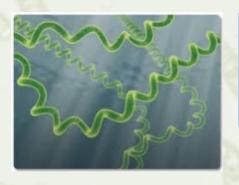


Ottenimento di ficocianina e misure spettrofotometriche

Eva Gabrielli¹, Glauco Stracci², Fabio Barbato¹ ENEA DTE - BBC BBE¹/FSN TEF²



ARTHROSPIRA spp.



- Spirulina, fonte di cibo sin dagli
 Aztechi, popoli lago Ciad
- Cyanophyceae: batteri fotosintetici (procarioti)
- alghe filamentose, tricomi cilindrici multicellulari a spirale (100-200 μ)
- laghi salati tropicali e subtropicali
- ricca di proteine e vitamine

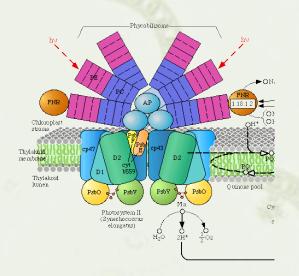
COMPOSIZIONE DI	100g di SI	PIRULINA
Proteine Glucidi Lipidi		50 a 70 g 15 a 25 g 6 g
Minerali: Calcio Fosforo Magnesio Sodio Potassio Ferro Zinco Manganese		770 mg 780 mg 250 mg 450 mg 1100 mg 120 mg 3 mg 3 mg
Vitamine: Betacarotene Tiamina Riboflavina Acido Pantotenico Piridossina Inositolo Biotina Acido Folico Cobalamina Tocoferolo	A B1 B2 B3 B5 B6 B7 B8 B9 B12	130 mg 5 mg 4 mg 13 mg 2 mg 0,7 mg 35 mg 0,01 mg 0,05 mg 0,2 mg 20 mg

"i seguenti valori sono indicativi e possono variare a causa delle condizioni naturali dei procotto. Qui di seguito vengono elencati i valori medi osservati

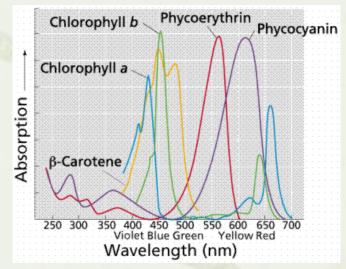


FICOCIANINA

- pigmento famiglia FICOBILINE
- organizzate in FICOBILISOMI sulla membrana tilacoidale
- assorbe fino a 620 nm, emette fluorescenza a 650 nm



Spettro di assorbimento dei diversi pigmenti



Impieghi commerciali

• integrazione alimentare (antiossidante, antinfiammatorio, antitumorale)



- settore alimentare:colorante naturale
- settore analitico: indagini immunodiagnostiche



CRITICITA'/OBIETTIVI:

- ricerca su tecniche di coltura che permettano una maggiore produzione di biomolecole
- protocollo di estrazione e purificazione che ottimizzi costi/benefici

COLTIVAZIONE SPIRULINA

Lab. "Algatec" C.R. ENEA Casaccia

- A. platensis(ceppo 21 e 85)
- A. maxima (ceppo 84)
 - Sterilizzazione chimica
 - Fertilizzante
 - Sali
 - Agitazione

• sacchi da 20 L



bottiglie da 2L



•Vasche da 1500 L, in serra



RACCOLTA E FILTRAZIONE

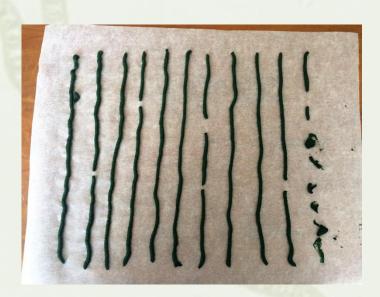
Setaccio da 25 μ e panno da 1μ





In stufa a 50°C, a spaghetti





ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE FICOCIANINA

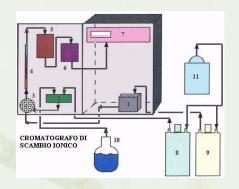
In base alla letteratura:

- acidi organici/inorganici
- tampone fosfato
- ultrasuoni
- microonde
- omogeneizzazione
- congelamento/scongelamento
- trattamento con lisozima
- cromatografia
- precipitazione in solfato di ammonio









ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE FICOCIANINA



- centrifugazione
- spettrofotometria

VARIABILI:

- secco/umido
- metodo chimico/fisico
- solvente
- temperatura

Chapman & Kremer, 1988:

- "Purity ratio" CPC (mg/ml^-1)= A(620)/A(280)
- •[CPC]mg/ml = [A(620)-0,474*A(652)]/5,34



PROVE DI ESTRAZIONE

- Think may place the place
- Estrazione con acidi organici (CH3COOH)
- Estrazione con acidi inorganici (HCI)
- Estrazione tramite acqua e calore
- + centrifugazione
- Estrazione tramite acqua e calore da biomassa congelata o secca
- Omogeneizzazione + acqua e calore
- Estrazione con calore e a temperatura ambiente, da biomassa fresca
- Estrazione mediante tecniche combinate: omogeneizzazione, congelamento e tampone fosfato



RISULTATI: Biomassa di Arthrospira

le rese delle coltivazioni, condotte a volumi di 20 L, sono risultate di 0,8-0,6 g/L in peso secco

Coltura	Specie	Esp.		
vasca (1500L)	A. platensis 21	B1, B2		
vasca (1500L)	A. platensis 21	B4		
vasca (1500L)	A. platensis 21	В6		
sacco (20 L)	A. maxima 84	A1, A2		
	A. platensis 21	B2bis, B3,		
sacco (20 L)	processes ==	B3-bis		
sacco (20 L)	A. maxima 84	/		
sacco (20 L)	A. maxima 84	/		
sacco (20 L)	A. platensis 21	B6 bis		

RISULTATI: Ottenimento ficocianina

Esperimento	biomassa	solvente	T°	Ottenimento ficocianina
A1	umida (A.maxima)	СНЗСООН	T ambiente	no
A2	umida (A.maxima)	HCI	T ambiente	no
			Congelatore -20; <u>50°C</u>	
B1	secca (A.platensis)	acqua	<u>in stufa</u>	si
			Congelatore -20; <u>50°C</u>	
B2	secca (A.platensis)	acqua	<u>in stufa</u>	si
B2bis	secca (A.platensis)	acqua	50°C in stufa	no
	(6)	Carrier 1	Congelatore -20; 50°C	
В3	secca (A.platensis)	acqua	in stufa	no
B3bis	secca (A.platensis)	acqua	50°C in stufa	no
B4	secca (A.platensis)	acqua	50°C in stufa	no
B5	umida (A.maxima)	acqua	T ambiente	no
B5bis	umida (A.platensis)	acqua	50 C° in stufa	no
		tampone	congelatore - 20 C°;	
B6	secca (A.platensis)	fosfato	frigo 5 C°	si
		tampone	congelatore – 20 C°;	
B6 bis	secca (A.platensis)	fosfato	frigo 5 C°	si

RISULTATI: Ottenimento ficocianina

• in due degli esperimenti in cui il solvente utilizzato era acqua, ed il campione era stato posto in stufa, dopo tre giorni è stato prelevato il primo estratto, il maggiore sviluppo di pigmento si è ottenuto dopo 6-10 giorni (campioni SP-ZA)



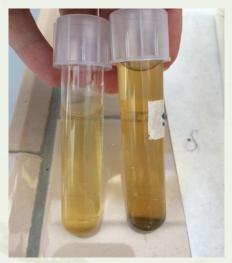
• nei due esperimenti in cui era stato utilizzato tampone fosfato, ed il campione era stato messo in frigo a 5°C, la prima produzione di ficocianina si è avuta dopo 1 giorno, la quantità più consistente dopo 5 (SP-AS e SP-CA) e 8 giorni (SP-CB)



RISULTATI: Ottenimento ficocianina

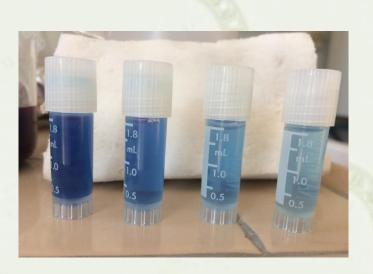
- lasciando alla luce e temperatura ambiente provette di ficocianina ottenute da uno degli esperimenti in cui era stata usata l'acqua come solvente, dopo circa 90 giorni la ficocianina ha modificato il suo colore schiarendosi fino al giallino, ma lo stesso fenomeno si è osservato anche per altri tipi di estrazione (Silveira et al., 2007)





RISULTATI: Analisi spettrofotometriche

Campioni	Diluizione
SP-ZA1, -AS1,-CA1,CB1	1:1
SP-ZA2, -AS2,-CA2,CB2	1:2
SP-ZA3, -AS3,-CA3,CB3	1:5
SP-ZA4, -AS4,-CA4,CB4	1:10







Spettrofotometro Perkin-Elmer 950S



- spettrofotometro a rilevazione automatica a doppio raggio Perkin Elmer Lambda 950S
- spettro di scansione 300 -2500 nm
- risoluzione spettrale 5 nm
- apertura delle slitte, che determinano la suddivisione in spettri monocromatici, è 2nm nello spettro visibile
- modalità servo assistita nell'infrarosso vicino, in modo da avere per ogni lunghezza d'onda il massimo dell'energia disponibile

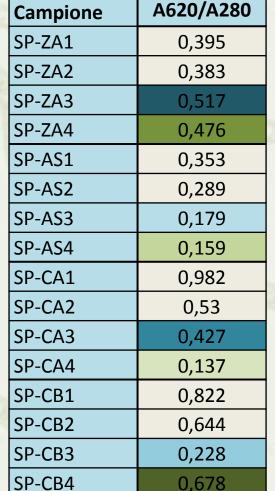
RISULTATI: Analisi spettrofotometriche

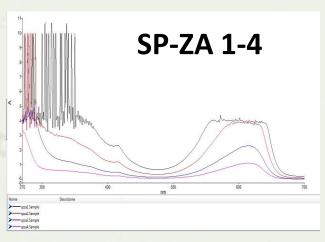
1:10 CB-ZA-AS-CA

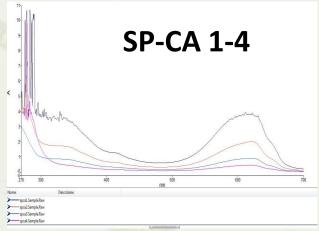
1:5 ZA-CA-CB-AS

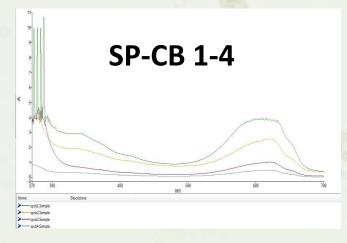
Purezza ficocianina

10 9 8 7 7 6	SI	P-AS 1	L-4	T
2 1 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2	400 Decisione	550 nm	Sin	700

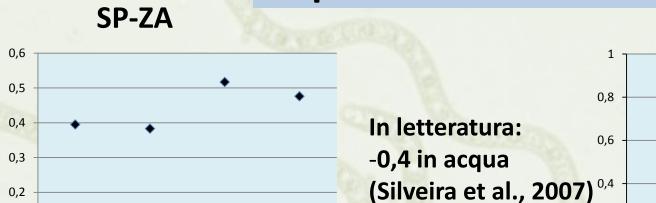




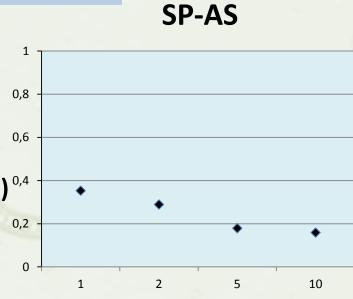


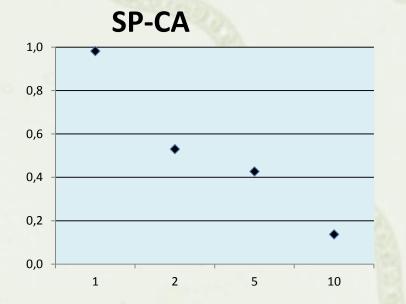


RISULTATI: purezza ficocianina

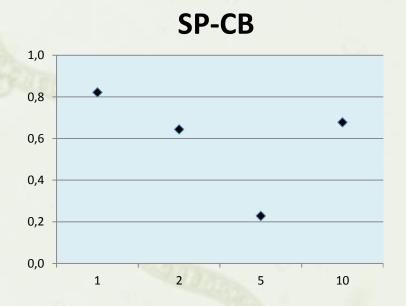


1,0 in t. fosfato(Chaiklahan, 2011)

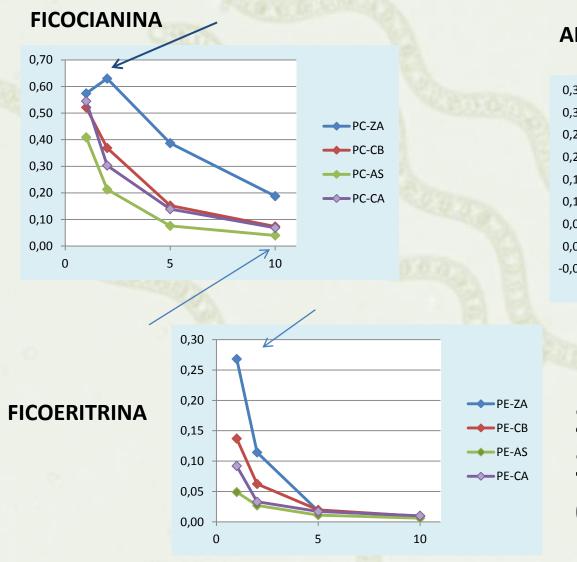




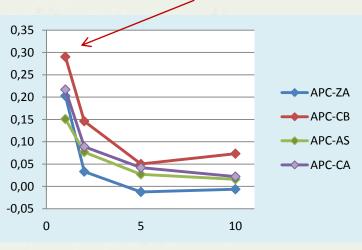
0,1



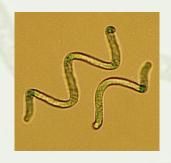
RISULTATI: concentrazione ficobiliproteine



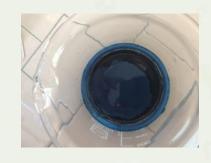
ALLOFICOCIANINA



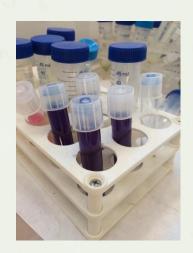
1.PC = ficocianina 2.APC = alloficocianina 3.PE = ficoeritrina (tranne per SP-ZA)



CONCLUSIONI:



- -è possibile estrarre la ficocianina sia da biomassa secca che umida;
- -le condizioni di coltivazione possono condizionare la maggiore o minore produzione;
- l'uso di acqua some solvente è economicamente competitivo ma determina una estrazione più lenta e generalmente incompleta;
- -il congelamento permette di rompere i legami della parete cellulare ma da solo non è sufficiente;
- -è necessario combinare più metodiche per arrivare ad un'estrazione efficiente;
- -la luce e temperature non refrigerate tendono a degradare la ficocianina, dal punto di vista commerciale occorre tenerne conto



CONCLUSIONI:



Punti di forza della ricerca:

- 1- ficocianina ottenuta in modo semplice ed economico;
- 2- concentrazioni significative di ficobiliproteine
- 3-ficocianina con un grado di purezza spettrofotometrica confrontabile con indicazioni presenti in letteratura.

Criticità:

1-necessità di produrre un protocollo di analisi spettrofotometrica idoneo e affidabile;

2-solamente l'utilizzazione di un campione correttamente diluito porta ad una valutazione affidabile delle analisi spettrofotometriche; 3-rimane da effettuare la validazione dei risultati spettrofotometrici ottenuti con un'estrazione fisico-chimica che permetta di misurare una resa di prodotto in peso secco (mg/L).

