/resources/report/unep-food-waste-index-report-2021>
- [9] P. Una Ortofrutticoltura Sostenibile, L. Soluzioni Della Chimica Verde, and G. Residui, “RRN-INNOVAZIONE-FOCUS CHIMICA VERDE”, Accessed: Feb. 07, 2024. [Online]. Available: <http://www.rotocart.it/cartamela/>
- [10] M. Koubaa, F. J. Barba, and S. Roohinejad, “Fermentation Processes: Emerging and Conventional Technologies, First Edition. Edited,” 2021.
- [11] R. C. Skinner, J. C. Gigliotti, K.-M. Ku, and J. C. Tou, “A comprehensive analysis of the composition, health benefits, and safety of apple pomace”, doi: 10.1093/nutrit/nuy033.
- [12] C. Ghinea and A. Leahu, “Valorisation of Apple (*Malus domestica*) Wastes,” in *Mediterranean Fruits Bio-wastes: Chemistry, Functionality and Technological Applications*, Springer International Publishing, 2022, pp. 325–348. doi: 10.1007/978-3-030-84436-3_13.
- [13] N. K. Z. AlFadhly, N. Alhelfi, A. B. Altemimi, D. K. Verma, and F. Cacciola, “Tendencies Affecting the Growth and Cultivation of Genus *Spirulina*: An Investigative Review on Current Trends,” *Plants*, vol. 11, no. 22. MDPI, Nov. 01, 2022. doi: 10.3390/plants11223063.
- [14] Saranraj P, “Spirulina Cultivation: A Review,” 2010. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/259495650>
- [15] “A REVIEW ON CULTURE, PRODUCTION AND USE OF SPIRULINA AS FOOD FOR HUMANS AND FEEDS FOR DOMESTIC ANIMALS AND FISH”, Accessed: Feb. 14, 2024. [Online]. Available: <http://www.fao.org>

- [16] S. Kauser *et al.*, “Apple pomace, a bioresource of functional and nutritional components with potential of utilization in different food formulations: A review,” *Food Chemistry Advances*, vol. 4, p. 100598, 2024, doi: 10.1016/j.focha.2023.100598.
- [17] “GrowthPerforSpirulinaInRAppl1032019”.
- [18] “Rapp_ISTISAN_96_34_def”.
- [19] “Analisi Elementare, il Metodo Dumas, Gli analizzatori Dumas VELP.” Accessed: Jan. 23, 2024. [Online]. Available: <https://www.velp.com/it-it/metodo-dumas-1.aspx>
- [20] “Metodo Dumas.” Accessed: Jan. 23, 2024. [Online]. Available: <https://www.gerhardt.de/it/know-how/metodi-analitici/metodo-di-dumas/>
- [21] S.-A. Co LLC, “TOTAL DIETARY FIBER ASSAY KIT Product Codes TDF-100A and TDF-C10.”
- [22] “CHAPTER 2: METHODS OF FOOD ANALYSIS.” Accessed: Jan. 26, 2024. [Online]. Available: <https://www.fao.org/3/Y5022E/y5022e03.htm#bm3.3>
- [23] S. Pal, J. Handa, and U. K. Jain, “Chemical Hydrolysis Optimization for Release of Sugars from Wheat Bran,” *IJSET-International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology*, vol. 4, 2017, Accessed: Jan. 26, 2024. [Online]. Available: www.ijiset.com
- [24] J. Paini, V. Benedetti, L. Menin, M. Baratieri, and F. Patuzzi, “Subcritical water hydrolysis coupled with hydrothermal carbonization for apple pomace integrated cascade valorization,” *Bioresour Technol*, vol. 342, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.biortech.2021.125956.
- [25] R. Gama, J. S. Van Dyk, and B. I. Pletschke, “Optimisation of enzymatic hydrolysis of apple pomace for production of biofuel and biorefinery chemicals using commercial enzymes,” *3 Biotech*, vol. 5, no. 6, pp. 1075–1087, Dec. 2015, doi: 10.1007/S13205-015-0312-7.
- [26] “bradford_merck”.
- [27] “ISO 14502-1:2005(en), Determination of substances characteristic of green and black tea — Part 1: Content of total polyphenols in tea — Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent.” Accessed: Feb. 01, 2024. [Online]. Available: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:14502:-1:ed-1:v1:en>
- [28] B. Gullón, E. Falqué, J. Luis Alonso, and J. Carlos Parajó, “Evaluation of Apple Pomace as a Raw Material for Alternative Applications in Food Industries”.
- [29] F. Lyu, S. F. Luiz, D. R. P. Azeredo, A. G. Cruz, S. Ajlouni, and C. S. Ranadheera, “Apple pomace as a functional and healthy ingredient in food products: A review,” *Processes*, vol. 8, no. 3. MDPI AG, Mar. 01, 2020. doi: 10.3390/pr8030319.
- [30] X. Wang, E. Kristo, and G. Lapointe, “The effect of apple pomace on the texture, rheology and microstructure of set type yogurt,” 2019, doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.01.004.
- [31] H. Jin, H.-S. Kim, S.-K. Kim, M.-K. Shin, J.-H. Kim, and J.-W. Lee, “Rapid communication Production of heteropolysaccharide-7 by *Beijerinckia indica* from agro-industrial byproducts,” 2002, Accessed: Mar. 04, 2024. [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/enzmictec

- [32] “(PDF) Effect of apple pomace powder on rheological properties of dough and Sangak bread texture.” Accessed: Mar. 04, 2024. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/327012173_Effect_of_apple_pomace_powder_on_rheological_properties_of_dough_and_Sangak_bread_texture
- [33] A. Ktenioudaki, N. O’shea, and E. Gallagher, “Rheological properties of wheat dough supplemented with functional by-products of food processing: Brewer’s spent grain and apple pomace,” 2012, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2012.12.005.
- [34] C. Raghu Babu, H. Ketanapalli, S. Khasim Beebi, and V. Chaitanya Kolluru, “Adv Biotech & Micro Wheat Bran-Composition and Nutritional Quality: A Review”, doi: 10.19080/AIBM.2018.09.555754.
- [35] Matura, Woatthichai, and N. Nuanphan, “Sugar production from durian (*Durio zibethinus* Murray) peel by acid hydrolysis,” *Afr J Biotechnol*, vol. 12, no. 33, pp. 5244–5251, Aug. 2013, doi: 10.5897/ajb2013.12141.
- [36] “Alkaline delignification of lignocellulosic biomass for the production of fermentable sugar syrups.” Accessed: Mar. 08, 2024. [Online]. Available: <https://www.redalyc.org/journal/496/49671325021/html/>
- [37] N. M. Thani, S. Mazlina, M. Kamal, F. Saleena Taip, A. Sulaiman, and R. Omar, “Subcritical water hydrolysis for sugar recovery from bakery leftovers: kinetic and thermodynamic analysis”, doi: 10.1007/s13399-021-01416-x/Published.
- [38] M. Tsai *et al.*, “Extraction of Phytochemicals from Maypole Apple by Subcritical Water,” *Foods*, vol. 11, no. 21, Nov. 2022, doi: 10.3390/foods11213453.
- [39] C. Ucuncu, C. Tari, H. Demir, A. O. Buyukkileci, and B. Ozen, “Dilute-acid hydrolysis of apple, orange, apricot and peach pomaces as potential candidates for bioethanol production,” *J Biobased Mater Bioenergy*, vol. 7, no. 3, pp. 376–389, Jul. 2013, doi: 10.1166/jbmb.2013.1361.
- [40] B. Gullón, E. Falqué, J. Luis Alonso, and J. Carlos Parajó, “Evaluation of Apple Pomace as a Raw Material for Alternative Applications in Food Industries”.
- [41] S. Devi, A. Dhaka, and J. Singh, “ACID AND ALKALINE HYDROLYSIS TECHNOLOGIES FOR BIOETHANOL PRODUCTION: AN OVERVIEW”.
- [42] J. M. Prado, D. Lachos-Perez, T. Forster-Carneiro, and M. A. Rostagno, “Sub-and supercritical water hydrolysis of agricultural and food industry residues for the production of fermentable sugars: A review,” 2015, doi: 10.1016/j.fbp.2015.11.004.
- [43] W. Abdelmoez, S. M. Nage, A. Bastawess, A. Ihab, and H. Yoshida, “Subcritical water technology for wheat straw hydrolysis to produce value added products,” 2014, doi: 10.1016/j.jclepro.2014.02.011.
- [44] M. S. T. Amândio, J. M. S. Rocha, and A. M. R. B. Xavier, “Enzymatic Hydrolysis Strategies for Cellulosic Sugars Production to Obtain Bioethanol from Eucalyptus globulus Bark,” *Fermentation*, vol. 9, no. 3, Mar. 2023, doi: 10.3390/fermentation9030241.
- [45] J. M. Prado *et al.*, “The Journal of Supercritical Fluids Hydrolysis of sugarcane bagasse in subcritical water,” *J. of Supercritical Fluids*, vol. 86, pp. 15–22, 2014, doi: 10.1016/j.supflu.2013.11.018.

- [46] L. Jin, N. Yu, Y. Jiang, Y. Li, and X. Wang, "Heterotrophic culture of *Spirulina platensis* improved its growth and the study of its nutritional effect," *J Emerg Investig*, 2023, doi: 10.59720/23-116.
- [47] C. Rajasekaran *et al.*, "Effect of Modified Zarrouk's Medium on Growth of Different *Spirulina* Strains," 2016. [Online]. Available: <http://wjst.wu.ac.th>
- [48] H. S. Yun, Y. S. Kim, and H. S. Yoon, "Effect of Different Cultivation Modes (Photoautotrophic, Mixotrophic, and Heterotrophic) on the Growth of *Chlorella* sp. and Biocompositions," *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 9, Dec. 2021, doi: 10.3389/fbioe.2021.774143.