

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

Valorizzazione sostenibile di farina di nocciola disoleata: estrazione e caratterizzazione proteica per applicazioni in biotecnologie alimentari



Relatori

prof.ssa Debora Fino

dott.ssa Silvia Fraterrigo Garofalo

Candidato

Alessandro Lapolla

A.A. 2024/2025

Indice

Abstract.....	6
1. Introduzione.....	8
2. Materiali e metodi.....	38
3. Risultati.....	43
4. Conclusioni.....	49
Ringraziamenti	52
Lista delle figure.....	54
Bibliografia.....	57

Abstract

La crescente richiesta di fonti proteiche è in rapido aumento a causa delle pressioni esercitate dai cambiamenti climatici, dall'espansione demografica e dalle criticità che affliggono la sicurezza alimentare e i sistemi produttivi globali. Tutto questo induce alla ricerca di scarti come ulteriore fonte di proteine e suggerisce l'adozione di metodi di estrazione sostenibili per ridurre l'impatto ambientale.

La farina di nocciola (*Corylus avellana* L.) disoleata, è un sottoprodotto derivante dalla produzione di olio di nocciole e ricco in proteine vegetali.

I solventi eutettici (in inglese Deep Eutectic Solvents, DES) sono un'alternativa sostenibile ai metodi tradizionali di estrazione delle proteine, tra cui l'estrazione alcalina seguita da precipitazione isoelettrica (ALKIS). Questi solventi si differenziano dagli organici tradizionali perché sono biodegradabili, più ecologici, meno tossici, più economici e derivanti da fonti rinnovabili anziché da combustibili fossili.

L'obiettivo della tesi è comparare i metodi di estrazione tradizionali delle proteine con le tecniche di estrazione basate su solventi eutettici, focalizzandosi sul rendimento proteico, l'efficienza e l'integrità della struttura secondaria. L'analisi FTIR ha dimostrato che le proteine estratte con DES contenevano una proporzione più elevata di strutture β -foglietto, indicando una maggiore stabilità; al contrario, il metodo tradizionale, nonostante presentasse un contenuto proteico più alto, conteneva una maggiore quantità di proteine con strutture bobine casuali, indicando una parziale denaturazione.

In conclusione, il lavoro di tesi ha messo in risalto le differenze tra le tecniche di estrazione tradizionali e quelle con DES, evidenziando il potenziale dei solventi eutettici come metodo efficace per l'estrazione di proteine di alta qualità dalla biomassa di nocciolo, contribuendo allo sviluppo dell'economia circolare. Le ricerche future dovrebbero focalizzarsi sull'ottimizzazione dei parametri di estrazione con DES, al fine di massimizzare il rendimento proteico.

1. Introduzione

1.1 Vortex

Vortex SRL SB (**Figura 1**) è una start-up italiana, nata nel 2021 grazie a Lorenzo Picco e Simone Piccolo, che lavora secondo i principi cardini dell'economia circolare, valorizzando sottoprodotti e scarti derivanti dall'industria agro-alimentare e che possiedono ancora un certo potenziale, trasformandoli in materie dall'alto valore aggiunto impiegabili all'interno dei settori pet, food, cosmetico, nutraceutico. La start-up, inoltre, si impegna nel ridurre le emissioni di CO₂ utilizzando processi di lavorazione alimentati da energie rinnovabili. Vortex è un team di persone con competenze diverse e complementari, composto da ingegneri chimici ed esperti del settore, scienziati ambientali, gastronomi e strateghi di marketing. La start-up beneficia del supporto tecnologico e della partnership di aziende professionali tra cui Reynaldi Srl, Augusto Bellinvia Srl, Procemsa Spa, Microglass Srl, Andriani Spa, NDA Srl e altre.¹



Figura 1. Logo Vortex.¹

Vortex ha le sue radici nella campagna piemontese di Barge (CN), nel nord Italia, ai piedi del Monviso. Il processo generava una grande quantità di residui destinati allo smaltimento: da qui, i due fondatori di Vortex, con la collaborazione della già citata azienda cosmetica Reynaldi Srl, hanno sviluppato il primo ingrediente funzionale per uso cosmetico, ricavato dalla sansa di mele.¹

Nasce, quindi, il brand Naste Beauty (**Figura 2**) con la quale Vortex si presenta sul mercato: una linea di cosmetici organici e 100% riciclati ottenuti attraverso fonti di energia rinnovabile e partnership locali, con un impatto positivo sull'ambiente, sulle persone e sul territorio. Il brand si è ampliato nel tempo, partendo con una linea di prodotti per la cura del viso a base di sansa di mela 100% upcycled, inizialmente composta da quattro prodotti. L'ingrediente chiave di questa linea è la pasta di mele, ottenuta dalla sansa di mele, un sottoprodotto dei succhi di frutta prodotti da mele certificate BIO.¹

La sansa viene essiccata a temperature che preservano i composti bioattivi naturali della mela per ottenere un ingrediente naturalmente antiossidante, ricco di nutrienti e composti bioattivi come polifenoli, fibre, vitamine e carotenoidi. Successivamente, sono state sviluppate due nuove linee che si distanziano leggermente dal tema della mela.¹



Figura 2. Prodotti Mela Naste Beauty.¹

La seconda linea, a base di nocciola (**Figura 3**), utilizza farina disoleata di nocciola per creare una gamma di prodotti per la cura dei capelli.¹



Figura 3. Prodotti Nocciola Naste Beauty.¹

Infine, l'ultima linea presentata riavvicina il brand al mondo della mela, proponendo un mix di pasta di mele e spirulina, sviluppato in collaborazione con ApuliaKundi SRL (**Figura 4**). Questo brand ha dato origine a una nuova linea di prodotti per la cura del corpo.¹



Figura 4. Linea Spirulina Naste Beauty & ApuliaKundi.¹

1.2 Economia circolare

1.2.1 Un modello sostenibile

L'economia circolare è un modello economico sostenibile che mira a minimizzare gli sprechi e massimizzare l'uso delle risorse (**Figura 5**).² L'obiettivo è trasformare “lo scarto di qualcuno nella risorsa di qualcun altro”.³

A differenza del modello economico lineare, o “take-make-dispose” (prendi, usa, getta), l'economia circolare si concentra sul chiudere i cicli industriali, riducendo l'estrazione di nuove risorse ed estendendo la vita dei prodotti, così da ridimensionare l'impatto ambientale. Se l'economia lineare è paragonabile ad un fiume (flusso unidirezionale di risorse), allora l'economia circolare è assimilabile ad un lago (ciclo continuo di risorse). Il primo modello non è sostenibile in un mondo con risorse limitate.²

Sebbene il termine economia circolare sia relativamente recente, i concetti che lo sottendono non sono nuovi e, anzi, già nel XIX secolo, si possono rintracciare idee simili nell'uso dei rifiuti come risorsa. Concettualmente, il modello si basa su principi derivanti dall'economia ecologica, ambientale e industriale.⁴

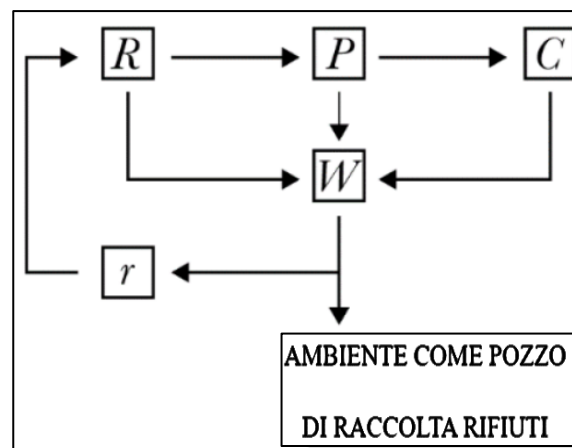


Figura 5. Un sistema economico circolare.
Legenda: *R* = risorse, *P* = produzione, *C* = consumo, *U* = utilità, *W* = rifiuti, *r* = riciclo.²

1.2.2 Vantaggi e svantaggi

Il vantaggio principale dell'economia circolare può essere riscontrato a livello ambientale, in quanto, limitando il consumo di risorse vergini e minimizzando la produzione di rifiuti, vengono ridotte le emissioni di gas climalteranti (anche fino al 70% in alcuni paesi europei).²

In termini di occupazione, l'economia circolare favorisce la creazione di nuovi posti di lavoro qualificati nei settori della riparazione, della rigenerazione, del riciclo e della gestione dei materiali.² In Europa si stima una crescita della produttività delle risorse fino al 3% all'anno e conseguente aumento del PIL del 7% rispetto allo sviluppo attuale.⁴

Una delle principali critiche all'economia circolare è che ne esistono oltre cento definizioni distinte: il termine può assumere valenze diverse per persone diverse, cadendo nel tranello dell'ambiguità e portando a frammentazione concettuale e mancanza di forza paradigmatica. Un'ulteriore critica è legata ai principi termodinamici fondamentali, spesso ignorati: è impossibile creare o distruggere la materia, quindi i cicli materiali non possono mai essere considerati completamente chiusi a causa della dissipazione e dell'entropia; ogni processo di riciclo e riutilizzo comporta perdite sia di materiale che di qualità. Inoltre, barriere tecniche, economiche, sociali e culturali ostacolano lo sviluppo di modelli di business circolari efficaci.⁵

1.2.3 Gestione degli scarti alimentari

Nel 1861 John Tyndall è stato il primo ad affermare che la CO₂ può efficacemente intrappolare il calore e, successivamente, nel 1896 Arrhenius ha pubblicato dei lavori che approfondiscono la relazione tra la concentrazione di anidride carbonica atmosferica e la temperatura globale. Nonostante ciò, solo negli ultimi 50 anni è stato riconosciuto il potenziale di riscaldamento globale (GWP) di altri gas climalteranti, ovvero quei gas che nell'atmosfera intrappolano il calore contribuendo al riscaldamento globale, come N₂O, CH₄ e clorofluorocarburi (CFC). L'influenza antropica sul riscaldamento globale ha guadagnato credibilità sufficiente per innescare l'attività politica internazionale, portando alla costituzione, nel 1990, del Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC).⁶

Secondo la FAO (Food and Agriculture Organization), ovvero l'organizzazione delle Nazioni Unite che si occupa di alimentazione e agricoltura, si definisce “food loss” la perdita involontaria di cibo durante la raccolta, la gestione post-raccolta, la lavorazione e la distribuzione; al contrario “food waste” è il cibo perso nelle fasi di vendita al dettaglio e consumo.⁹

Gli scarti alimentari sono responsabili di circa l'8-10% delle emissioni globali di gas climalteranti, principalmente a causa della decomposizione anaerobica nei rifiuti solidi urbani e delle emissioni lungo l'intera filiera alimentare. Il cibo sprecato lungo la filiera, dalla produzione al consumo, comporta un uso superfluo di risorse come acqua, energia e suolo, amplificando l'impatto ambientale. Si generano emissioni di gas climalteranti non solo durante la decomposizione in discarica, ma anche in tutte le fasi produttive precedenti (coltivazione, trasformazione, trasporto e conservazione).⁷

Le quattro principali opzioni di trattamento degli scarti alimentari (**Figura 6**) sono:

- **Digestione Anaerobica:** un processo in cui i microrganismi scompongono il materiale biodegradabile in assenza di ossigeno, producendo biogas (principalmente CH₄ e CO₂) e digestato (un residuo ricco di nutrienti). Questo processo prevede la raccolta differenziata degli scarti alimentari, comporta un impatto ambientale relativamente ridotto (inclusa una possibile diminuzione del riscaldamento globale) e consente la produzione di energia (elettricità e calore) attraverso il biogas. Tuttavia, può risultare costoso e contribuire all'acidificazione dell'ambiente e all'emissione di particolato.
- **Compostaggio:** un processo che avviene in un ambiente chiuso e controllato, consentendo una maggiore velocità di decomposizione e il controllo delle emissioni. È considerata la tecnica meno sostenibile dal punto di vista ambientale, in quanto ha elevato consumo energetico e basso ritorno di fertilizzanti dal compost, ma comunque recupera alcuni nutrienti dal compostaggio.
- **Incenerimento con recupero di energia:** un processo di combustione dei rifiuti solidi per generare calore, che viene poi utilizzato per produrre vapore per la generazione di elettricità. Ha i costi di ciclo di vita più bassi (per tonnellata di rifiuti trattati) e permette di generare elettricità e calore riducendo la dipendenza dai combustibili fossili, anche se causa l'aumento dello smog estivo e l'esaurimento di metalli.
- **Discarica:** un processo di smaltimento dei rifiuti interrando in un sito designato, che può includere la raccolta di gas di discarica per la produzione di energia. Risulta l'opzione più costosa e peggiore per quanto riguarda gli impatti ambientali, sia a causa delle emissioni di metano che della necessità di gestire il percolato.¹⁰

Inoltre, gli scarti alimentari rappresentano una risorsa preziosa spesso sottovalutata, in quanto ricchi di proteine, carboidrati, vitamine, fibre e altri composti bioattivi. Per questo motivo, è fondamentale adottare ulteriori strategie mirate al loro recupero e valorizzazione, evitando inutili sprechi.⁷ Nell'ambito dell'agricoltura cellulare, la valorizzazione proteica rappresenta un elemento chiave per lo sviluppo di sistemi produttivi più sostenibili ed efficienti. Questo processo comprende diverse strategie innovative, come l'isolamento di proteine funzionali (quali fattori di crescita vegetali o proteine strutturali), la produzione di idrolizzati proteici da utilizzare come sostituti del fetale bovino, e il recupero di scarti vegetali (quest'ultimi sono usati per l'ottenimento di biomolecole impiegabili nei mezzi di coltura cellulare, come scaffold o supporti nutrizionali).⁸

In questo modo anche residui agricoli e alimentari, sono trasformati in risorse ad alto valore aggiunto per settori come quello cosmetico, nutraceutico e farmaceutico.⁷

Nel settore cosmetico, idrolizzati proteici vegetali trovano applicazione come agenti umettanti, filmogeni o ristrutturanti nei prodotti per la cura della pelle e dei capelli, grazie alla loro capacità di migliorare l'idratazione, l'elasticità e la protezione della barriera cutanea.¹⁸

In ambito farmaceutico, frazioni proteiche e peptidi derivati da scarti vegetali possono essere studiati come potenziali principi attivi naturali, vettori di rilascio o eccipienti bio-compatibili, con applicazioni in formulazioni innovative e sostenibili.⁷

In ambito nutraceutico, le proteine estratte da residui agricoli e alimentari possono essere sottoposte a processi di idrolisi enzimatica per ottenere peptidi bioattivi, i quali hanno dimostrato attività antiossidante, antinfiammatoria, immunomodulante e antipertensiva. Tali peptidi bioattivi risultano, quindi, ideali per lo sviluppo di integratori destinati alla prevenzione di patologie croniche legate allo stress ossidativo, al metabolismo lipidico o al sistema cardiovascolare. Inoltre, grazie al loro alto valore nutrizionale e alla buona digeribilità, le proteine vegetali recuperate possono essere utilizzate in alimenti fortificati o proteici destinati a sportivi, anziani, vegetariani o persone con esigenze nutrizionali specifiche.¹⁸

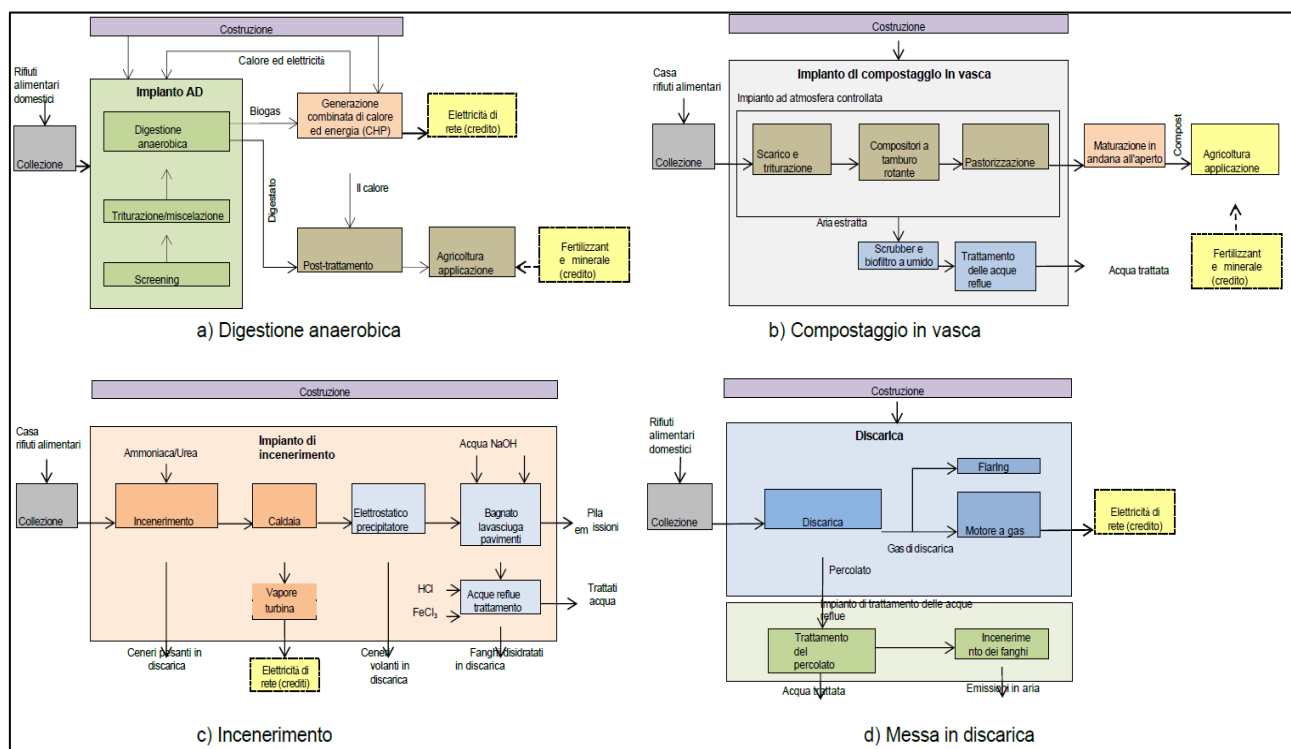


Figura 6. Fasi del ciclo di vita considerate per i quattro metodi di trattamento dei rifiuti alimentari. Le linee tratteggiate indicano i crediti di sistema.¹⁰

A livello globale, circa un terzo del cibo destinato al consumo umano viene sprecato o perso ogni anno, nonostante un numero crescente di persone soffra la fame (circa 690 milioni nel 2019: si stima che gli sprechi alimentari costino all'economia globale circa 936 miliardi di dollari all'anno e contribuiscano alle emissioni di gas climalteranti con 3,3 miliardi di tonnellate annui.⁷ L'Unione Europea (UE) ha fissato obiettivi ambiziosi per dimezzare lo spreco alimentare al dettaglio e al consumo entro il 2030 e ridurre le perdite alimentari lungo l'intera catena di approvvigionamento.⁸

1.3 L'industria della nocciola

1.3.1 Principali produttori

La Turchia è il principale produttore di nocciole (*Corylus avellana* L.) a livello mondiale, detenendo circa il 63% della produzione globale nel periodo 2016-2020.¹¹ La regione del Mar Nero, in Turchia, è particolarmente adatta alla coltivazione di nocciole grazie alle sue caratteristiche del suolo e del clima: “*Tombul*”, “*Palaz*”, “*Foşa*”, “*Çakıldak*”, “*Mincane*” sono le principali varietà di nocciola realizzate. L'Italia è al secondo posto, con circa il 10% della produzione mondiale, seguita da Georgia, Stati Uniti, Azerbaigian, Cina, Iran e Spagna.¹² La maggiore area di produzione nazionale è la provincia di Viterbo, in particolare la zona dei Monti Cimini.¹³ La principale cultivar di nocciola in questa zona è la “*Tonda Gentile Romana*” (**Figura 7**), registrata sotto il regime DOP (Denominazione di Origine Protetta).¹⁴ Le due varietà italiane con marchio IGP sono la “*Tonda di Giffoni*” e la “*Tonda Gentile delle Langhe*”.¹⁵



Figura 7. *Tonda Gentile Romana*.¹⁴

L'identificazione delle cultivar di nocciola si basa comunemente sui tratti morfologici dei chicchi e delle noci. Tuttavia, per una identificazione più accurata, soprattutto considerando l'origine geografica, è preferibile l'implementazione di marcatori genetici combinati con analisi statistiche.¹⁵

Le caratteristiche morfologiche (**Figura 8**) variano notevolmente tra le cultivar, con differenze significative in termini di dimensioni (lunghezza, larghezza, spessore), massa, sfericità del frutto e del chicco, e rapporto chicco/frutto: le cultivar provenienti da Polonia e Serbia tendono ad avere dimensioni maggiori, mentre quelle provenienti da Turchia e Iran hanno dimensioni inferiori. La sfericità è una caratteristica importante per la lavorazione industriale.¹⁵

Origine	Cultivar	Frutto				Nocciolo						
		Lunghezza (mm)	Larghezza (mm)	Spessore (mm)	Massa (g)	Sfericità (-)	Lunghezza (mm)	Larghezza (mm)	Spessore (mm)	Massa (g)	Sfericità (-)	Frazione di Nocciolo (%)
Cile	Tonda di Giffoni	-	-	-	2.90-3.10	-	-	-	-	1.30-1.40	-	44.3-45.0
Croazia	Istarski Duguljasti	-	-	-	2.65-3.17	-	-	-	-	1.18-1.35	-	43.50
Iran	Pashmine	17.81	16.09	14.09	1.38	0.89	13.52	8.09	8.34	0.48	0.71	33.21
	Barcelona	-	-	-	3.30-3.80	-	-	-	-	-	-	39-42
Oregon	Yamhill	-	-	-	2.30	-	-	-	-	-	-	-
	Jefferson	-	-	-	3.70	-	-	-	-	-	-	-
Italia	Tonda Gentile Romana	-	-	-	2.50	-	-	-	-	1.18	1.03	47.22
	Tonda di Giffoni	-	-	-	2.65	-	-	-	-	1.17	0.98	43.63
	Tonda Gentile delle Langhe	-	-	-	2.48	-	-	-	-	1.18	1.01	45.60
	Barcelonès	21.40	20.97	18.97	2.70	0.85	16.64	13.99	12.11	1.22	0.85	44.9
Polonia	Cosford	24.17	16.07	14.32	2.41	0.73	19.68	11.42	10.08	1.09	0.65	45.7
	Katalonès	21.52	20.97	18.88	2.24	0.95	16.46	13.34	11.36	1.17	0.81	43.9
	Daviana	-	-	-	2.46	-	-	-	-	1.22	-	49.5
Portogallo	F. Coutard	-	-	-	3.39	-	-	-	-	1.38	-	40.6
	M. Bollwiller	-	-	-	2.66	-	-	-	-	1.27	-	47.9
	Corabel	18.59	17.25	15.24	2.18	-	-	-	-	0.89	0.91	42.0
Serbia	Furfulak	21.72	24.64	21.29	4.00	-	-	-	-	1.76	1.04	44.9
	Ennis	26.83	22.64	20.59	3.97	-	-	-	-	1.61	0.86	41.0
	Negret	-	-	-	2.01	-	-	-	-	2.05	-	49.14
Spagna	Pautet	-	-	-	2.05	-	-	-	-	1.01	-	49.07
	Palaz	15.66	18.16	16.17	1.68	1.06	11.16	13.91	12.37	0.89	1.12	45.88
Turchia	Çakıldak	18.55	16.80	15.67	1.59	0.91	13.97	12.60	11.14	0.81	0.90	46.40
	Tombul	16.52	16.66	15.79	1.48	0.98	11.63	12.69	11.96	0.92	1.04	47.31

Figura 8. Caratteristiche morfologiche del frutto e del nocciolo di cultivar di nocciola di diversa origine.¹⁵

1.3.2 Composizione chimica e valori nutrizionali

La nocciola è riconosciuta come uno dei frutti secchi più nutrienti (**Figura 9**), infatti è ricca in grassi (62-64%), proteine (7-24%) e carboidrati (7-21%); ma anche in fibre, acidi grassi insaturi, steroli e micronutrienti essenziali come tocoferoli, polifenoli, minerali (potassio, calcio, magnesio, selenio) e vitamine del gruppo B. Il principale componente bioattivo è l' α -tocoferolo (69-96% del totale dei tocoferoli), una forma attiva della vitamina E, che ha proprietà antiossidanti (aiuta a combattere i radicali liberi, minimizzando gli effetti dell'invecchiamento cellulare) e può prevenire malattie croniche, come le cardiovascolari e la demenza (Alzheimer).¹⁶ L'acido oleico è l'acido grasso predominante, e dona al frutto maggiore stabilità ossidativa e più lunga durata di conservazione; seguito dall'acido linoleico, palmitico, stearico e linolenico: un alto contenuto di acido linoleico riduce la stabilità ossidativa e aumenta il rischio di irrancidimento.¹⁵

Origine	Cultivar	Olio (%)	Proteine (%)	Carboidrati (%)	Ceneri (%)	Umidità (%)
Croazia	<i>Istarski Duguljasti</i>	63.30–64.38	10.87–13.13	18.87–19.78	2.51–2.59	3.11–3.21
Iran	<i>Pashmine</i>	50.81	24.61	14.56	3.83	-
	<i>Tonda Gentile Romana</i>	62.57	-	-	-	-
Italia	<i>Tonda di Giffoni</i>	61.30	14.00	18.08	2.34	4.28
	<i>Tonda Gentile delle Langhe</i>	59.25	-	-	-	-
	<i>Barcelona</i>	59.10	18.20	16.30	2.00	4.40
Oregon	<i>Yamhill</i>	65.00	14.50	15.70	2.20	2.70
	<i>Jefferson</i>	57.10	17.10	19.80	2.20	3.90
	<i>Barceloński</i>	62.43	12.15	16.45	2.79	6.18
Polonia	<i>Cosfrod</i>	59.92	12.52	21.79	2.32	3.45
	<i>Kataloński</i>	62.54	11.50	18.69	2.81	4.46
	<i>Davianna</i>	56.30	15.70	19.90	5.2	3.0
Portogallo	<i>F. Coutard</i>	60.60	14.80	14.40	4.6	5.6
	<i>M. Bollwiller</i>	61.60	15.10	15.60	4.2	3.5
Spagna	<i>Negret</i>	67.45	16.05	-	2.60	-
	<i>Pautet</i>	66.29	7.03	-	2.46	-
	<i>Palaz</i>	58.21	22.06	9.79	2.29	-
Turchia	<i>Çakıldak</i>	57.39	20.85	12.16	2.22	-
	<i>Tombul</i>	60.76	21.21	7.82	2.36	-

Figura 9. Composizione chimica di cultivar di nocciola di diversa origine.¹⁵

1.3.3 L'industria della nocciola: applicazioni, trasformazione e prospettive future

Nel nostro paese, le principali applicazioni della nocciola nell'industria alimentare includono il settore del cioccolato (70%), dei gelati e della pasticceria (20%), e solo il 10% della produzione è destinato al consumo diretto. Per quest'ultima tipologia di consumo, infatti, le nocciole devono avere un nucleo con un diametro superiore ai 20 mm, un guscio sottile e un aspetto attraente. Le varietà sferiche sono preferite per i prodotti che richiedono frutti interi, quelle allungate sono utilizzate per nocciole tritate o pasta di nocciole.¹⁶

Uno dei principali prodotti dell'industria della nocciola è l'olio che, oltre ad essere commestibile, è ampiamente utilizzato in cosmetica per la preparazione di creme, in modo particolare per le pelli secche grazie alle sue proprietà emulsionanti. Dopo la raccolta del frutto, il contenuto di umidità è compreso tra il 25% e il 30%, ma questo deve essere ridotto al 6% circa per garantire un'opportuna conservazione del prodotto: un'essiccazione inadeguata può causare la rottura del guscio, con conseguente rischio di contaminazione microbica e deterioramento della qualità della nocciola. L'essiccazione può avvenire all'aperto o in essiccatoi specializzati, spesso gestiti da cooperative agricole.¹⁵

Le nocciole vengono commercializzate sia in guscio (5-10% del raccolto mondiale) che come granella (90-95% del raccolto mondiale). La granella è principalmente utilizzata nell'industria dolciaria, in particolare per la produzione di cioccolato (circa l'80% della granella).¹²

Per l'industria alimentare, il processo di tostatura riveste un ruolo fondamentale, in quanto consente di rimuovere la pellicola, inattivare gli enzimi, eliminare i microrganismi e ridurre l'attività dell'acqua. In questa fase, risultano particolarmente importanti parametri quali la resa, la rotondità, il distacco del pericarpo, la perdita di peso e la fragilità del nucleo. Durante la torrefazione delle nocciole i due processi chimici principali che si verificano sono la caramellizzazione e reazione di Maillard, i quali migliorano il colore, la consistenza croccante e l'aroma della nocciola. Con l'avanzare del processo aumentano i composti con attività antiossidante, ma possono verificarsi alcune perdite nutrizionali e la formazione di composti indesiderati come l'idrossimetilfurfurale.¹⁶

Negli ultimi 10 anni, il consumo di frutta secca è aumentato significativamente, stimolato dalla consapevolezza dei suoi benefici per la salute. In Italia, il consumo pro capite è aumentato da 8.09 kg/anno nel 2018 a 11.48 kg/anno nel 2021. Questo stimola la ricerca di soluzioni innovative per il riutilizzo degli scarti dell'industria della nocciola, spinto da considerazioni ambientali (riduzione degli sprechi, economia circolare), economiche (creazione di nuovi prodotti e mercati) e sociali (promozione di pratiche agricole sostenibili).¹¹

1.3.4 Sottoprodotti della nocciola

I sottoprodotti derivanti dalla lavorazione delle nocciole (**Figura 10**) includono: il guscio verde esterno del frutto (involucro), la foglia, il guscio della nocciola, la pellicina e la farina di estrazione dell'olio, detta anche pannello. Ciascuno di questi materiali può essere valorizzato e trasformato in prodotti a valore aggiunto.¹¹

Gli involucri verdi della nocciola sono ricchi di lignocellulosa, perciò sono adatti alla produzione di bioetanolo e altri prodotti chimici di valore, come l'acido levulinico e l'idrossimetilfurfurale; possono essere utilizzati anche come fertilizzanti e ammendanti del suolo e per l'estrazione di composti fenolici con attività antiossidante.¹¹

Le foglie, invece, contengono composti fenolici e diarileptanoidi con attività antiossidante e antimicrobica, infatti sono state usate nella medicina popolare per trattare infiammazioni, eruzioni cutanee, flebiti, vene varicose e sintomi emorroidali. Studi recenti confermano il loro potenziale nell'inibire i radicali liberi e combattere alcuni batteri.¹¹

I gusci di nocciole (circa 50% del peso totale del frutto) possono essere valorizzati per:

- materiali compositi, come riempitivi in materiali plastici biodegradabili (PBAT) o per la creazione di pannelli truciolari (particle board) senza l'aggiunta di leganti chimici;
- produzione di energia, come biomassa per combustione diretta o pirolisi per generare calore, energia o biochar;
- estrazione di molecole, per ottenere lignina con proprietà antiossidanti in ambito cosmetico;
- mangimi animali, come parte della dieta, approvato dalla legislazione europea (Regolamento UE 68/2013); infatti, se utilizzati come integratori nell'alimentazione del bestiame, migliorando la durata di conservazione della carne, il contenuto di acidi grassi nel latte e influenzando positivamente la composizione del microbiota ruminale;
- assorbenti e abrasivi, come materiale per sabbatura;
- applicazioni biotecnologiche, come substrato per la produzione di enzimi, bioetanolo o altri metaboliti industriali tramite processi fermentativi;
- applicazioni nutraceutiche, in quanto gli estratti ottenuti dai gusci possono mostrare attività antiossidante, antimicrobica o antinfiammatoria, rendendoli candidati promettenti per lo sviluppo di integratori alimentari o ingredienti funzionali.¹⁸

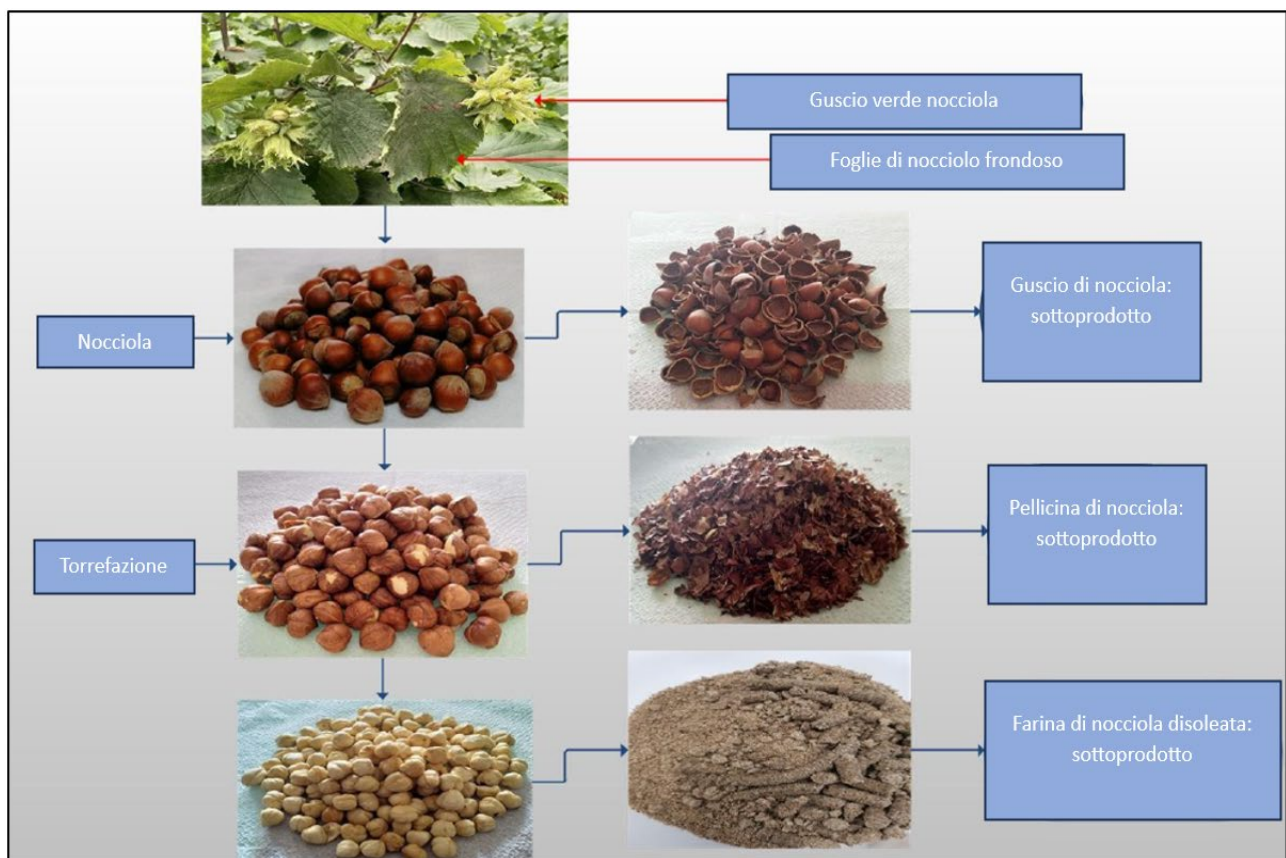


Figura 10. Scarti della nocciola.¹¹

Le pellicine sono ricche di polifenoli e possono essere riutilizzate per l'estrazione di antiossidanti in applicazioni alimentari, farmaceutiche o cosmetiche. Sono anche usate come ingredienti funzionali aggiunti a prodotti alimentari, per aumentarne il contenuto di fibre e di attività antiossidante.¹⁸

La farina (parzialmente) disoleata, che deriva dal processo di estrazione dell'olio di nocciola è considerata un sottoprodotto industriale. È composta da proteine, lipidi, carboidrati e ceneri, ma anche fibre e composti bioattivi: per questo motivo viene comunemente impiegata come componente in prodotti alimentari come il latte di nocciola, le bevande funzionali (kefir), creme spalmabili, cioccolato, gelati, yogurt e per arricchire prodotti da forno. Inoltre, i suoi peptidi bioattivi, derivati dall'idrolisi enzimatica o dalla fermentazione microbica, possono essere utilizzati per sviluppare alimenti con proprietà antipertensive e antidiabetiche.¹¹

L'utilizzo dei rifiuti di nocciola si inserisce in un modello di economia circolare, riducendo gli sprechi e creando valore da sottoprodotti. Le ricerche future dovrebbero concentrarsi sull'ottimizzazione dei processi di estrazione, sull'analisi del ciclo di vita (LCA), sulla valutazione della stabilità dei composti bioattivi negli alimenti e sulla scoperta di nuove applicazioni nel settore alimentare, farmaceutico e cosmetico.¹¹

1.3.5 Olio di nocciola

Il processo di ottenimento dell'olio di nocciola prevede diverse fasi, che possono includere o meno un trattamento enzimatico preliminare e/o un condizionamento termico. L'estrazione industriale dell'olio si realizza tramite pressatura a freddo, da considerarsi parziale, in quanto lascia nel pannello un residuo di olio del 10-12%. Di seguito i passaggi principali del processo di estrazione dell'olio.¹⁹

- Trattamento enzimatico (opzionale): i semi puliti vengono macinati e cotti a 100 °C per 20 minuti. L'idrolisi enzimatica viene effettuata per 6 ore con un rapporto enzima/substrato dell'1% (p/p) utilizzando una miscela di enzimi commerciali (es. Olivex/Celluclast = 1/1) a 40 °C, con un'umidità del 45%. Dopo il trattamento, gli enzimi vengono inattivati per 20 minuti a 100 °C. Questo trattamento può migliorare l'estrazione dell'olio tramite pressatura grazie al lavoro degli enzimi che degradano le pareti cellulari del seme. Inoltre, migliora la digeribilità delle proteine nel cake (altro nome per indicare lo scarto dell'olio, il pannello).
- Condizionamento termico (opzionale): i semi essiccati vengono cotti a 60 °C per 5 minuti prima della pressatura. Il processo aumenta leggermente il contenuto proteico dei cake, soprattutto se combinato con il trattamento enzimatico, ma può influenzare la digeribilità, riducendola a causa di reazioni di imbrunimento tra proteine e zuccheri liberati dagli enzimi. Il condizionamento termico influisce anche sulle capacità di assorbimento di acqua e olio.²⁰

L'uso di temperature di pressatura più basse (fase successiva) o la pressatura a freddo (evitando questo secondo step di condizionamento termico) riduce l'efficienza dell'estrazione.

- Pressatura: i campioni vengono essiccati in un forno a vuoto a 60 °C fino a raggiungere un'umidità del 3-4%. La pressatura viene effettuata in una pressa idraulica manuale da laboratorio per 20 minuti, con una pressione compresa tra 29.4 MPa e 49 MPa. La pressatura lascia comunque un residuo di olio (10-12%) nel cake, che ne limita l'uso alimentare diretto.²⁰

1.3.6 Farina di nocciola disoleata

La farina di nocciola disoleata è un prodotto di scarto derivante dall'estrazione dell'olio dalle nocciole. È ricca di proteine, fibre e altri nutrienti, rendendola una potenziale fonte di ingredienti funzionali per l'industria alimentare.¹¹

Da studi effettuati sulla varietà di nocciola cilena "*Guevina avellana*" (**Figura 11**), è stato riscontrato che:

- il condizionamento termico dei semi prima della pressatura non ha influenzato significativamente il contenuto proteico dei panelli, anche se quelli riscaldati presentano valori leggermente superiori, specialmente quelli trattati con enzimi;
- il trattamento enzimatico riduce il contenuto di fibre e migliora la digeribilità proteica dei semi pressati a freddo, ma la diminuisce nei panelli sottoposti a trattamento termico;
- la capacità di assorbimento di acqua e olio dei panelli da semi trattati con enzimi è risultata inferiore, mentre il trattamento termico prima della pressatura non ha influenzato significativamente la capacità di legare l'acqua;
- la capacità di gelificazione dei panelli pressati a freddo è risultata migliore di quella dei panelli trattati termicamente;
- le emulsioni dei panelli non trattati con enzimi e da semi pressati a freddo sono risultate più stabili.²¹

Dopo la pressatura, il pannello può essere ulteriormente lavorato per ottenere concentrati e isolati proteici (**Figura 12**). Il processo si articola secondo due fasi principali, ovvero l'estrazione proteica e l'ultrafiltrazione a membrana. Di seguito i passaggi principali del processo.²¹

- Sgrassatura (opzionale): i panelli residui, poiché contengono ancora un minimo residuo di olio (10-12%), possono essere ulteriormente sgrassati con esano in condizioni blande (temperatura ambiente) per tutta la notte. L'estrazione con esano è un metodo convenzionale, ma comporta rischi ambientali e tossicologici: in alternativa si possono utilizzare acqua o etanolo.²¹

- Estrazione proteica: i pannelli sgrassati vengono quindi sottoposti ad estrazione per 90 minuti a 35 °C con un rapporto liquido/solido di 12 g di acqua per grammo di pannello. Si lavora con un pH alcalino costante pari a 11.
- Separazione: le due fasi, solida e liquida, vengono separate tramite centrifugazione e filtrazione sottovuoto; una seconda fase di estrazione viene condotta dopo la separazione.
- Ultrafiltrazione a membrana: la fase liquida ottenuta dai pannelli pressati a freddo viene separata tramite membrane di ultrafiltrazione a causa delle difficoltà operative incontrate nella separazione tramite filtrazione sottovuoto. L'ultrafiltrazione viene eseguita attraverso membrane Omega Screen Channel con cut-off di 10 kDa e 5 kDa in serie. I concentrati proteici ottenuti da pannelli pressati a freddo sono prodotti raggruppando i retentati UF delle due fasi di estrazione, mentre quelli ottenuti da semi condizionati termicamente sono prodotti tramite UF dei filtrati sottovuoto raggruppati.
- Liofilizzazione: il prodotto proteico finale viene liofilizzato e analizzato per le proprietà nutrizionali e funzionali. Il permeato ottenuto dall'ultrafiltrazione può essere riciclato per ulteriori estrazioni.²¹

	Pressatura a freddo		Trattamento termico e pressatura	
	Controllata	Trattamento enzimatico	Controllata	Trattamento enzimatico
<i>Composizione</i>				
Contenuto Proteico (%)	19.9±0.51	20.0±0.69	20.7±1.41	22.8±0.73
Detergente neutro per fibre (%)	27.4±3.47	9.20±0.40	27.3 ±0.86	24.8±1.56
<i>Proprietà nutrizionali</i>				
Digestibilità in vitro (%)	75.8	80.0	78.0	74.4
<i>Proprietà funzionali</i>				
Capacità assorbimento acqua (g/g)	6.41±0.05	3.28±0.03	6.92±0.13	4.01±0.41
Capacità assorbimento olio (g/g)	3.30±0.26	2.53±0.14	3.56±0.48	2.58±0.01
LGC (%)	14	12	—	16
EAI (%)	4.20±0.26	2.20 ±0.50	5.70±0.30	4.0±0.27
ESI (%)	72.2±0.95	24.4±2.21	46.1±1.05	16.7±2.01

Figura 11. Composizione, proprietà nutritive e funzionali delle farine prodotte dalla varietà di nocciola cilena, Guevina avellana.²¹

	Pressatura a freddo		Trattamento termico	
	Controllata	Trattamento enzimatico	Controllata	Trattamento enzimatico
<i>Composizione</i>				
Contenuto proteico (%)	53.3±1.2	51.5±2.0	65.6±1.4	46.1±3.2
Zuccheri riduttori (%)	3.81	4.67	3.96	5.06
<i>Proprietà nutrizionali</i>				
Digestibilità in vitro (%) Lisina	75.8	80.0	78.0	74.4
disponibile (g/16 g N)	1.95	1.99	3.25	1.87
<i>Proprietà funzionali</i>				
Formazione schiuma (%)	37.6±2.21	51.1±4.36	127±2.12	132±11.3
Capacità assorbimento acqua (g/g)	0.96±0.09	1.94±0.09	0.39±0.005	0.32±0.03
Capacità assorbimento olio (g/g)	9.53±0.22	9.94±0.84	9.62±0.16	8.93±1.3
EAI (%)	85.9±7.49	95.7±3.59	252±5.13	317±3.53
ESI (%)	29.2±2.40	42.1±1.10	61.1±4.56	270±31.14

Figura 12. Composizione, proprietà nutritive e funzionali dei concentrati proteici ottenuti dalle farine disoleate prodotte dalla varietà di nocciola cilena, Guevina avellana.²¹

1.4 Estrazione di proteine derivanti da scarti dell'industria alimentare

1.4.1 Fabbisogno proteico e alternative sostenibili

La popolazione mondiale denutrita dovrebbe aumentare da 688 milioni a 841 milioni entro il 2030. Questo aumento è esacerbato da guerre, instabilità politica e difficoltà nella distribuzione di cibo economicamente accessibile alle popolazioni più povere. La dipendenza insostenibile dalle fonti tradizionali di proteine aumenta la pressione sulla sicurezza alimentare. La produzione di proteine di origine animale è un metodo ad alta intensità di risorse e nutrizionalmente inefficiente: costituisce il 18% dell'attuale approvvigionamento proteico globale e si prevede che la domanda di proteine della carne raddoppierà entro il 2050. Questi dati evidenziano gravi criticità ambientali, in particolare legate alla disponibilità di terra e acqua, oltre che alle emissioni di gas climalteranti.²⁴

Si stima che un terzo del cibo prodotto a livello globale sia sottoutilizzato per motivi legati alla logistica della domanda e dell'offerta. Secondo gli studi, ogni anno vengono sprecati 1,3 miliardi di tonnellate di cibo, una quantità sufficiente per sfamare 2 miliardi di persone in tutto il mondo. Questa tendenza è evidente sia nelle regioni sviluppate, con eccessiva nutrizione, sia nei paesi meno sviluppati, con tassi crescenti di denutrizione. I sistemi waste-to-protein (W2P) sono presentati come una soluzione potenziale per affrontare sia la fame globale che la gestione dei rifiuti.²⁴

La crescente richiesta di fonti proteiche è in rapido aumento, spinta da una combinazione di fattori che mettono sotto stress la sicurezza alimentare e i sistemi produttivi globali. Tra le principali criticità vi sono la scarsità di risorse naturali, la perdita di biodiversità agricola, l'aumento dei costi energetici e la vulnerabilità delle catene di approvvigionamento alimentare, acuita da eventi geopolitici e crisi sanitarie globali. Inoltre, i cambiamenti climatici stanno compromettendo la produttività agricola in molte regioni del mondo, a causa di eventi meteorologici estremi, desertificazione, siccità e instabilità stagionali. Queste pressioni, unite alla crescita demografica e all'urbanizzazione, generano una domanda alimentare sempre più elevata e diversificata, aggravando ulteriormente la necessità di individuare fonti proteiche alternative, sostenibili e resilienti.⁹

Tutto questo induce all'adozione di proteine alternative, ovvero quelle frazioni proteiche ottenute con logiche di produzione diverse dall'allevamento intensivo di mammiferi, volatili e pesci. Il settore delle proteine alternative è destinato a una crescita significativa, con previsioni di raggiungere un valore di 140 miliardi di dollari entro il 2030. Le proteine alternative possono essere prodotte da piante o microrganismi, con la fermentazione e l'agricoltura cellulare che giocano un ruolo chiave nella produzione di carne, uova e latticini "animal-free".²⁵

Le proteine vegetali (plant-based) vengono estratte dalle piante e combinate con altri ingredienti vegetali: alcuni esempi includono l'Impossible Burger, realizzato con soia geneticamente modificata e leghemoglobina di soia per il "sanguinamento", e la Beyond Meat, a base di riso, piselli e fagioli mung.²⁵ La fermentazione è cruciale per la produzione di proteine a base microbica e di latticini "animal-free". Nella fermentazione tradizionale i microrganismi sono impiegati per riconvertire gli ingredienti in nuovi prodotti alimentari, mentre la fermentazione di biomassa punta a generare grandi volumi di cellule stesse, servendosi di colture che amplificano la loro crescita esponenziale. Infine, la fermentazione di precisione utilizza ospiti microbici come "fabbriche cellulari" per produrre specifici prodotti come vitamine (es. B12, B2) e proteine lattiero-casearie "animal-free".

L'agricoltura cellulare è un settore emergente della bioeconomia che mira alla produzione di alimenti e ingredienti attraverso colture cellulari, invece che mediante l'allevamento o la coltivazione tradizionale. Essa comprende tecnologie come la fermentazione di precisione, impiegata per produrre specifiche proteine o molecole bioattive tramite microrganismi geneticamente modificati, e il cibo coltivato (cell-based food), ovvero la produzione in vitro di tessuti animali o vegetali per scopi alimentari. Nell'ambito dell'agricoltura cellulare è possibile: isolare proteine funzionali, dai fattori di crescita vegetali alle proteine strutturali; ottenere idrolizzati proteici da impiegare come substrati nei bioreattori per la crescita cellulare; e valorizzare scarti vegetali trasformandoli in biomolecole da integrare nei mezzi di coltura cellulare, dove possono fungere da scaffold (impalcature tridimensionali) o da supporti nutritivi per lo sviluppo e la differenziazione delle cellule.⁶⁵

1.4.2 Estrazione (e precipitazione) delle proteine

Il primo step dell'estrazione proteica coincide con la macinazione del campione, ovvero la sua riduzione in pezzatura: i metodi di macinazione comuni includono sonicazione, omogeneizzazione ad alta pressione, filtrazione, permeabilizzazione con solventi organici, shock ipotonico; la scelta del metodo dipende dal tipo di proteine e dalla robustezza delle cellule. Le proteine vengono solubilizzate a partire da matrici biologiche quali tessuti, colture cellulari o fluidi fisiologici. Le proteine idrofobiche sono quelle che hanno una maggiore affinità con gli ambienti non polari, dunque necessitano di metodi di estrazione specifici (estrazione con fenolo o con miscele di cloroformio/metanolo), ovvero con solventi tali da solubilizzare le proteine idrofobiche separandole da componenti idrofile (carboidrati e acidi nucleici).²⁶

La precipitazione proteica (**Figura 13**) è una tecnica utilizzata per concentrare le proteine prima delle successive fasi analitiche, il cui principio fondamentale consiste nell'alterare il potenziale di solvatazione del solvente, diminuendo così la solubilità del soluto mediante l'aggiunta di un reagente.²⁶

La precipitazione offre un elevato recupero delle proteine e viene preferita ad altre tecniche come l'ultrafiltrazione o la cromatografia ad affinità, poiché quest'ultime possono portare a perdite a causa del legame non specifico delle proteine alle membrane o alle fasi stazionarie.²⁶

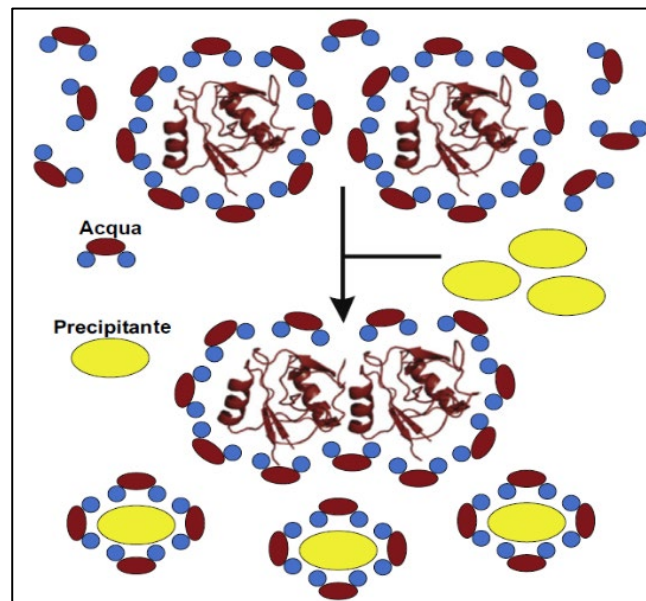


Figura 13. Il principio base del meccanismo di precipitazione delle proteine.²⁶

Il “salting-in” è una tecnica di precipitazione in cui si aumenta la forza ionica aggiungendo sale; ciò favorisce l'idratazione della proteina perché intensifica le sue interazioni con l'acqua. Tuttavia, ad alte concentrazioni saline, la solubilità delle proteine diminuisce rapidamente, e questo facilita la precipitazione, o “salting out”: l'alta concentrazione di sale sottrae acqua allo strato di solvatazione intorno alle proteine, esponendo le regioni idrofobiche e favorendo le interazioni proteina-proteina (**Figura 14**).²⁶ Il solfato di ammonio e il cloruro di sodio sono i sali neutri più utilizzati.²⁶

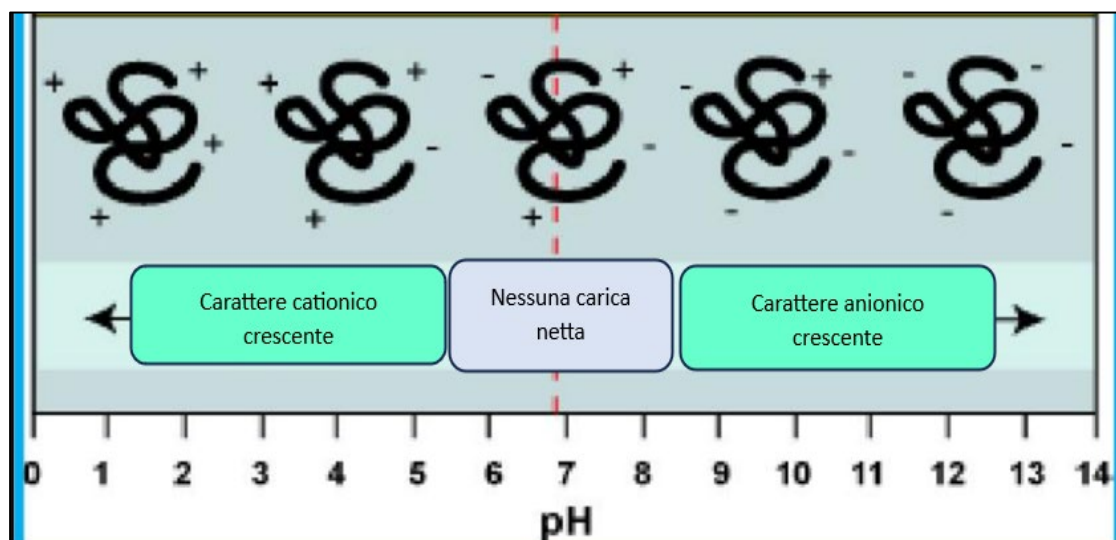


Figura 14. Comportamento delle proteine in funzione del pH.³⁰

1.4.3 Metodi di estrazione tradizionali

Il recupero di proteine dai residui agricoli è fondamentale, in quanto gli scarti di olive, pomodori e agrumi rappresentano una parte significativa dei rifiuti agricoli in Europa (38% della produzione totale).²⁹

Tra i metodi tradizionalmente utilizzati per l'estrazione proteica c'è quello proposto da Osborne. Questo metodo si basa sul trattamento con diversi solventi di una sostanza vegetale macinata, tale da estrarre le proteine in base alla loro solubilità, a diverse temperature. Nello specifico, in seguito all'estrazione dell'olio, il sottoprodotto o cake, che non può essere usato direttamente come alimento, ma contenente una buona frazione proteica, può essere valorizzato come fonte proteica economica. Lo studio di Osborne usa, tra i solventi, acqua, cloruro di sodio 0,5 M, acido acetico 60%, idrossido di sodio 0,1 M ed etanolo (questo è stato successivamente omesso poiché la resa proteica era quasi inesistente). La temperatura ha un impatto significativo sull'estrazione delle proteine.²⁸

Il metodo di solubilizzazione acida o alcalina per l'estrazione di proteine è quello più comune e, in generale, è eseguito secondo i seguenti step:

- Il campione solido viene macinato e miscelato con acqua, quindi omogeneizzato.
- L'omogeneizzato viene solubilizzato aggiungendo una base o un acido per raggiungere il pH desiderato che solubilizzi le fibre proteiche (pH 3 nel processo acido, pH 12 nel processo alcalino).
- L'omogeneizzato viene centrifugato così da separare il materiale non disciolto, ovvero tutte le proteine non solubili e la frazione solida.
- Il pH del materiale disciolto viene riportato al punto isoelettrico (pH circa 4,5-6,5), che conferisce alle proteine carica netta zero, per formare l'aggregato proteico; il ripiegamento delle proteine determina una maggiore interazione proteina-proteina.
- Le proteine precipitate vengono recuperate ancora tramite centrifugazione. La dimensione delle particelle è fondamentale poiché la densità dell'aggregato proteico e dell'acqua sono molto vicine; quindi se le particelle sono troppo piccole non possono essere separate in tempo e seguiranno il flusso del liquido fuori dal decanter, comportando una perdita di resa.³⁰

Il punto isoelettrico (pI) è il pH in cui la carica netta di una proteina è zero. Modificando il pH della soluzione al pI della proteina desiderata, si riducono le forze repulsive tra le molecole proteiche, favorendo l'aggregazione e la precipitazione. Tuttavia, l'uso di acidi minerali per raggiungere il pI può causare la denaturazione irreversibile delle proteine, limitandone l'applicazione.²⁶

Questo processo sfrutta il principio che la solubilità di un materiale, contenente proteine omogeneizzate in acqua, è influenzata dal pH della miscela. In condizioni acide o alcaline estreme, lontane dal punto isoelettrico (pI), le proteine si caricano negativamente o positivamente, respingendosi e permettendo l'interazione con l'acqua, quindi la solubilizzazione.³¹

Un inconveniente significativo di questo metodo è l'elevata concentrazione di alcali, che richiederebbe sforzi di trattamento delle acque in seguito e potrebbe diventare un problema ambientale.³³

A seconda del campione proteico da trattare, il metodo appena visto può avere variazioni riguardanti il rapporto solvente/campione, il pH, la temperatura e i tempi di estrazione. Il tipo di solvente è tra i fattori che più influiscono sull'efficienza di estrazione, seguito dalla temperatura, dal pH e, infine, dal tempo di estrazione. Un rapporto solvente/campione troppo basso può causare gonfiore della farina e un aumento della viscosità, ostacolando la diffusione molecolare e diminuendo la velocità di estrazione; un rapporto troppo alto può ridurre la concentrazione di proteine nell'estratto, rendendo più difficili ulteriori modifiche chimiche. Un pH alcalino più alto può aumentare l'estrazione delle proteine, ma può anche portare alla degradazione e denaturazione delle stesse. L'aumento della temperatura aumenta la velocità di estrazione, poiché le molecole si muovono più velocemente, accelerando il trasferimento di massa tra solido e liquido, riducendo la viscosità della soluzione; tuttavia, temperature troppo elevate possono denaturare le proteine. Tempi di estrazione elevati hanno portato a un aumento trascurabile dell'estrazione.³²

L'estrazione alcalina rapida ha una durata di 30 minuti e utilizza una soluzione di idrossido di sodio (NaOH) a bassa concentrazione (circa 0,18%) e una temperatura di 30°C; l'estrazione è condotta sotto agitazione continua in diverse proporzioni solvente-solido.³⁵

La lavorazione alcalina può causare reazioni indesiderate come la racemizzazione degli amminoacidi, la riduzione della digeribilità, la perdita di amminoacidi essenziali e la diminuzione del valore nutrizionale. Il processo post-estrazione prevede la centrifugazione (3380 rpm per 5 minuti) per separare l'estratto proteico, seguita da lavaggio del residuo. Si procede con la precipitazione isoelettrica (pH = 4,5 - 5,58) delle proteine con HCl 0,1 M.³⁶

Dopo un'ultima centrifugazione, il concentrato proteico viene neutralizzato a pH 7 con NaOH 0,1 M ed essiccato, ottenendo il concentrato proteico per precipitazione isoelettrica. In ultimo, i campioni vengono essiccati.³⁶

1.4.4 Metodi di estrazione sostenibili

L'alternativa ai metodi tradizionali è rappresentata da tecniche di estrazione verdi (**Figura 15**). Queste si distinguono dai metodi convenzionali soprattutto per l'impiego di solventi a basso impatto ambientale, per una riduzione dei consumi energetici e per la maggiore capacità di preservare le proprietà funzionali e nutrizionali degli estratti.³⁸

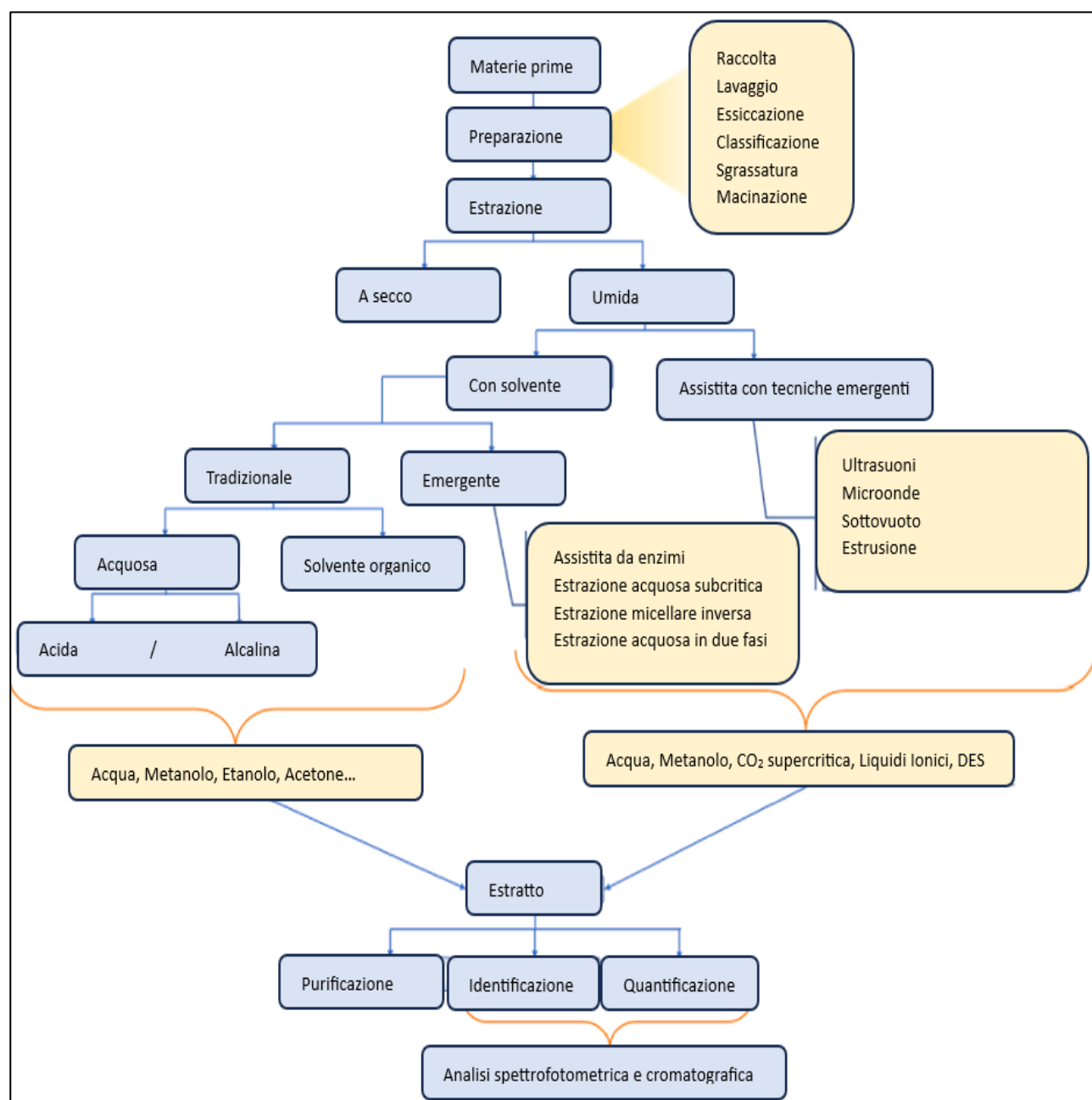


Figura 15. Da scarto a prodotto a valore aggiunto.³⁸

L'estrazione assistita da microonde (MAE) utilizza l'energia delle microonde per riscaldare la matrice del campione e facilitare il trasferimento dei composti desiderati (proteine) nel solvente. I vantaggi della MAE includono tempi di estrazione più brevi, un consumo di solvente inferiore e rese di

estrazione potenzialmente più elevate rispetto ai metodi di estrazione convenzionali. Tuttavia, la MAE può anche presentare degli svantaggi, come la possibilità di un riscaldamento non uniforme, che può portare alla degradazione dei composti sensibili al calore, come le proteine. La scelta del solvente è anche un fattore critico, poiché la capacità del solvente di assorbire l'energia delle microonde influisce sull'efficienza dell'estrazione.³⁷

L'estrazione assistita da ultrasuoni (UAE) utilizza onde sonore ad alta frequenza per creare cavitazione nel solvente, che a sua volta comporta la formazione, la crescita e l'implosione di bolle nel liquido, generando energia che rompe le pareti cellulari e facilita il rilascio dei composti desiderati (proteine). I parametri importanti per l'UAE includono la frequenza degli ultrasuoni, la potenza, il tempo di sonicazione, la temperatura e il rapporto tra materiale e solvente. Temperature troppo elevate possono denaturare le proteine, quindi è importante controllare la temperatura durante il processo.²⁷

L'estrazione con ultrafiltrazione a membrana è un processo di precipitazione in cui le proteine vengono concentrate attraverso la rimozione di acqua e composti non proteici a basso peso molecolare. Il peso molecolare della membrana utilizzata per questo metodo varia comunemente tra 1 kDa e 100 kDa.³⁴ Le membrane hanno pori di diverse dimensioni per separare le proteine da altri componenti indesiderati come sali, zuccheri e oligosaccaridi, purificandole. I vantaggi principali includono condizioni operative blande che riducono la denaturazione delle proteine, un'alta selettività, il recupero diretto delle proteine, un minore consumo di energia rispetto ad altre tecniche di concentrazione (liofilizzazione, evaporazione) e la possibilità di operare a temperature basse o ambiente. Questo step può essere utilizzato come metodo di concentrazione in seguito ad estrazione.³⁷

L'estrazione assistita da enzimi utilizza enzimi per rompere le pareti cellulari e idrolizzare le proteine in peptidi più piccoli, il che aumenta la solubilità, facilitandone l'estrazione da materiali biologici, inclusi i rifiuti alimentari (**Figura 16**). Enzimi comuni includono carboidrasi (come cellulasi e pectinasi), lipasi e proteasi (come alcalase, neutrase e pepsina). L'alcalase sembra dare i risultati migliori. La scelta dell'enzima dipende dalla composizione del materiale di partenza.²⁷ Questo metodo è generalmente più delicato e preserva meglio la funzionalità delle proteine, ma può portare a rese inferiori e può essere più costoso a causa del costo degli enzimi. I pretrattamenti meccanici come la sonicazione, l'omogeneizzazione ad alta pressione e i trattamenti a microonde possono aumentare la resa dell'estrazione enzimatica, aiutando a rompere le pareti cellulari e a liberare le proteine.²⁹

Tuttavia, questi pretrattamenti possono anche aumentare i costi di produzione e richiedere attrezzature specializzate. L'efficacia del metodo varia a seconda del tipo di residuo agricolo: per le olive, la lipasi e la cellulasi si sono dimostrate efficaci; per la colza, le proteasi sono risultate molto proficue; per i pomodori, la papaina è stata utilizzata per idrolizzare le proteine dei semi; per gli agrumi, la cellulasi è stata utilizzata per degradare le pareti cellulari e liberare le proteine. Sono molto importanti anche le condizioni di reazione, infatti le carboidrasi agiscono meglio in condizioni leggermente acide.²⁹

ENZIMA	TIPO	CONDIZIONI INCUBAZIONE	Source (EAE)
Pepsina Alcalasi	Endopeptidasi	pH 2, 37 °C, 5 hr pH 6.5 - 8.5, 45 °C, 150 min	Pollame
Termolisina	Metallopeptidasi	pH 9.5, 37 °C, 2 hr	Bovino
Papaina Alcalasi Tripsina Alcalasi	Endopeptidasi Aminopeptidasi	pH 6.5, 50 °C, 6 hr pH 8, 50 °C, 6 hr pH 8, 37 °C, 6 hr 55 °C, 2 hr	Maiale
Papaina Pepsina Alcalasi		pH 6.5, 37 °C, 12 hr pH 3, 37 °C, 12 hr pH 8, 50 °C, 12 hr	
Protex 40XL, Protex P, e Protex 5L	Endopeptidasi	pH 2.5 - 11, 50 - 60 °C, 3 hr	Colza
Pectinasi B-glucanasi	Carboidrasi	pH 3.5, 40 °C, 1.25 hr	Colza
Alcalasi	Endopeptidasi	pH 7.5, 55 °C, 1 - 4 hr, (0.5%, 1%, e 2% EC)	Scarti di pesce
Pepsina Alcalasi	Endopeptidasi	pH 2 pH 6.5 - 8.5 40, 45, 50, 55 °C 60, 120, 150, 180 min	Quinoa
Viscozima	Carboidrasi	pH 5.5 - 6.5, 37 - 53 °C, (1.5% to 4% EC)	Okara
Neutrasi Alcalasi Protamex Flavorzima	Proteasi batterica Endopeptidasi	pH 7, 50 °C, (2% EC), 2 hr pH 7.5, 55 °C, (2% EC), 2 hr pH 6.5, 55 °C, (2% EC), 2 hr pH 6, 50 °C, (2% EC), 2 hr	Tea
Cellulasi Emicellulase Pectine Viscozima Alcalasi	Carboidrasi Endopeptidasi	pH 9, 40 - 60 °C, 1 to 3 hr	Riso

Figura 16. Applicazione dell'estrazione assistita da enzimi (EAE) da fonti proteiche.²⁷

Gli approcci enzimatici rappresentano un'alternativa promettente, con le proteasi che operano in condizioni alcaline deboli che si dimostrano più efficaci delle carboidrasi nel recupero delle proteine vegetali.²⁹

Tuttavia, l'attività idrolitica delle proteasi può produrre peptidi a basso peso molecolare, mentre le carboidrasi potrebbero preservare meglio le proteine intatte, potenzialmente utili per l'alimentazione umana e animale grazie alla loro funzionalità. Lo sviluppo di metodi di estrazione enzimatica più efficienti ed economici, insieme all'utilizzo di pretrattamenti fisici e tecniche di separazione avanzate, potrebbe portare a un maggiore recupero di proteine di alta qualità.²⁹

L'impiego dei liquidi ionici (in inglese Ionic Liquids, ILs) nell'estrazione proteica consente una maggiore efficienza di estrazione e una maggiore selettività e stabilità delle proteine durante il processo rispetto alle tecniche convenzionali, riducendo al contempo la denaturazione. I liquidi ionici sono sali organici o inorganici che presentano un punto di fusione inferiore ai 100 °C. Sono caratterizzati proprietà quali bassa tensione di vapore, elevata stabilità termica, capacità di solubilizzare una vasta gamma di composti e possibilità di essere strutturalmente progettati, il che li rende idonei ad essere utilizzati come solventi alternativi o fasi estrattive per biomolecole complesse, come le proteine. Inoltre, la possibilità di riciclare i liquidi ionici e la loro compatibilità con tecniche di estrazione assistita (ad esempio, microonde o ultrasuoni) li rendono altamente versatili in ambito green chemistry.⁴¹

1.4.5 Deep Eutectic Solvents (DES)

I solventi eutettici (in inglese deep eutectic solvents, DES) sono miscele di due o più composti, ionici o non ionici, formate da un donatore (HBD) e un accettore (HBA) di legame idrogeno, e presentano un punto di fusione significativamente inferiore a quello dei singoli componenti.³⁸ Sono stati scoperti per la prima volta nel 2003 da Abbott, il quale ha dimostrato che un composto di colina e urea poteva formare una miscela eutettica liquida a temperatura ambiente tramite legami idrogeno.³⁹

I DES sono classificati in base alla natura dei loro componenti:

- Tipo I: Sale di ammonio quaternario e cloruro metallico.
- Tipo II: Sale di ammonio quaternario e idrato di cloruro metallico.
- Tipo III: Sale di ammonio quaternario e HBD organico (ammide, acido carbossilico, polioli); i più studiati finora.
- Tipo IV: Idrato di cloruro metallico e HBD.
- Tipo V: HBA e HBD non ionici, dove il legame idrogeno è particolarmente importante.⁴⁰

Questi solventi verdi si differenziano dai quelli organici tradizionali perché sono biodegradabili, più ecologici, meno tossici, più economici e derivanti da fonti rinnovabili anziché da combustibili fossili. I DES possono solubilizzare, quindi estrarre, una vasta gamma di composti, sia polari che apolari, e nella maggior parte dei casi sono termicamente stabili e non infiammabili.⁴¹

I DES spesso mostrano una maggiore capacità di mantenere l'attività biologica e la stabilità delle proteine estratte, riducendo il rischio di denaturazione. Inoltre, i DES hanno una bassa pressione di vapore, riducendo il rischio di emissioni nell'ambiente.³⁸ Molti DES sono facili da preparare e più economici rispetto ai liquidi ionici, e presentano un potenziale per l'estrazione e la purificazione di proteine riproducibile e scalabile.⁴¹

Si definisce punto eutettico la composizione specifica in cui la miscela ha punto di fusione più basso rispetto ai singoli componenti della stessa: è un concetto fondamentale in quanto definisce le condizioni tali per cui la miscela forma un liquido a temperature inferiori rispetto ai singoli componenti (**Figura 17**).⁴²

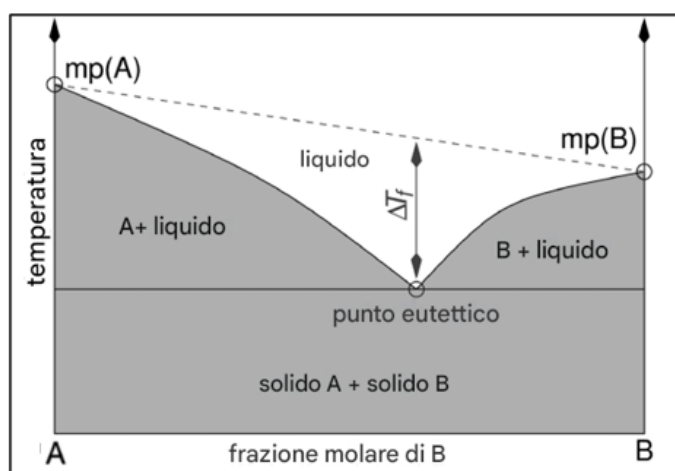


Figura 17. Rappresentazione del punto eutettico in un diagramma di fase a due componenti.⁴²

Un DES viene preparato generalmente mescolando un donatore (HBD) e un accettore di legame idrogeno (HBA) in un rapporto molare specifico, per formare una miscela incolore, limpida e omogenea (**Figura 18**).³⁸ Il metodo di preparazione più comune consiste nell'agitare e riscaldare moderatamente la miscela di componenti: la temperatura di riscaldamento varia tra 50-100 °C, a seconda della temperatura di fusione e della stabilità dei reagenti.⁴³ Altri approcci includono la liofilizzazione e la macinazione.⁴⁴

La liofilizzazione è un processo in due fasi principali, ovvero la dissoluzione dei componenti del DES in acqua (mediante calore, ultrasuoni o agitazione) e l'evaporazione dell'acqua con la tecnica di liofilizzazione. L'acqua può anche essere evaporata utilizzando un evaporatore rotativo o un vuoto centrifugo.

La macinazione prevede la frantumazione dei precursori del DES in un mortaio a temperatura ambiente fino a formare un liquido omogeneo.⁴³ Metodi più ecologici coinvolgono l'uso di microonde e ultrasuoni.⁴⁴

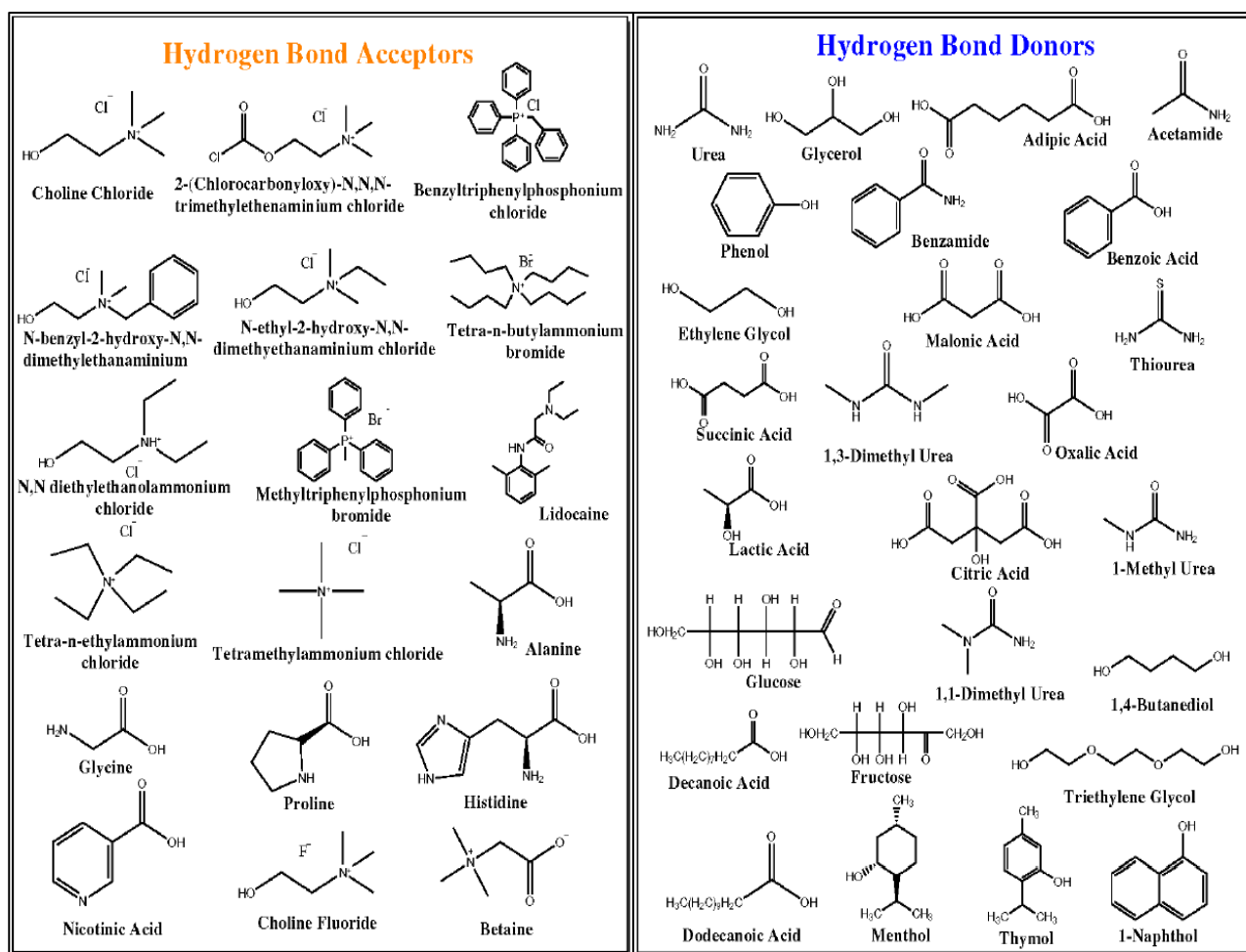


Figura 18. Alcuni esempi di donatori (HBD) e accettori (HBA) di legame idrogeno.⁴⁰

HBA	HBD	Rapporto Molare (HBA:HBD)	Punto di Fusione (°C)	Viscosità (cP)
CHCL	Urea	1:2	12	750 (25 °C) 169 (40 °C)
CHCL	Glicole Etilenico	1:2	-66	36 (20 °C)
CHCL	Glicole Etilenico	1:3	ND	19 (20 °C)
CHCL	Glicerolo	1:2	-40	376 (20 °C)
CHCL	Glicerolo	1:3	ND	450 (20 °C)
CHCL	Glicerolo	1:4	ND	503 (20 °C)
CHCL	1,4 Butandiolo	1:3	ND	140 (20 °C)
CHCL	1,4 Butandiolo	1:4	ND	88 (20 °C)
CHCL	Acido Malonico	1:1	10	721 (25 °C)
CHCL	Acido Citrico	1:1	69	ND
CHCL	Acido Ossalico	1:1	34	231 (25 °C)
CHCL	Acido Gallico	1:0.5	77	ND
CHCL	Acido Ascorbico	2:1	ND	51,570 (25 °C)
CHCL	Glucosio	1:1	31	9037 (25 °C)
CHCL	Glucosio	2:1	15	8045 (25 °C)
CHCL	Xilitolo	1:1	25 °C	5230 (30 °C)
CHCL	Sorbitolo	1:1	25 °C	12,730 (30 °C)

Figura 19. Temperatura di fusione e viscosità di alcuni DES a base di cloruro di colina.⁴⁴

I DES sono impiegati per il recupero di composti bioattivi negli scarti alimentari e le loro proprietà fisiche e chimiche devono essere ottimizzate per ottenere un'elevata resa di estrazione (**Figura 19**). È fondamentale il rapporto molare tra HBA e HBD. I DES hanno in genere alta viscosità (maggiore di 100 cP a temperatura ambiente) e bassa conduttività rispetto ai liquidi ionici convenzionali e ai solventi molecolari. Solitamente la viscosità diminuisce all'aumentare della temperatura (andamento Arrhenius), mentre la conduttività aumenta.⁴²

L'aggiunta di acqua può ridurre la viscosità dei DES indebolendo i legami idrogeno, migliorando la solubilizzazione degli estratti mirati (proteine) e il trasferimento di massa tra il campione e il solvente. Tuttavia, un'eccessiva diluizione può compromettere le proprietà eutettiche uniche del DES.⁴⁴

Altri fattori che influenzano sia la realizzazione dei DES sia l'estrazione con tali solventi sono la polarità, che influenza la capacità di solubilizzare specifici composti, il pH, legato alla solubilità e stabilità dei composti estratti, e la densità, un fattore importante per la separazione dei composti estratti. Un DES con una polarità simile a quella del composto bersaglio avrà una maggiore capacità di solubilizzazione e un'estrazione più efficiente.⁴⁴ DES altamente polari possono essere efficaci per l'estrazione di proteine da fonti vegetali, come le bucce di melograno.⁴¹ Anche il rapporto solido-liquido influenza la quantità di solvente disponibile per l'estrazione. Il tempo di estrazione influisce sulla quantità di composto che viene estratto, ma oltre un certo limite può portare alla degradazione dei composti.⁴⁵

La natura vetrosa dei DES, ovvero la tendenza a formare stati amorfi (non cristallini) durante il raffreddamento, può influenzare in modo significativo le loro proprietà. Infatti, un DES con una natura vetrosa pronunciata potrebbe mostrare una viscosità elevata a temperature inferiori, danneggiando l'applicabilità in alcuni processi. Comprendere la dinamica associata alla transizione vetrosa, come il rilassamento strutturale, può anche influenzare la velocità delle reazioni o dei processi che si verificano all'interno del DES, di conseguenza risulta cruciale per ottimizzare le prestazioni in varie applicazioni.⁴⁰

I solventi eutettici naturali (NA-DES) sono una classe di solventi considerati verdi perché sono composti da miscele di metaboliti primari presenti naturalmente nelle piante, come zuccheri, acidi organici, basi e amminoacidi. A differenza dei solventi organici convenzionali, i NA-DES sono generalmente non tossici, biodegradabili, non infiammabili, hanno bassa volatilità (e quindi meno inquinanti) e possono essere preparati con processi a basso consumo energetico. Inoltre, spesso mostrano una migliore solubilità e stabilità per i composti bioattivi rispetto ai solventi tradizionali.⁴⁶

I NA-DES possono essere composti da un acido e una base, neutri (composti solo da zuccheri o zuccheri e polialcoli), neutri con acidi (composti da zucchero/polialcol e acidi organici), neutri con basi (composti da zucchero/polialcol e basi organiche), a base di amminoacidi (composti da amminoacidi e acidi organici/zuccheri). I NA-DES con acidi organici tendono ad avere la polarità più alta, seguiti da quelli a base di amminoacidi, mentre i NA-DES con zuccheri e polialcoli hanno una polarità inferiore e una viscosità maggiore.⁴⁷

In molti casi, i NA-DES possono estrarre quantità maggiori di composti bioattivi rispetto ai solventi organici tradizionali, grazie alla loro capacità di interagire con i composti bersaglio tramite legami idrogeno e ad altre interazioni molecolari (**Figura 20**).⁴⁸

Inoltre, possono migliorare la solubilità di composti che sono scarsamente solubili in acqua o in altri solventi convenzionali e proteggere i composti bioattivi dalla degradazione dovuta a calore, luce e tempo, prolungandone la durata di conservazione. La stabilità è anche influenzata dalla temperatura di conservazione, con temperature più basse che generalmente garantiscono una maggiore stabilità (da -20 °C a 4 °C). Alcuni studi hanno dimostrato che i composti dissolti nei NA-DES possono essere assorbiti più facilmente dall'organismo, aumentando la loro biodisponibilità.⁴⁸

Si ipotizza che i NA-DES siano presenti in tutti gli organismi e coinvolti nella biosintesi, nella solubilità e nello stoccaggio di metaboliti idrofobici negli organelli viventi. Sono considerati promettenti per l'estrazione e la purificazione di proteine a livello industriale.⁴¹

Parametri	ILs	DES	NADES
componenti	legame ionico	legame a idrogeno	legame a idrogeno
punto di fusione	sotto 100 °C	sotto 100 °C	sotto 100 °C
intervallo di polarità	largo	largo	largo
solubilità	alto	alto	alto
stabilità	stabile (liquido)	rischio cristallizzazione	rischio cristallizzazione
viscosità	alto	alto	alto
termolabilità	resistente al calore	termolabile	termolabile
separazione	facile	difficile	difficile
costi	alti	bassi	bassi
preparazione del solvente	difficile	facile	facile
tossicità	alto	più basso dei ILs	basso
biodegradabilità	medio	alto	alto
rispetto dell'ambiente	medio	alto	alto
riciclabilità	si	si	si

Figura 20. Confronto tra solventi ionici convenzionali, DES, NA-DES.⁴⁷

1.4.6 Estrazione proteica con DES

I DES permettono di estrarre composti bioattivi da sottoprodotti agro-industriali senza alterarne le proprietà, riducendo al contempo l'impatto ambientale e i rischi per la salute associati ai solventi organici (**Figura 21**). I sottoprodotti più comunemente utilizzati includono bucce di agrumi (arancia, limone, pompelmo) e di melograno, vinacce (uva rossa, birra), fondi di caffè, gusci di crostacei (gamberi, aragosta), cereali (crusca di riso, mais, germe di grano, frumento), soia, arachidi, canola, sesamo, farina d'avena, bambù e molti altri scarti vegetali, animali e della lavorazione del pesce. L'obiettivo è recuperare e valorizzare polifenoli, proteine, carboidrati, lipidi, alcaloidi e carotenoidi. La scelta del DES dipende dal tipo di composto da estrarre e dalla matrice da cui viene estratto.⁴⁵

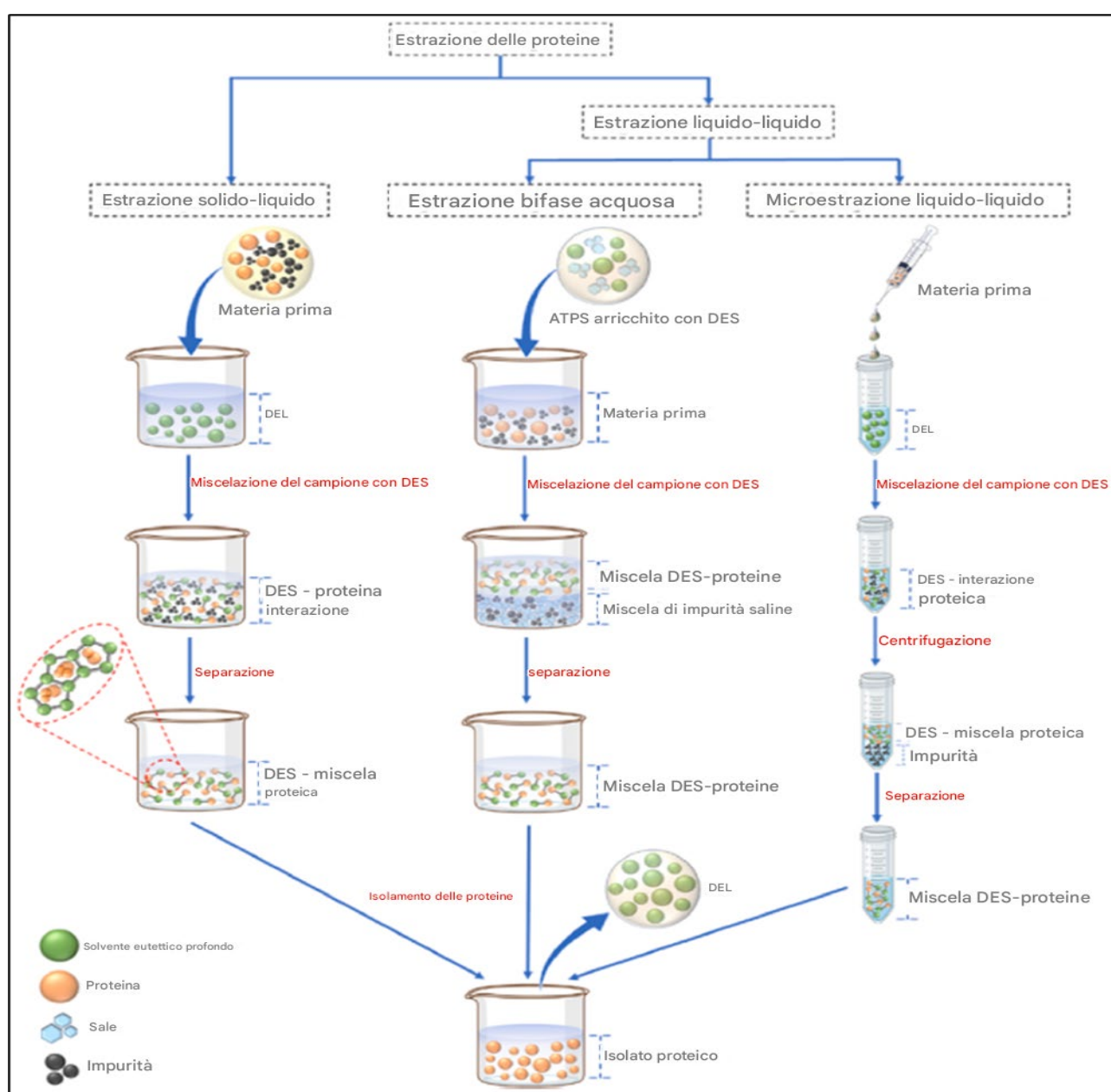


Figura 21. Meccanismo di vari processi di estrazione delle proteine utilizzando un DES come solvente.³⁸

Spesso si combinano diverse tecniche di estrazione avanzate con DES, o NA-DES, per incrementare l'efficienza dell'estrazione proteica:

- Estrazione assistita da microonde (MAE): utilizzo di microonde per riscaldare la miscela e migliorare l'estrazione.
- Estrazione assistita da ultrasuoni (UAE): utilizzo di onde sonore per favorire la rottura delle cellule vegetali e l'estrazione.
- Estrazione con liquido pressurizzato (PLE): utilizzo di DES a temperature e pressioni elevate per aumentare la solubilità e l'estrazione.
- Estrazione con scarica elettrica ad alta tensione (HVED): utilizzo di scariche elettriche per rompere le cellule vegetali e rilasciare le proteine.
- Estrazione bifasica acquosa (ATPS): utilizzo di sistemi liquidi-liquidi a due fasi, spesso con DES e sali inorganici.
- Microestrazione liquido-liquido: utilizzo di piccole quantità di DES per estrarre le proteine.³⁸
- Omogeneizzazione ad alta velocità con estrazione a scoppio di cavitazione (HSH-CBE): utilizzo di forza meccanica per disgregare i materiali.
- Estrazione con fluidi supercritici (SFE): utilizzo di fluidi supercritici, come la CO₂, per estrarre i composti.⁴⁵

I DES a base di cloruro di colina (ChCl), come accettore di legame idrogeno, e ammine, ammidi, acidi carbossilici, zuccheri e polioli, come donatore di legame idrogeno, è il più comunemente utilizzato negli studi circa il recupero di proteine da scarti alimentari. Il cloruro di colina è biocompatibile, economico, facilmente biodegradabile e poco tossico.⁴¹ I DES a base di cloruro di colina vengono utilizzati nell'estrazione di proteine perché offrono vantaggi rispetto ai metodi tradizionali, tra cui la biodegradabilità, la bassa tossicità, la sostenibilità, i tempi di estrazione ridotti, il basso consumo di acqua ed energia e l'assenza di aggiustamenti di pH, rendendoli un'alternativa verde all'estrazione con alcali e precipitazione isoelettrica. In **Figura 22** alcuni esempi di DES preparati miscelando cloruro di colina e un isomero del butandiolo in diversi rapporti molari; la prova ha coinvolto anche l'aggiunta di una parte di acqua: solo le miscele di cloruro di colina e isomeri del butandiolo in rapporto molare 1/3 sono risultate adatte per la formazione di DES e miscele binarie, nonché per l'estrazione delle proteine, mentre la presenza di acqua ha permesso a tutte le formule di formare miscele binarie DES/acqua.^{51,52}

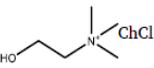
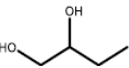
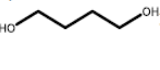
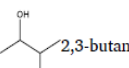
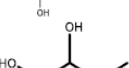
DES	HBA	HBD	H ₂ O	Rapporto Molare	formazione DES	Estrazione proteica
DES1			×	1:1	×	X
DES2			×	1:2	×	X
DES3		1,2-butanediolo	×	1:3	✓	✓
DES4			×	1:1	×	X
DES5		1,4-butanediolo	×	1:2	×	X
DES6			×	1:3	✓	✓
DES7			×	1:1	×	X
DES8		2,3-butanediolo	×	1:2	×	X
DES9			×	1:3	✓	✓
DES10			✓	1:1:1	✓	×
DES11		1,2-butanediolo	✓	1:2:1	✓	✓
DES12		1,2-butanediolo	✓	1:3:1	✓	✓
DES13			✓	1:1:1	✓	×
DES14		1,4-butanediolo	✓	1:2:1	✓	✓
DES15			✓	1:3:1	✓	✓
DES16			✓	1:1:1	✓	×
DES17		2,3-butanediolo	✓	1:2:1	✓	×
DES18			✓	1:3:1	✓	✓

Figura 22. Realizzazione di diversi DES a base di ChCl e isomeri del butandiolo.⁵¹

Senza un recupero efficiente, l'uso dei DES nelle applicazioni industriali rimane non conveniente economicamente e insostenibile. Il recupero e il riciclo riducono i costi operativi, minimizzano l'impatto ambientale e rendono i processi più praticabili commercialmente. La fattibilità economica e la sostenibilità ambientale sono strettamente legate al recupero e al riciclo dei DES. Tra i vari metodi per il recupero dei DES, vi è quello che prevede l'aggiunta di un solvente (come acqua, etanolo o acetone) per far precipitare i composti disciolti e separare il DES, con successiva evaporazione del solvente. Oppure si sfruttano le differenze di solubilità per cristallizzare selettivamente i componenti del DES. L'estrazione liquido-liquido utilizza un solvente immiscibile per estrarre i composti desiderati, o il DES stesso dalla miscela di reazione, mentre l'estrazione solido-liquido sfrutta resine macroporose per adsorbire selettivamente i composti bersaglio, consentendo il recupero del DES. La distillazione a percorso breve invece è adatta per composti sensibili al calore, separandoli in base alla loro volatilità a pressioni ridotte. Si possono usare anche fluidi supercritici, come la CO₂, per estrarre i composti di interesse e rigenerare il DES. Infine esistono metodi combinati, i quali integrano diverse tecniche per migliorare l'efficienza di recupero.⁵³

Per valutare la qualità delle proteine estratte è necessario uno studio sui parametri fondamentali (peso molecolare, struttura secondaria, stabilità termica, grado di idrolisi in caso di separazione con acidi) grazie all'utilizzo di diverse tecniche analitiche:

- elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE) per determinare la purezza e il peso molecolare delle proteine;
- spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR) per analizzare la struttura secondaria delle proteine e le interazioni con il DES;^{38,54}

- spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) per studiare la composizione e la struttura delle proteine;
- spettroscopia di diffusione dinamica della luce (DLS) per misurare le dimensioni e l'aggregazione delle proteine in soluzione DES;
- spettroscopia di dicroismo circolare (CD) per valutare i cambiamenti conformazionali nelle proteine;
- cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) per identificare peptidi e proteine specifiche;
- analisi termogravimetrica (TGA) per valutare la stabilità termica delle proteine estratte.^{38,54}

Le prospettive future includono lo sviluppo di DES più ecologici grazie a ulteriori studi sulla selezione dei componenti, sulla formazione, sulle proprietà. È necessario uno sviluppo di metodi innovativi per una separazione più efficiente delle proteine dal DES.³⁸ È possibile la creazione di modelli per prevedere le interazioni proteina-DES e ottimizzare le condizioni di estrazione. Questo approccio contribuisce a un'economia circolare e a un futuro più sostenibile per l'industria alimentare e biotecnologica.⁵⁴

2. Materiali e metodi

2.1 Campione e solventi

La farina di nocciola disoleata, sottoprodotto dell'estrazione a freddo dell'olio di nocciola, è stata ottenuta da Vortex SRL (Torino, Italia). I solventi utilizzati nel lavoro di tesi sono tutti di grado analitico (purezza almeno del 98) e acquistati da Sigma-Aldrich: cloruro di colina, acido ossalico, idrossido di sodio, acido cloridrico, etanolo, etere di petrolio.

2.2 Composizione della farina di nocciola disoleata

Il residuo di lipidi è stato quantificato con il Soxhlet, estraendo con etere di petrolio in continuo per 3 ore. Il contenuto di umidità è stato determinato asciugando il campione a 105°C in un forno di essiccazione, fino a peso costante. Il contenuto di ceneri è stato misurato incenerendo a secco il campione in un forno a muffola a 550°C per tutta la notte, in conformità alla norma ISO 2171:2007.

Il contenuto proteico è stato valutato attraverso il metodo Dumas⁴⁹ utilizzando un analizzatore elementare (Elementar, Vario EL Cube) (**Figura 23**), mentre il contenuto totale di carboidrati è stato calcolato sottraendo al 100% la somma dei contenuti di lipidi, umidità, cenere e proteine.

L'analisi è stata eseguita in triplicato e i valori, in percentuale, sono espressi come media $\pm$ deviazione standard.



Figura 23. Analizzatore elementare, CHNS: Elementar, Vario EL Cube.⁶⁶

2.3 Estrazione proteica da farina di nocciola disoleata

2.3.1 Estrazione alcalina e precipitazione acida (ALKIS)

L'estrazione alcalina seguita da precipitazione isoelettrica è stata eseguita come descritto nel **Paragrafo 1.4.3**. La farina disoleata di nocciola è stata pesata (3 g) e miscelata con acqua distillata in un rapporto solido/liquido (S/L) di 1/10 (g/mL). Il campione è stato portato a pH 9 aggiungendo NaOH 1 N; la miscela è stata poi filtrata sottovuoto e la frazione liquida, contenente le proteine solubilizzate, è stata acidificata a pH 4 utilizzando HCl 1 N. Il precipitato proteico è stato raccolto tramite centrifugazione a 4500 rpm per 10 minuti a 20 °C e, quindi, neutralizzato a pH 7 integrando con NaOH 1 N. Il residuo solido è stato asciugato a 40 °C in un forno di essiccazione fino a peso costante, infine analizzato. La prova, svolta con comune vetreria di laboratorio, è stata condotta in triplicato. (**Figura 24**)

2.3.2 Estrazione con solvente eutettico (DES)

Il cloruro di colina e l'acido ossalico sono stati miscelati in un rapporto molare 1/1 in un pallone a fondo tondo da 250 mL chiuso con un foglio di alluminio. La miscela è stata agitata in un bagno d'olio a 80 °C per 1 ora fino a ottenere un liquido chiaro.⁴⁴ L'estrazione con DES è stata eseguita come descritto da Cao et al. (2023).⁴⁹ La farina di nocciole è stata miscelata con il DES appena preparato e portato a temperatura ambiente, in rapporto solido/liquido (S/L) di 1/20 (g/mL).

La miscela è poi stata trasferita in un pallone a fondo tondo da 250 mL, sigillato con un foglio di alluminio, e agitata costantemente in un bagno d'olio a 60 °C per 60 minuti (**Figura 25**). Dopo il raffreddamento, la miscela è stata centrifugata a 4500 rpm per 10 minuti per separare le frazioni solide e liquide. Il surnatante, contenente le proteine solubilizzate, è stato raccolto, mentre il residuo solido è stato scartato. Il surnatante è stato trasferito in un becher, e l'etanolo assoluto è stato aggiunto in rapporto di 1/50 (g/mL). La miscela è stata mantenuta a 4 °C per 18 ore per consentire la precipitazione proteica. Le proteine precipitate, quindi depositate sul fondo del becher, sono state raccolte mediante centrifugazione a 4000 rpm per 10 minuti. Il precipitato proteico è stato risciacquato con acqua deionizzata e lavato tre volte per rimuovere le eventuali impurezze residue. Ogni fase di lavaggio è stata seguita da centrifugazione a 4000 rpm. Infine, la proteina purificata è stata essiccata a 40 °C fino al raggiungimento di un peso costante, infine analizzata. La prova, svolta con comune vetreria di laboratorio, è stata condotta in triplicato. (**Figura 24**)

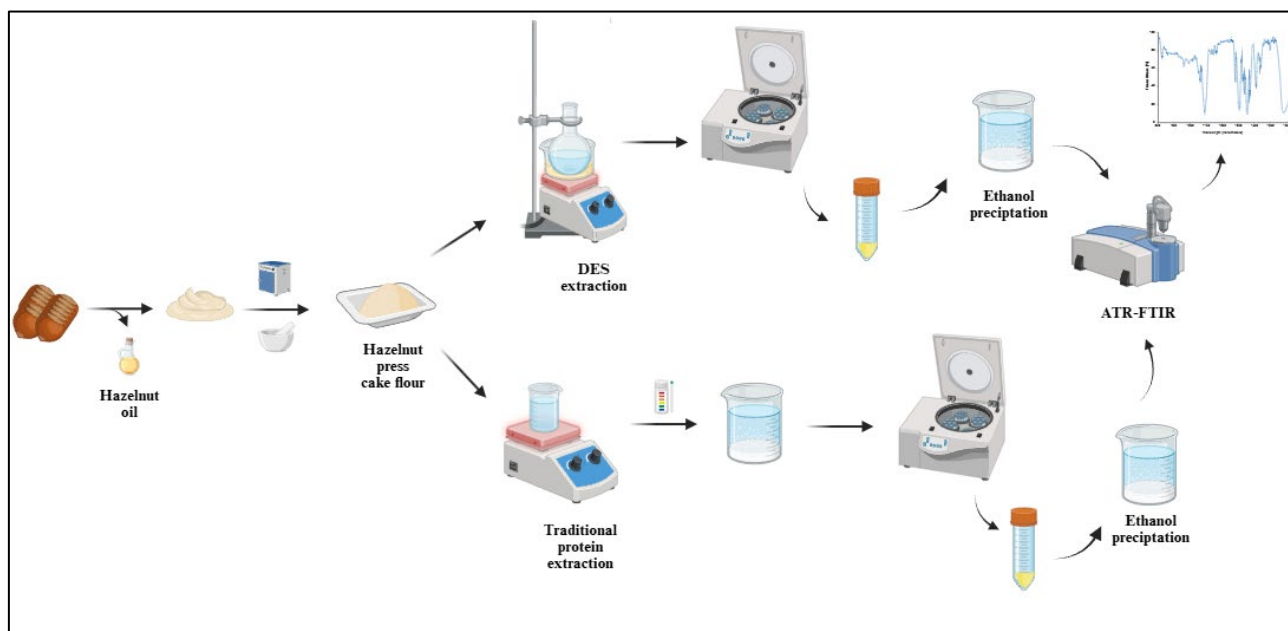


Figura 24. Schema grafico del processo di estrazione e valorizzazione delle proteine dalla farina di nocciola disoleata.⁶⁸

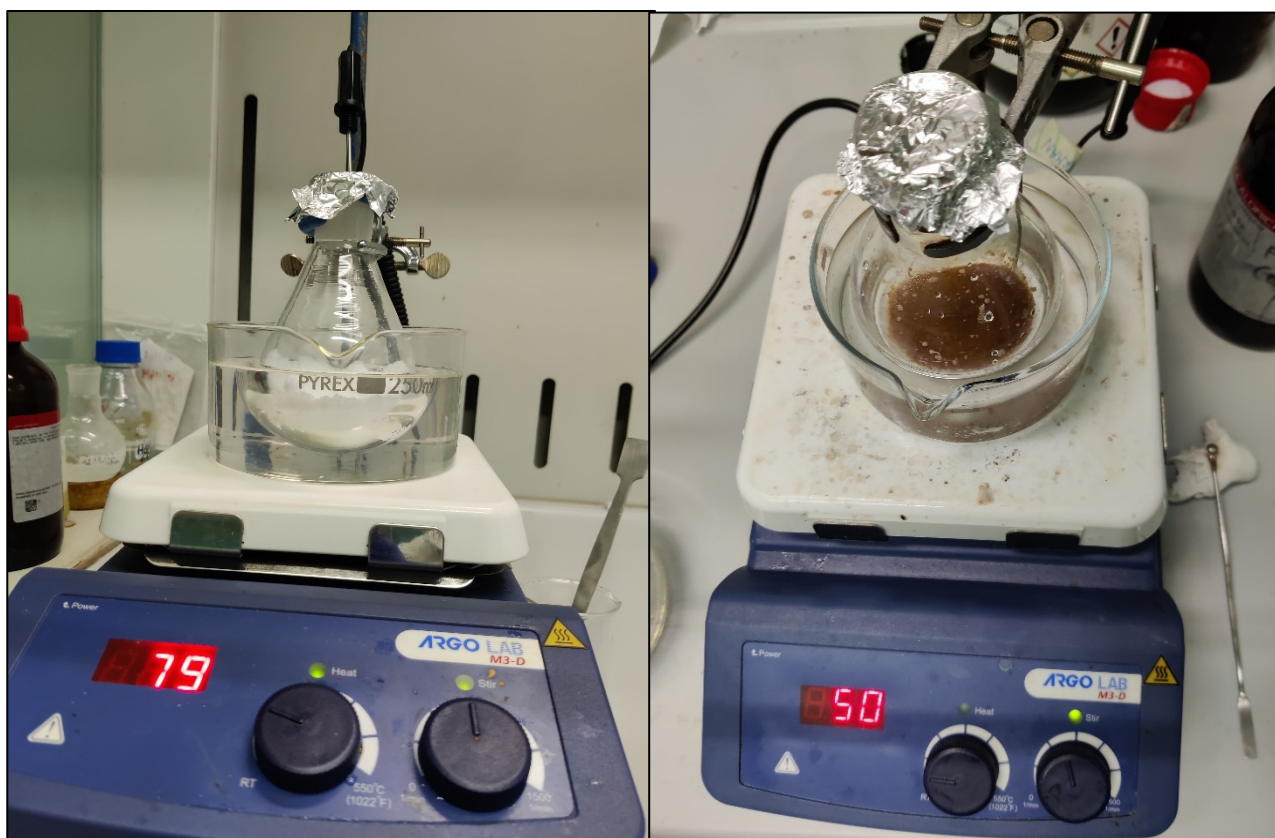


Figura 25. Preparazione DES e successiva estrazione proteica.

2.3.3 Resa proteica e rendimento

Per determinare il contenuto proteico nel campione estratto esistono due tecniche, ovvero il metodo Kjeldahl²² e quello di Dumas⁴⁹. La resa proteica e il rendimento sono stati determinati utilizzando il secondo approccio: W1 è il peso in grammi della polvere di nocciola; W2 è il peso in grammi della proteina di nocciola estratta; P1 è la purezza della polvere di nocciola e P2 è la purezza della proteina di nocciola (**Figura 26**). L'analisi è stata eseguita in triplicato e i valori, in percentuale, sono espressi come media $\pm$ deviazione standard.

$$\text{RESA (\%)} = \frac{W_2}{W_1} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{RENDIMENTO (\%)} = \frac{W_2 \times P_2}{W_1 \times P_1} \times 100 \quad (2)$$

Figura 26. Resa proteica (1) rendimento (2) secondo il metodo di Dumas.⁴⁹

2.3.4 Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR)

Gli spettri ATR-FTIR dei campioni sono stati acquisiti nell'intervallo $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ e con una risoluzione di 4 cm^{-1} (con 32 scansioni totali), utilizzando uno spettrometro Alpha II ATR-IR (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) (**Figura 27**). Gli spettri sono stati visualizzati, la linea di base è stata rimossa e smussata utilizzando il software “Spec-tragryph - optical spectroscopy software”, Versione 1.2.16.1, 2022.

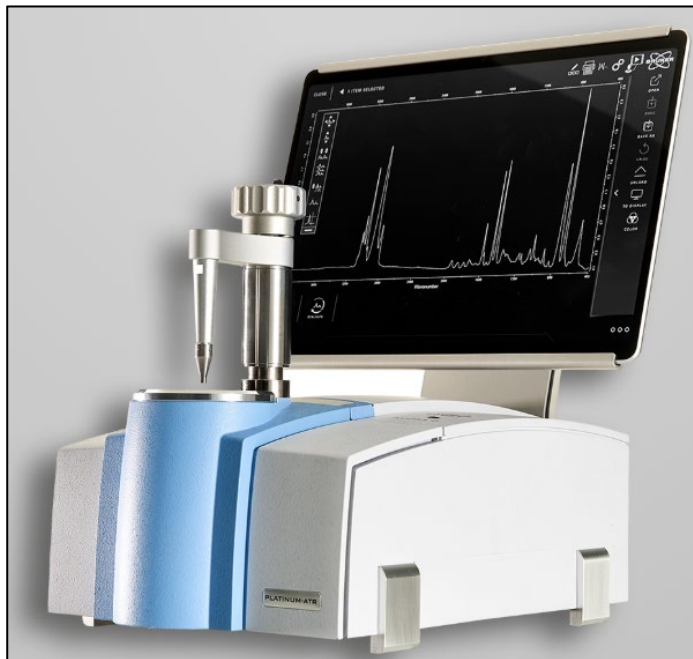


Figura 27. Spettrometro Alpha II ATR-IR.⁶⁷

2.3.5 Struttura secondaria delle proteine

La regione dell'Amide I ($1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$) degli spettri è stata scomposta, adattando un modello gaussiano, e l'area è stata calcolata tramite integrazione dei picchi utilizzando Matlab R2024b. I contenuti relativi di α -elica, β -foglietto, bobine casuali e β -ripiegamenti sono stati determinati secondo l'area dei picchi a $1650\text{--}1660\text{ cm}^{-1}$, $1600\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$, $1640\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$, $1660\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$.⁵⁵

2.3.6 Analisi statistica

I risultati di questo studio sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard ($n = 3$) e sono stati analizzati utilizzando Matlab R2024b. Un valore di $P < 0,05$ è stato considerato significativo dopo aver eseguito un'analisi ANOVA a una via; successivamente, è stato applicato il test post-hoc di Tukey per identificare le differenze specifiche.

3. Risultati

3.1 Composizione approssimata del pannello di nocciola

Nel **Paragrafo 2.3** è stato descritto in dettaglio il metodo per determinare la composizione approssimata della farina di nocciola disoleata. La composizione approssimata del pannello di nocciola ha manifestato un contenuto di proteine relativamente alto ($42,44\% \pm 2,85\%$), evidenziando il potenziale di questo sottoprodotto industriale come preziosa fonte proteica. I carboidrati ($24,69\% \pm 2,96\%$), rappresentano la seconda macromolecola più concentrata nel pannello.

Nella **Figura 28** sono elencati i risultati circa il contenuto di umidità, proteine, carboidrati, lipidi e ceneri. L'analisi è stata eseguita in triplicato e i valori, in percentuale, sono espressi come media $\pm$ deviazione standard.

Composizione farina di nocciola disoleata (%)	Valore medio (%)	$\pm$
Umidità (% <i>p/p</i> , base umida)	11.82	0.01
Proteine (% <i>p/p</i> , base secca)	42.44	2.85
Carboidrati (% <i>p/p</i> , base secca)	24.69	2.96
Lipidi (% <i>p/p</i> , base secca)	18.87	0.73
Ceneri(% <i>p/p</i> , base secca)	2.18	0.32

Figura 28. Composizione approssimata della farina di nocciola disoleata.

3.2 Analisi della resa proteica e del rendimento

Nel **Paragrafo 2.3.3** è stato descritto il metodo di Dumas per determinare la resa proteica e il rendimento. L'estrazione alcalina seguita da precipitazione isoelettrica (ALKIS) ha prodotto significativamente più proteine rispetto all'estrazione con il solvente eutettico profondo (DES), e queste differenze nell'efficienza dell'estrazione delle proteine tra i vari metodi possono essere attribuite alle distinte caratteristiche fisico-chimiche dei sistemi di estrazione. L'acqua, a differenza dei sistemi DES, ha una viscosità inferiore: questa proprietà migliora il movimento molecolare, consentendo alle particelle di diffondersi più efficacemente e interagire più facilmente; di conseguenza, l'acqua può facilitare l'estrazione delle proteine più efficientemente rispetto ai sistemi DES, come dimostrato in letteratura.⁵⁰ Inoltre, il metodo tradizionale si basa sulla repulsione elettrostatica ad alto pH che promuove l'esposizione di gruppi idrofobici e l'aggregazione di proteine attraverso interazioni idrofobiche e, al punto isoelettrico, i gruppi idrofobici sono ulteriormente rafforzati dalle forze elettrostatiche, risultando in una struttura proteica compatta.

L'estrazione verde delle proteine, invece, si basa sulla formazione di legami a idrogeno con le proteine e sulla sua capacità di solubilizzare la frazione polisaccaridica, il componente principale della biomassa vegetale, facilitando la diffusione delle proteine nell'ambiente extracellulare.⁴⁹ Nonostante la forte differenza nella resa, i protocolli DES hanno mostrato un rendimento delle proteine significativamente più alto, evidenziando una maggiore selettività della miscela DES per le proteine di nocciola.⁵⁶ Nella **Figura 29** sono elencati i risultati. L'analisi è stata eseguita in triplicato e i valori, in percentuale, sono espressi come media $\pm$ deviazione standard.

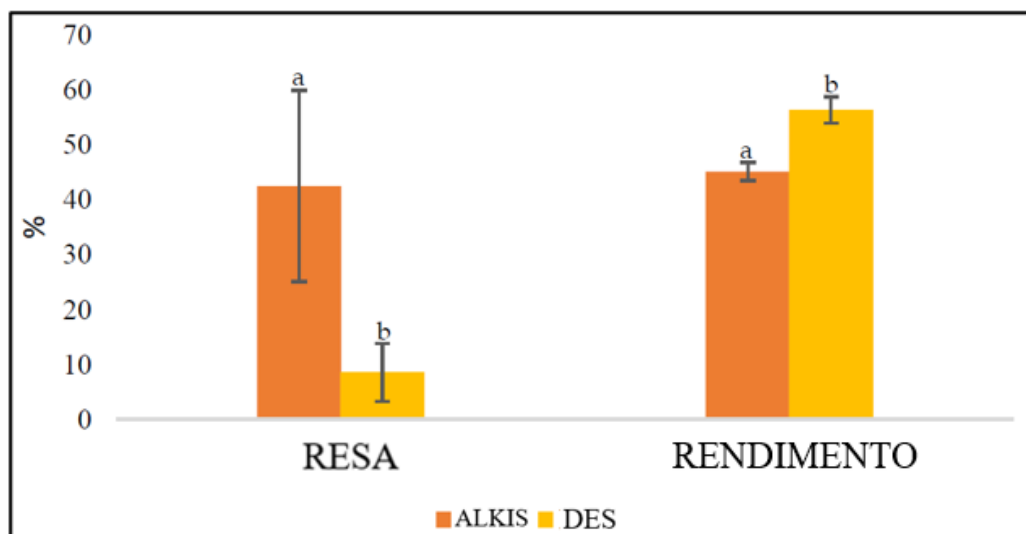


Figura 29. Resa proteica e rendimento con metodo tradizionale e DES. Lettere diverse sopra le barre indicano differenze statisticamente significative tra i metodi di estrazione all'interno di ciascun parametro, come determinato tramite ANOVA a una via seguita dal test post hoc di Tukey ($p < 0,05$).

3.3 Analisi della struttura secondaria delle proteine tramite ATR-FTIR

L'FTIR è una tecnica ampiamente utilizzata per monitorare i cambiamenti nei gruppi funzionali e nelle caratteristiche conformazionali delle proteine, quindi analizzare la struttura secondaria delle proteine e le interazioni con il DES. Nelle proteine, il legame peptidico è definito come gruppo IR-attivo primario, e manifesta un momento di dipolo dovuto alla stabilizzazione per risonanza e a un effetto induttivo negativo. L'effetto induttivo direzionato verso l'ossigeno carbonilico causa una parziale carica negativa sull'atomo di ossigeno e una parziale carica positiva sull'atomo di azoto. Sia le previsioni teoriche che i risultati sperimentali individuano fino a 9 bande ammidiche nello spettro IR delle proteine, etichettate con A, B e I-VII. Tra queste, le regioni Ammide I, II e III sono considerate le più significative.⁵⁷

La proteina estratta con DES ha mostrato bande ammidiche a 3278 cm^{-1} , 2919 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} , 1635 cm^{-1} , 1522 cm^{-1} e 1020 cm^{-1} , che corrispondono alle vibrazioni di flessione dei gruppi OH e NH liberi e legati (ammide A), stiramento asimmetrico $-\text{CH}_2$ e simmetrico $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$ (ammide B), C=O stiramento (ammide I), flessione N-H e stiramento C-N (ammide II), e stiramento C-N e vibrazione N-185 H (ammide III).⁵⁸

Come mostrato negli spettri, nella proteina estratta con ALKIS, un aumento dell'intensità dell'ammide B può suggerire cambiamenti conformazionali nella struttura secondaria della proteina o addirittura la rottura della stessa proteina in pezzi più piccoli. Invece, nella proteina estratta con DES, un aumento dell'intensità dell'ammide A indica la formazione di legami idrogeno.⁵⁹

In conclusione, i risultati ottenuti dalle analisi effettuate mettono in luce che i diversi metodi di estrazione proteica possono avere un diverso impatto sulla struttura secondaria della proteina, con la soluzione DES che risulta essere la preferita per preservare l'integrità funzionale delle proteine.⁶⁰ La **Figura 30** illustra gli spettri FTIR della farina di nocciola, della proteina estratta con DES e della proteina estratta con ALKIS.

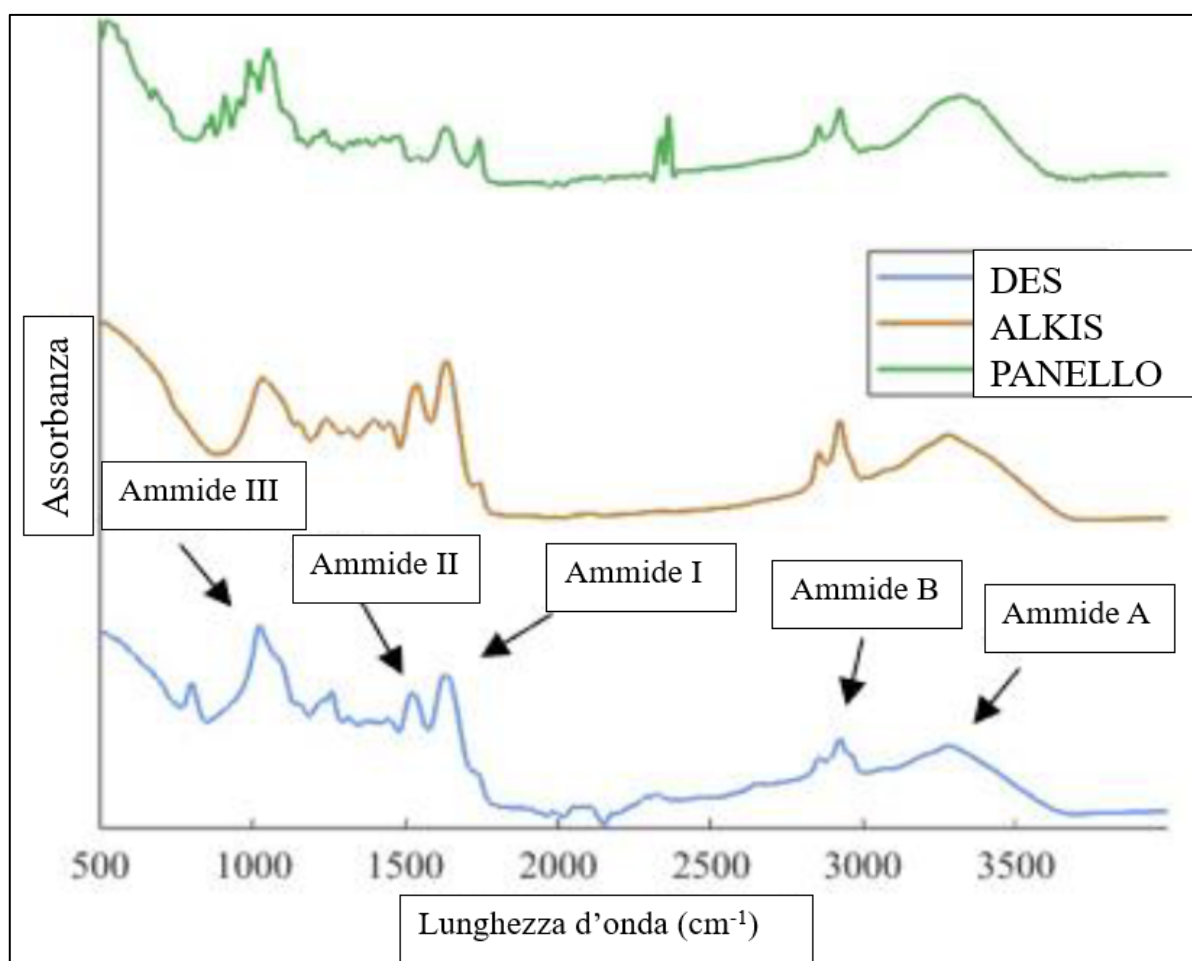


Figura 30. Spettri ATR-FTIR del pannello di nocciola (verde), della proteina estratta con ALKIS (marrone) e della proteina estratta con DES (blu).

3.4 Struttura secondaria delle proteine - Deconvoluzione dell'Ammide I

La regione dell'Ammide I, che copre lo spettro tra 1700 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} , è la banda più utilizzata per l'analisi strutturale negli spettri proteici. Questa regione è il risultato dell'interazione tra le vibrazioni di stiramento del gruppo C=O e quelle di piegatura nel piano del N-H.⁶⁰ All'interno di un intervallo di 100 cm^{-1} , la regione dell'Ammide I può essere suddivisa in bande separate che riflettono vari schemi di legame idrogeno, influenzando così l'energia vibrazionale dei gruppi ammidici. Poiché la disposizione dei legami a idrogeno dei legami peptidici determina la conformazione dello scheletro polipeptidico o il tipo di struttura secondaria, la regione dell'Ammide I serve come un marcatore distintivo per la composizione strutturale di una proteina.

Le diverse forme della banda dell'Ammide I osservate in proteine diverse indicano la loro complessa struttura, con più picchi e avvallamenti locali che rappresentano specifici elementi della struttura secondaria.⁵⁶ La **Figura 31** mostra l'intervallo di lunghezze d'onda, la struttura secondaria e il numero di picchi identificati negli spettri deconvoluti.

Intervallo lunghezza d'onda (cm^{-1})	Struttura Secondaria	Numero di picchi
1650–1660	α -elica	1
1600–1640	β -foglietto	2
1640–1650	bobine casuali	3
1660–1700	β -ripiegamenti	4

Figura 31. Intervallo di lunghezza d'onda, struttura secondaria e numero di picchi negli spettri deconvoluti.

L'analisi spettrale delle proteine estratte con DES e ALKIS evidenzia differenze nella struttura secondaria. In particolare, le proteine estratte con DES (**Figura 32: a-c**) mostrano una deconvoluzione ben definita, caratterizzata da una maggiore proporzione di picchi associati alle strutture β -foglietto, che mantengono gli amminoacidi idrofobici nelle regioni interne delle proteine ripiegate. Al contrario, le strutture α -elica si trovano generalmente all'esterno delle molecole proteiche.⁵⁷ Risultato supportato dal fatto che l'estrazione proteica tramite DES è associata alla presenza di legami idrogeno, i quali possono stabilizzare la struttura secondaria della proteina, proteggendola da cambiamenti strutturali. Diversamente, la proteina estratta con ALKIS (**Figura 32: d-f**) mostra una distribuzione dei picchi differente: il contributo delle strutture β -foglietto è ridotto, mentre l'aumento delle strutture bobine casuali potrebbe indicare una parziale denaturazione delle proteine.

Questo risultato suggerisce che l'impiego di soluzioni acide/alcaline forti potrebbe portare al dispiegamento delle proteine e, di conseguenza, a una riduzione del ripiegamento β -foglietto.

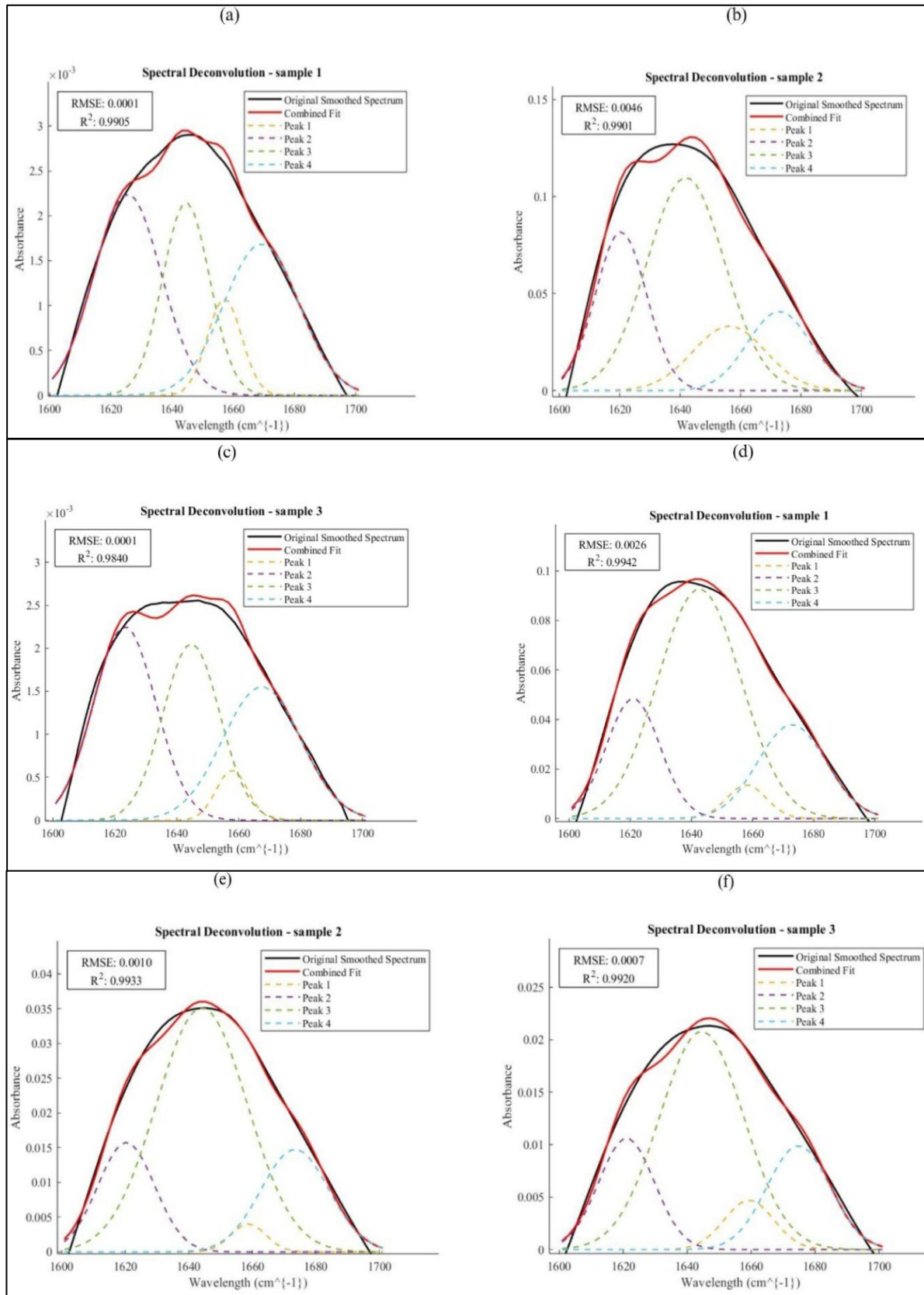


Figura 32. Risultati della deconvoluzione degli spettri per ciascun campione. a), b), c) mostrano i campioni estratti con DES. d), e), f) mostrano i campioni estratti con ALKIS.

Per confermare ulteriormente questa ipotesi, è stata calcolata la percentuale della struttura secondaria specifica, come illustrato nella **Figura 33**.

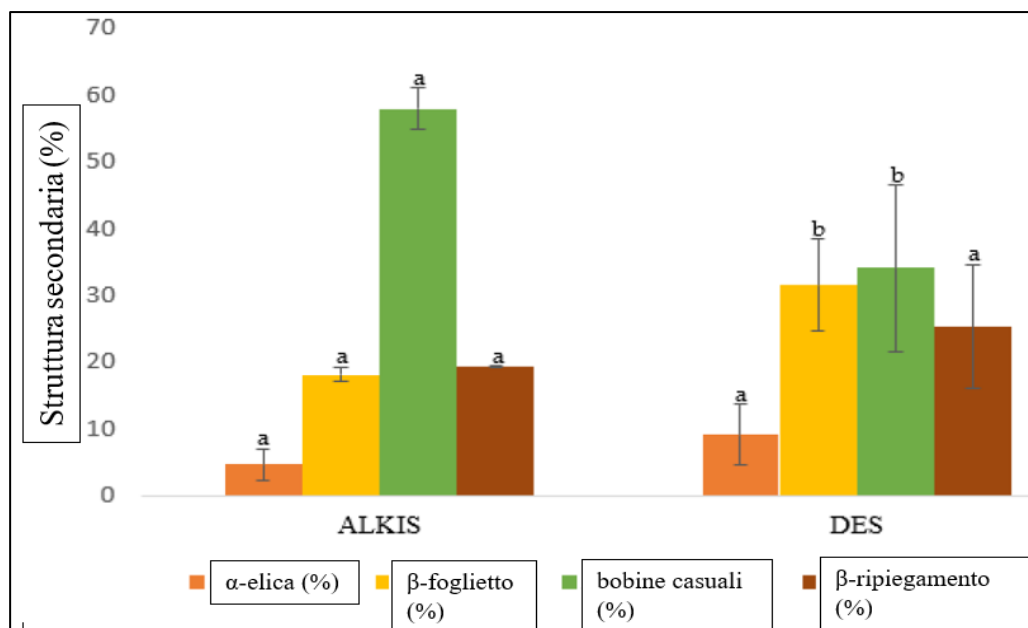


Figura 33. Percentuale di struttura secondaria delle proteine estratte con ALKIS e DES. I dati sono presentati come media $\pm$ deviazione standard ($n = 3$). Lettere diverse sopra le barre indicano differenze statisticamente significative tra i tipi di strutture secondarie tra i metodi di estrazione, come determinato tramite ANOVA a una via seguita dal test post hoc di Tukey ($p < 0,05$).

L'analisi quantitativa della banda Ammide I negli spettri infrarossi può essere eseguita tramite il fitting delle curve utilizzando spettri deconvoluti e spettri di derivata seconda, uno dei metodi impiegati per l'analisi della struttura proteica.⁶¹ La deconvoluzione della banda Ammide I e la quantificazione della struttura secondaria delle proteine hanno rivelato differenze significative nella composizione della struttura secondaria delle proteine estratte con ALKIS e DES. Le proteine ottenute tramite estrazione DES hanno mostrato una maggiore proporzione di α -elica (9,13%) rispetto a quelle estratte con ALKIS (4,67%), indicando una migliore conservazione degli elementi strutturali nativi. Inoltre, le proteine estratte con DES hanno presentato un contenuto aumentato di β -foglietto (31,55%) rispetto ad ALKIS (18,13%), suggerendo una maggiore stabilità strutturale. Al contrario, le proteine estratte con ALKIS hanno mostrato una predominanza di strutture bobine casuali (57,92%), significativamente superiore rispetto a quelle mostrate dall'estrazione con DES (34,07%), confermando un aumento del disordine strutturale e una possibile denaturazione delle proteine. Inoltre, il contenuto di β -ripiegamenti era più pronunciato nelle proteine estratte con DES (25,26%) rispetto a quelle estratte con ALKIS (19,28%), contribuendo a un miglior ripiegamento e funzionalità delle proteine. Queste osservazioni indicano che i DES sono più efficaci nel mantenere l'integrità strutturale delle proteine, probabilmente grazie a condizioni di estrazione meno aggressive che minimizzano la denaturazione proteica.

4. Conclusioni

Il lavoro di tesi ha messo in risalto le differenze tra le tecniche di estrazione tradizionali e quelle emergenti, con protagonisti i DES. La maggiore resa proteica ottenuta con i metodi di estrazione alcalina seguita da precipitazione isoelettrica può essere attribuita sia alla minore viscosità dell'acqua rispetto al DES, il che rende l'estrazione più efficiente, sia al processo di repulsione elettrostatica che avviene a pH basico, il che favorisce l'aggregazione delle proteine. Tuttavia, l'estrazione con DES, nonostante le rese inferiori, ha mostrato un approccio più caratteristico, con maggiore efficienza nell'estrazione proteica, indicando il suo potenziale per un recupero delle proteine più performante dal sottoprodotto della nocciola. Pertanto, questa miscela di DES ha il potenziale per estrarre proteine in modo selettivo da materiali di partenza a basso costo, riducendo l'impatto ambientale rispetto alle tecniche di estrazione alternative: è necessario, dunque, ottimizzare la resa di estrazione e le condizioni di processo per massimizzare l'estrazione delle proteine e minimizzare i costi. Inoltre, l'analisi FTIR ha appurato che l'estrazione con DES conserva meglio la struttura secondaria delle proteine, come evidenziato dal maggiore contenuto di α -elica e β -foglietto, suggerendo una maggiore stabilità strutturale e integrità funzionale. I cambiamenti nelle strutture secondarie delle proteine possono influenzare proprietà come l'idrofilicità, l'idrofobicità e la stabilità strutturale, che sono collegate ad attributi funzionali come la capacità di ritenzione idrica, l'idrofobicità superficiale e la capacità emulsionante.^{62,63}

In conclusione, questo studio ha dimostrato che l'estrazione proteica tramite solventi eutettici rappresenta una metodologia efficace e sostenibile per il recupero di proteine dalla biomassa di nocciolo. Queste osservazioni sottolineano il potenziale dell'estrazione con DES non solo come metodo più sostenibile, ma anche come tecnica preferibile per mantenere l'integrità strutturale delle proteine.

L'industria alimentare è infatti una delle maggiori aree di applicazione degli estratti DES, in quanto mostra un particolare interesse per proteine di alta qualità, destinate all'integrazione nella dieta e alla formulazione di nutraceutici. Gli alimenti funzionali vegetali iperproteici sono esempi concreti in questo ambito: bevande vegetali fortificate (a base di avena, soia, pisello) arricchite con proteine isolate da legumi o scarti agricoli; snack proteici e barrette vegetali con proteine funzionali estratte da semi, legumi, alghe o microalghe; meat analogs (carne vegetale) dove le proteine estratte con DES migliorano texture e profilo nutrizionale; pasta e prodotti da forno iperproteici, dove le proteine vegetali migliorano il contenuto di aminoacidi essenziali.⁶⁴

L'estrazione proteica mediata dai DES può condurre all'ottenimento di estratti con specifici effetti bioattivi, come elevati effetti antipertensivi nel caso delle proteine estratte da alcune fonti vegetali. Gli estratti DES possono anche mostrare attività antiossidanti e antimicrobiche superiori rispetto agli estratti acquosi. Le proteine recuperate con l'ausilio dei DES vengono inoltre applicate come ingredienti funzionali, in quanto offrono proprietà fisiche migliorate, quali una maggiore resistenza al calore e una migliore idrofobicità.⁴¹

Nell'agricoltura cellulare i DES possono essere utilizzati per isolare proteine di supporto (come fattori di crescita vegetali o proteine strutturali), produrre idrolizzati proteici usati come substrati nei bioreattori, riciclare scarti vegetali per ottenere biomolecole da impiegare nei mezzi di coltura delle cellule (scaffold o supporti nutrizionali). L'impatto di queste tecniche verdi offre vantaggi quali lo sviluppo di sistemi di coltura più economici per carne coltivata o tessuti vegetali, il recupero di sottoprodotti agroalimentari, il potenziale uso in bioplastiche o biomateriali da usare come scaffold o impalcature per la crescita cellulare.⁶⁵

In futuro, ulteriori ricerche potrebbero focalizzarsi sull'ottimizzazione dei parametri di estrazione e sull'applicazione di DES a diverse fonti proteiche, al fine di massimizzare l'efficienza e la qualità delle proteine estratte. L'integrazione di tecnologie emergenti come microonde, alta pressione/tensione e ultrasuoni con l'estrazione di proteine basata sui DES dovrebbe essere approfondita per aumentare l'efficienza di estrazione e il rendimento.³⁸ L'implementazione su scala industriale dei DES e dei loro estratti potrebbe risolvere problematiche tecniche e metodologiche attuali nell'industria alimentare, come la valorizzazione dei rifiuti e la volatilità dei solventi organici attualmente in uso.⁴¹

Ringraziamenti

Desidero ringraziare la Professoressa Debora Fino e la Dottoressa Silvia Fraterrigo Garofalo, relatrice e correlatrice della presente tesi, per avermi affidato questo progetto di ricerca, che ha permesso di approfondire le mie conoscenze e di acquisire nuove competenze. Ringrazio anche la Dottoressa Bruna Anzà per la sua guida, il suo supporto e la sua disponibilità durante tutto il percorso di tesi, fondamentali per la realizzazione di questo lavoro.

Grazie mamma e papà: ogni parola sarebbe riduttiva per esprimere quanto vi sono grato. Grazie per avermi sempre sostenuto con amore, pazienza e fiducia incondizionata. Grazie per avermi insegnato il valore dell'impegno e del rispetto. Senza il vostro esempio e il vostro supporto, questo traguardo non sarebbe stato possibile. Tutto questo è anche vostro.

Agli amici che mi hanno accompagnato in questa avventura: grazie per le risate, i consigli, i caffè, le serate a parlare (o a procrastinare). Siete stati una parte essenziale di questo viaggio. Senza di voi questa tesi sarebbe stata molto più noiosa (e probabilmente ancora in alto mare): non potevo desiderare un cast migliore per questa serie.

Lista delle figure

- Figura 1.** Logo Vortex.
- Figura 2.** Prodotti Mela Naste Beauty.
- Figura 3.** Prodotti Nocciola Naste Beauty.
- Figura 4.** Linea Spirulina Naste Beauty & ApuliaKundi.
- Figura 5.** Un sistema economico circolare. Legenda: R = risorse, P = produzione, C = consumo, U = utilità, W = rifiuti, r = riciclo.
- Figura 6.** Fasi del ciclo di vita considerate per i quattro metodi di trattamento dei rifiuti alimentari. Le linee tratteggiate indicano i crediti di sistema.
- Figura 7.** Tonda Gentile Romana.
- Figura 8.** Caratteristiche morfologiche del frutto e del nocciolo di cultivar di nocciola di diversa origine.
- Figura 9.** Composizione chimica di cultivar di nocciola di diversa origine.
- Figura 10.** Scarti della nocciola.
- Figura 11.** Composizione, proprietà nutritive e funzionali delle farine prodotte dalla varietà di nocciola cilena, Guevina avellana.
- Figura 12.** Composizione, proprietà nutritive e funzionali dei concentrati proteici ottenuti dalle farine disoleate prodotte dalla varietà di nocciola cilena, Guevina avellana.
- Figura 13.** Il principio base del meccanismo di precipitazione delle proteine.
- Figura 14.** Comportamento delle proteine in funzione del pH.
- Figura 15.** Da scarto a prodotto a valore aggiunto.
- Figura 16.** Applicazione dell'estrazione assistita da enzimi (EAE) da fonti proteiche.
- Figura 17.** Rappresentazione del punto eutettico in un diagramma di fase a due componenti.

- Figura 18.** Alcuni esempi di donatori (HBD) e accettori (HBA) di legame idrogeno.
- Figura 19.** Temperatura di fusione e viscosità di alcuni DES a base di cloruro di colina.
- Figura 20.** Confronto tra solventi ionici convenzionali, DES, NA-DES.
- Figura 21.** Meccanismo di vari processi di estrazione delle proteine utilizzando un DES come solvente.
- Figura 22.** Realizzazione di diversi DES a base di ChCl e isomeri del butandiolo.
- Figura 23.** Analizzatore elementare, CHNS: Elementar, Vario EL Cube.
- Figura 24.** Schema grafico del processo di estrazione e valorizzazione delle proteine dalla farina di nocciola disoleata.
- Figura 25.** Preparazione DES e successiva estrazione proteica.
- Figura 26.** Resa proteica (1) e rendimento (2) secondo il metodo di Dumas.
- Figura 27.** Spettrometro Alpha II ATR-IR.
- Figura 28.** Composizione approssimata della farina di nocciola disoleata.
- Figura 29.** Resa proteica e rendimento con metodo tradizionale e DES. Lettere diverse sopra le barre indicano differenze statisticamente significative tra i metodi di estrazione all'interno di ciascun parametro, come determinato tramite ANOVA a una via seguita dal test post hoc di Tukey ($p < 0,05$).
- Figura 30.** Spettri ATR-FTIR del pannello di nocciola (verde), della proteina estratta con ALKIS (marrone) e della proteina estratta con DES (blu).
- Figura 31.** Intervallo di lunghezza d'onda, struttura secondaria e numero di picchi negli spettri deconvoluti.
- Figura 32.** Risultati della deconvoluzione degli spettri per ciascun campione. a), b), c) mostrano i campioni estratti con DES. d), e), f) mostrano i campioni estratti con ALKIS.
- Figura 33.** Percentuale di struttura secondaria delle proteine estratte con ALKIS e DES. I dati sono presentati come media $\pm$ deviazione standard ($n = 3$). Lettere diverse sopra le barre indicano differenze statisticamente significative tra i tipi di strutture secondarie tra i metodi di estrazione, come determinato tramite ANOVA a una via seguita dal test post hoc di Tukey ($p < 0,05$).

Bibliografia

- [1] Vortex Srl. (2024, September 9). Vortex SRL SB. *Vortex Srl SB*. <https://www.vortex-srl.it/>
- [2] Stahel, W. R. (2016). The Circular Economy. *Nature*, 531, 435-438. <https://doi.org/10.1038/531435a>
- [3] Borrello, M., Caracciolo, F., Lombardi, A., Pascucci, S., & Cembalo, L. (2017). Consumers' Perspective on Circular Economy Strategy for reducing Food Waste. *Sustainability*, 9(1), 141. <https://doi.org/10.3390/su9010141>
- [4] Antikainen, R., Lazarevic, D., Seppälä, J. (2018). Circular Economy: Origins and Future Orientations. *Environmental Science, Economics*, Ch.7, 115-129. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50079-9_7
- [5] Corvellec, H., Stowell, A. F., & Johansson, N. (2021). Critiques of the circular economy. *Journal of Industrial Ecology*, 26(2), 421–432. <https://doi.org/10.1111/jiec.13187>
- [6] Johnson, J. M., Franzluebbbers, A. J., Weyers, S. L., & Reicosky, D. C. (2007). Agricultural opportunities to mitigate greenhouse gas emissions. *Environmental Pollution*, 150(1), 107–124. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.030>
- [7] Jamaludin, H., Elshreef, Elmaky, H.S., Sulaiman, S. (2022). The future of food waste: Application of circular economy. *Energy Nexus*, 7. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100098>
- [8] Santagata, R.; Ripa, M.; Genovese, A.; Ulgiati, S. (2021). Food waste recovery pathways: Challenges and opportunities for an emerging bio-based circular economy. A systematic review and an assessment. *Journal of Cleaner Production*, 286, 125490. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.125490>
- [9] Home, La FAO e Italia. Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura. FAOandItaly. <https://www.fao.org/fao-italy/it>
- [10] Slorach, P. C., Jeswani, H. K., Cuéllar-Franca, R., Azapagic, A. (2019). Environmental and economic implications of recovering resources from food waste in a circular economy. *Science of The Total Environment*, 693, 133516. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.322>
- [11] Öztürk, G. (2023). A waste material rich in bioactive compounds: Hazelnut waste. *European Food Science and Engineering*, 4(1), 15–25. <https://doi.org/10.55147/efse.1289656>

- [12] Karata, S., İslam, A., Tonkaz, T., Özkutlu, F., Rovira, M., Romero, A., Cristofori, V., Silvestri, C., Speranza, S., Çetin, S. and Yılmaz, G. (2018). Examination of modern and traditional applications in hazelnut production. *Acta Hort.* 1226, 329-332. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1226.49>
- [13] Coppola, G., Costantini, M., Orsi, L., Facchinetti, D., Santoro, F., Pessina, D., & Bacenetti, J. (2020). A Comparative Cost-Benefit Analysis of conventional and organic hazelnuts production systems in Center Italy. *Agriculture*, 10(9), 409. <https://doi.org/10.3390/agriculture10090409>
- [14] Nocciola Tonda Gentile Romana. Home, Nocciola Tonda Gentile Romana. <https://noccioleromane.it/>
- [15] Król, K., & Gantner, M. (2020). Morphological Traits and Chemical Composition of Hazelnut from Different Geographical Origins: A Review. *Agriculture*, 10(9), 375. <https://doi.org/10.3390/agriculture10090375>
- [16] Guiné, R.P.F., Reis, Correia, P.M. (2020). Hazelnut: A Valuable Resource. *International Journal of Food Engineering*, 6(2), 67-72. <https://doi.org/10.18178/ijfe.6.2.67-72>
- [17] Avanzato, D., Vaccaro, A. and Bevilacqua, D. (2009). A SHORT REVIEW OF NUT INDUSTRY IN EU. *Acta Hort.* 825, 41-48. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.825.3>
- [18] Ollani, S., Peano, C., & Sottile, F. (2024). Recent Innovations on the Reuse of Almond and Hazelnut By-Products: A review. *Sustainability*, 16(6), 2577. <https://doi.org/10.3390/su16062577>
- [19] Turan, D., Altay, F., & Güven, E. Ç. (2014). The influence of thermal processing on emulsion properties of defatted hazelnut flour. *Food Chemistry*, 167, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.070>
- [20] Zuniga, M.E., Soto, C., Moure, A. (2003). Enzymic pre-treatment of Guevina avellana mol oil extraction by pressing. *Process Biochemistry*, 39, 51-57. [https://doi.org/10.1016/s0032-9592\(02\)00286-8](https://doi.org/10.1016/s0032-9592(02)00286-8)
- [21] Moure, A., Dominguez, H., Zuniga, M.E., Soto, C., Chamy, R. (2002). Characterisation of protein concentrates from pressed cakes of Guevina avellana (Chilean hazelnut). *Food Chemistry*, 78, 179-186. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00397-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00397-1)
- [22] Turan, D., Capanoglu, E., & Altay, F. (2015). Investigating the effect of roasting on functional properties of defatted hazelnut flour by response surface methodology (RSM). *LWT*, 63(1), 758–765. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.061>
- [23] Coisson, J.D., Zeppa, G., Arlorio, M., Travaglia, F. (2009). Quality and Nutritional Properties of Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Oil and Defatted Flours. *Acta Hort*, 845, 671-676. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.845.105>

- [24] Piercy, E., Verstraete, W., Ellis, P. R., Banks, M., Rockström, J., Smith, P., Witard, O. C., Hallett, J., Hogstrand, C., Knott, G., Karwati, A., Rasoarahona, H. F., Leslie, A., He, Y., & Guo, M. (2022). A sustainable waste-to-protein system to maximise waste resource utilisation for developing food- and feed-grade protein solutions. *Green Chemistry*, 25(3), 808–832. <https://doi.org/10.1039/d2gc03095k>
- [25] Takefuji, Y. (2020). Sustainable protein alternatives. *Trends in Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.11.012>
- [26] Novák, P. (2016). Protein Extraction and Precipitation. *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry*, 51–62. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63688-1.00004-5>
- [27] Kamal, H., Le, C. F., Salter, A. M., & Ali, A. (2021). Extraction of protein from food waste: An overview of current status and opportunities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(3), 2455–2475. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12739>
- [28] Selling, G.W., Hojilla-Evangelista, M.P., Evangelista, R.L., Isbell, T. (2013). Extraction of proteins from pennycress seeds and press cake. *Industrial Crops and Products*, 41, 113-119. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.009>
- [29] Baker, P.W., Charlton, A. (2020). A comparison in protein extraction from four major crop residues in Europe using chemical and enzymatic processes-a review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 59, 102239. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102239>
- [30] Yasothai, R., Giriprasad, R. (2015). ACID/ALKALINE SOLUBLIZATION METHOD OF PROCESSING PROTEIN. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 4(1), 96-100.
- [31] Valenzuela, C., Abugoch, L., Tapia, C., & Gamboa, A. (2012). Effect of alkaline extraction on the structure of the protein of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and its influence on film formation. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(4), 843–849. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12035>
- [32] Zhang, B., Cui, Y., Yin, G., Li, X., & Zhou, X. (2009). Alkaline extraction method of cottonseed protein isolate. *Modern Applied Science*, 3(3). <https://doi.org/10.5539/mas.v3n3p77>
- [33] Shen, L., Wang, X., Wang, Z., Wu, Y., Chen, J. (2008). Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. *Food Chemistry*, 107(2), 929–938. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.04>
- [34] Boye, J.I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., Rajamohamed, S.H. (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43(2), 1–546. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.021>

- [35] de Souza, D., Sbardelotto, A.F., Ziegler, D.R., Marczak, L.D.F., Tessaro, I.C. (2015). Characterization of rice starch and protein obtained by a fast alkaline extraction method. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.03>
- [36] Zaky, A.A., Chen, Z., Liu, Y., Li, S., Jia, Y. (2019). Preparation and assessment of bioactive extracts having antioxidant activity from rice bran protein hydrolysates. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13, 2542-2548. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00174-9>
- [37] Zhao, Y., Tian, R., Xu, Z., Jiang, L., Sui, X. (2023). Recent Advances in Soy Protein Extraction Technology. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 100 (3), 187-195. <https://doi.org/10.22541/au.165634204.41824834/v1>
- [38] Patra, A., Arun, P.V., Pandiselvam, R. (2023). Deep eutectic solvent: An emerging trend for extraction of plant proteins. *Journal of Molecular Liquids*, 389, 122887. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.122887>
- [39] Zeng, Q., Wang, Y., Huang, Y., Ding, X., Chen, J., & Xu, K. (2014). Deep eutectic solvents as novel extraction media for protein partitioning. *The Analyst*, 139(10), 2565. <https://doi.org/10.1039/c3an02235h>
- [40] Hansen, B. B., Spittle, S., Chen, B., Poe, D., Zhang, Y., Klein, J. M., Horton, A., Adhikari, L., Zelovich, T., Doherty, B. W., Gurkan, B., Maginn, E. J., Ragauskas, A., Dadmun, M., Zawodzinski, T. A., Baker, G. A., Tuckerman, M. E., Savinell, R. F., & Sangoro, J. R. (2021). Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chemical reviews*, 121(3), 1232-1285. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00385>
- [41] Bowen, H., Durrani, R., Delavault, A., Durand, E., Chenyu, J., Yiyang, L., Lili, S., Jian, S., Weiwei, H., & Fei, G. (2022). Application of deep eutectic solvents in protein extraction and purification. *Frontiers in Chemistry*, 10. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.912411>
- [42] Smith, E. L., Abbott, A. P., & Ryder, K. S. (2014). Deep Eutectic Solvents (DESS) and their applications. *Chemical Reviews*, 114(21), 11060–11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>
- [43] Mgxadeni, N., Kabane, B., Bahadur, I., Varma, R.S., Singh, S.K. (2023). Deep eutectic solvents as sustainable solvents for industrial separation problems: A recent update. *Journal of Ionic Liquids*, 3 (2). <https://doi.org/10.1016/j.jil.2023.100065>
- [44] Ling, J. K. U., & Hadinoto, K. (2022). Deep Eutectic solvent as green solvent in extraction of biological macromolecules: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3381. <https://doi.org/10.3390/ijms23063381>
- [45] Saini, A., Kumar, A., Panesar, P.S., Thakur, A. (2022). Potential of deep eutectic solvents in the extraction of value -added compounds from agro -industrial by -products. *Applied Food Research*, 2(2). <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100211>

- [46] Nades Design. Building a better and sustainable future with innovative green solvent technology. <https://nades-design.hr/>
- [47] Hikmawanti, N. P. E., Ramadon, D., Jantan, I., & Mun'im, A. (2021). Natural Deep Eutectic Solvents (NADES): Phytochemical extraction performance enhancer for pharmaceutical and nutraceutical product development. *Plants*, 10(10), 2091. <https://doi.org/10.3390/plants10102091>
- [48] Lores, H., Romero, V., Costas, I., Bendicho, C., & Lavilla, I. (2016). Natural deep eutectic solvents in combination with ultrasonic energy as a green approach for solubilisation of proteins: application to gluten determination by immunoassay. *Talanta*, 162, 453–459. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.078>
- [49] Cao, P.H., Zhang, C.X., Ma, Y.X., Yu, Y.M. (2023). Extraction of protein from sesame meal: Impact of deep eutectic solvents on protein structure and functionality. *Food Science and Technology*, 187, 115366. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115366>
- [50] Lin, J., Xiang, H., Sun-Waterhouse, D., Chun, C.C., Wang, W. (2022). Deep eutectic solvents and alkaline extraction of protein from seabuckthorn seed meal: a comparison study. *Food Science and Human Wellness*, 11, 1028-1035. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.03.019>
- [51] Yue, J., Zhu, Z., Yi, J., Lan, Y. (2021). Structure and functionality of oat protein extracted by choline chloride-dihydric alcohol deep eutectic solvent and its water binary mixtures. *Food Hydrocolloids*, 112, 106330. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106330>
- [52] Yue, J., Zhu, Z., Yi, J., Li, H. (2022). One-step extraction of oat protein by choline chloride-alcohol deep eutectic solvents: Role of chain length of dihydric alcohol. *Food Chemistry*, 376, 131943. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131943>
- [53] Isci, A., & Kaltschmitt, M. (2021). Recovery and recycling of deep eutectic solvents in biomass conversions: a review. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 12(S1), 197–226. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01860-9>
- [54] Katrak, V.K., Ijardar, S.P., (2024). Redefining the landscape of protein extraction and separation from various sources using deep eutectic solvents. *Trends in Food Science & Technology*, 153, 104733. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104733>
- [55] Zhao, Y.R., Peng, N., Li, Y.Q., Liang, Y. (2024). Physicochemical properties, structural characteristics, and pro-teín digestibility of pea protein-wheat gluten composited meat analogues prepared via high-moisture extrusion. *Food Hydrocolloids*, 156, 110283. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.110283>
- [56] Tintor, D., Ninković, K., Milošević, J., Polović, N.D. (2024). Gaining insight into protein structure via ATR-FTIR spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 134, 103726. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2024.103726>

- [57] Ceylan, F. D., Adrar, N., Günal-Köroğlu, D., Subaşı, B. G., & Capanoglu, E. (2022). Combined Neutrase–Alcalase Protein Hydrolysates from Hazelnut Meal, a Potential Functional Food Ingredient. *ACS Omega*, 8(1), 1618–1631. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07157>
- [58] Liu, F.F., Li, Y.Q., Wang, C.Y., Liang, Y. (2022). Physicochemical, functional, and antioxidant properties of mung bean protein enzymatic hydrolysates. *Food Chemistry*, 393, 133397. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133397>
- [59] Sanchez-Fernandez, A., Prevost, S., & Wahlgren, M. (2022). Deep eutectic solvents for the preservation of concentrated proteins: the case of lysozyme in 1 : 2 choline chloride : glycerol. *Green Chemistry*, 24(11), 4437–4442. <https://doi.org/10.1039/d1gc04378a>
- [60] Byrne, B., Beattie, J., Song, C.L., Kazarian, S. (2020). ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging of proteins. *Vibrational Spectroscopy in Protein Research*, 1-22. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818610-7.00001-3>
- [61] Li, L., Zhang, Q., Yuan, X., Yang, H., Qin, S., Hong, L., Pu, L., Li, L., Zhang, P., & Zhang, J. (2024). Study of the molecular structure of proteins in fermented Maize-Soybean meal-based rations based on FTIR spectroscopy. *Food Chemistry*, 441, 138310. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138310>
- [62] Utsumi, S., Maruyama, N., Satoh, R., Adachi, M. (2002). Structure-function relationships of soybean proteins revealed by using recombinant systems. *Enzyme Microb. Technol*, 30, 284-288. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00507-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00507-5)
- [63] Zhao, X.Y., Chen, F.S., Xue, W.T., Lee, L. (2008). FTIR spectra studies on the secondary structures of 7S and 11S globulins from soybean proteins using AOT reverse micellar extraction. *Food Hydrocoll*, 22, 568-575. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.01.019>
- [64] Tan, M., Nawaz, M. A., & Buckow, R. (2021). Functional and food application of plant proteins – a review. *Food Reviews International*, 39(5), 2428–2456. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1955918>
- [65] Eibl, R., Senn, Y., Gubser, G., Jossen, V., Van Den Bos, C., & Eibl, D. (2021). Cellular agriculture: opportunities and challenges. *Annual Review of Food Science and Technology*, 12(1), 51–73. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-063020-123940>
- [66] Elementar Analysensysteme GmbH. Vario EL cube dell’analizzatore elementare organici. *Elementar*. <https://www.elementar.com/it/prodotti/analizzatori-elementari-organici/vario-el-cube>
- [67] ALPHA II Compact FT-IR Spectrometer. *Bruker*. <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-ir-routine-spectrometer/alpha-ii-compact-ft-ir-spectrometer.html>

- [68] Anzà, B., Fraterrigo Garofalo, S., Lapolla, A., Fino, D. (2025). Green Protein Extraction from Hazelnut Press Cake: Yield, Efficiency, and Secondary Structure Analysis. *Separations*, 12, 63. <https://doi.org/10.3390/separations12030063>

