



I BIOSURFATTANTI

I tensioattivi microbici costituiscono un gruppo diversificato di molecole note per una varietà di strutture chimiche, come glicolipidi, lipopeptidi e lipoproteine, acidi grassi, lipidi neutri, fosfolipidi e strutture polimeriche e particellari. Sono promettenti alternative ai tensioattivi sintetizzati chimicamente grazie alla loro minore tossicità, alla maggiore biodegradabilità e, quindi, alla maggiore compatibilità ambientale.

Il termine *tensioattivo* deriva dal termine inglese *surfactant*, **surface active agent**. I tensioattivi sono di solito composti organici anfifilici, cioè contengono sia gruppi idrofobici, le loro “code”, che gruppi idrofili, le loro “teste”. Pertanto, sono solubili sia in solventi organici che in acqua. Il termine *surfactant* è stato coniato da Antara Products Inc. nel 1950. I tensioattivi riducono la tensione superficiale dell’acqua adsorbendo all’interfaccia liquido-gas. Riducono anche la tensione interfacciale tra olio e acqua adsorbendo all’interfaccia liquido-liquido. Molti tensioattivi possono anche assemblarsi in soluzione e in aggregati. Esempi di tali aggregati sono le vescicole e le micelle. La concentrazione alla quale i tensioattivi iniziano a formare micelle è nota come concentrazione critica delle micelle o CMC. Quando le micelle si formano in acqua, le loro code formano un nucleo che può incapsulare una goccia d’olio, e le loro teste (ioniche/polari) formano un guscio esterno che mantiene un contatto favorevole con l’acqua.

Produzione di biosurfattanti

Quasi tutti i tensioattivi sintetici attualmente in uso sono chimicamente derivati petrolchimici. Questi composti sono solitamente tossici per l’ambiente, e possono rilasciare sostanze chimiche tossiche quando si decompongono, sono tossici per la pelle umana e anche i loro sottoprodotti possono essere pericolosi per l’ambiente; a causa della loro natura persistente (non biodegradabile) possono influenzare negativamente la fertilità del suolo e anche contaminare i corpi idrici. Nonostante questi svantaggi, il loro uso aumenta di giorno in giorno a livello globale sia nelle industrie che nelle famiglie.

I biosurfattanti sono composti tensioattivi prodotti da cellule viventi. La loro natura e le loro capacità di ridurre la tensione superficiale dipendono dal tipo e dal ceppo di microrganismo (batteri, lieviti, funghi) utilizzato e dal substrato nutriente disponibile per la crescita cellulare.

I tensioattivi microbici, o biosurfattanti, sono metaboliti tensioattivi prodotti dai microrganismi che crescono su substrati miscibili con l’acqua oppure oleosi: essi rimangono aderenti alle superfici delle cellule microbiche o vengono secreti nel brodo di coltura. Essi costituiscono un gruppo diversificato di molecole tensioattive note per una varietà di strutture chimiche, come glicolipidi, lipopeptidi e lipoproteine, acidi grassi, lipidi neutri, fosfolipidi e strutture polimeriche e particellari. Le caratteristiche che li rendono promettenti alternative ai tensioattivi sintetizzati chimicamente sono la loro minore tossicità, la maggiore biodegradabilità e, quindi, la maggiore compatibilità ambientale, le migliori proprietà schiumogene (utili nella lavorazione dei minerali) e l’attività stabile agli estremi di pH, salinità e temperatura. Le attività dei biosurfattanti possono essere determinate misurando i cambiamenti nelle tensioni superficiali e interfacciali, la stabilizzazione o destabilizzazione delle emulsioni e l’equilibrio idrofilo-lipofilo (HLB). La tensione superficiale di interfacce aria/acqua e olio/acqua può essere facilmente misurata con un tensiometro.

I biosurfattanti hanno proprietà uniche che i tensioattivi sintetizzati chimicamente non hanno, come l’alta attività di superficie, la compatibilità ambientale, la minore tossicità e la biodegradabilità, la buona attività antimicrobica e il fatto di non perdere le proprietà fisico-chimiche a diverse temperature, pH e in

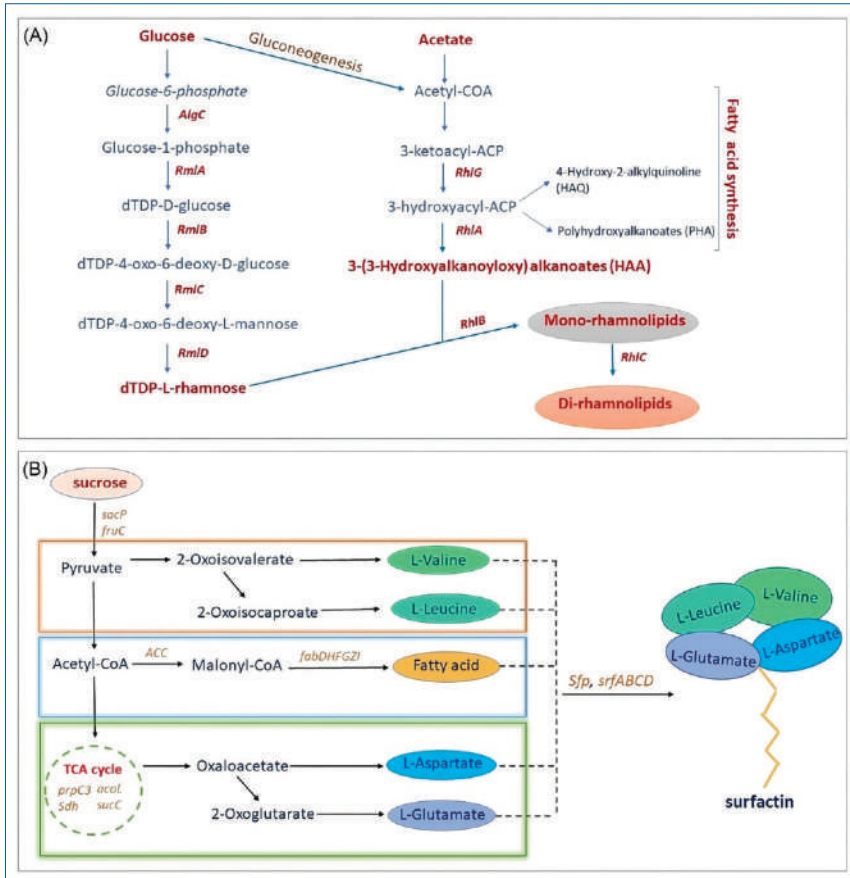
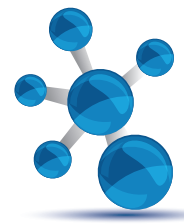


Fig. 1 - Sintesi dei biosurfattanti (da [5])

presenza di elettroliti. Sono ampiamente utilizzati nel recupero microbico del petrolio (MEOR), nell'agricoltura, nell'industria del cibo, nei cosmetici e nelle industrie farmaceutiche. Oggi il petrolio greggio e i prodotti petroliferi sono la principale fonte di idrocarburi inquinanti per il suolo e gli ambienti marini. A causa della natura insolubile di questi inquinanti in acqua, la loro rimozione dall'ambiente è molto complessa. La biodegradazione degli idrocarburi da parte di microrganismi è uno dei modi promettenti per rimuoverli dal suolo e dall'ambiente marino.

Produzione di biosurfattanti con sistemi a celle di flusso continue a ultrasuoni

Gli ultrasuoni sono suoni non udibili all'orecchio umano e sono suddivisi in ultrasuoni di potenza 20-100 kHz, ultrasuoni ad alta frequenza (20 kHz - 2 MHz) e, come per l'ecografia diagnostica, frequenza superiore a 1 MHz. In pratica, gli ultrasuoni sono utilizzati in due gamme: bassa intensità (alta frequenza 100 kHz - 1 MHz, bassa potenza inferiore a

1 W/cm²) e alta intensità (bassa frequenza 2-100 kHz, alta potenza di 10-1000 W/cm²). A seconda dell'intensità, il loro utilizzo può avere diversi impatti biologici, da benefici a distruttivi. Gli effetti primari sono dovuti al fenomeno della cavitazione, che provoca cambiamenti chimici e fisici. È stato dimostrato che gli ultrasuoni aumentano la permeabilità cellulare che promuove o rilascia metaboliti cellulari ed esosomi vescicolari. Gli ultrasuoni possono essere impiegati in diverse fasi, tramite sonde o sistemi ad ultrasuoni a celle di flusso continuo. Gli ultrasuoni a bassa intensità promuovono il trasferimento di massa attraverso lo strato limite, la membrana cellulare e persino il citosol, riducendo lo spessore dello strato limite. Inoltre, il trasferimento di massa indotto dagli ultrasuoni può alterare i siti attivi di enzimi e quindi modificare l'attività enzimatica. Al contrario, gli ultrasuoni ad alta intensità possono

causare la rottura della membrana cellulare e possono danneggiare macromolecole vitali o addirittura indurre lisi. L'utilizzo di ultrasuoni a bassa intensità può stimolare e controllare l'attività dei microrganismi insieme ad altri processi, come la fermentazione, per aumentare l'efficienza e la produttività. L'idea alla base della cavitazione idrodinamica è che quando passa un liquido attraverso una costrizione o una piccola apertura, come un orifizio, la pressione del liquido aumenta e la pressione locale attorno alla vena scende al di sotto della pressione di soglia, creando una cavità.

Applicazioni dei biosurfattanti

Le applicazioni dei biosurfattanti, tuttavia, sono ancora in fase di sviluppo a livello industriale. Lo sviluppo dell'applicazione dei biosurfattanti nelle industrie si concentra principalmente sull'alta resa di produzione dei biosurfattanti e sulla formulazione di biosurfattanti altamente attivi con proprietà specifiche. Considerando le ampie applicazioni potenziali dei

biosurfattanti, è importante migliorarne la produzione a livello commerciale e testare un'ampia varietà di diversi microrganismi che possano produrre biosurfattanti con diverse strutture chimiche e proprietà di superficie. I biosurfattanti migliorano l'emulsificazione degli idrocarburi, solubilizzano i contaminanti idrocarburi e, di conseguenza, permettono la crescita microbica su una fonte di carbonio immiscibile in acqua.

I surfattanti o tensioattivi sono molecole in grado di abbassare la tensione superficiale di un liquido e che possiedono proprietà schiumogene, bagnanti, detergenti e solubilizzanti, grazie alla loro doppia natura idrofila e lipofila. I surfattanti di origine microbica, o biosurfattanti, possono essere classificati in quattro gruppi principali sulla base della specie di microrganismo produttore e sulla base della loro struttura chimica: lipopeptidi e lipoproteine, glicolipidi, fosfolipidi e surfattanti polimerici. Un'ulteriore classificazione distingue i biosurfattanti in base al loro peso molecolare: quelli a basso peso molecolare vengono definiti biosurfattanti mentre i polimeri ad alto peso molecolare prendono il nome di bioemulsionanti.

Da un punto di vista strutturale, la porzione idrofila dei biosurfattanti è costituita solitamente da carboidrati, peptidi ciclici, amminoacidi, fosfati, acidi carbossilici o alcoli, mentre la porzione idrofobica è costituita da lunghe catene di acidi grassi.

I biosurfattanti sono secreti nell'ambiente extracellulare o derivano da porzioni di membrana cellulare di batteri, lieviti e funghi. I surfattanti maggiormente studiati sono i lipopeptidi prodotti da *Bacillus subtilis*, i glicolipidi prodotti da *Pseudomonas aeruginosa* e i soforolipidi isolati da diverse specie di *Candida*. Tra i glicolipidi prodotti da *P. aeruginosa*, i ramnolipidi, rappresentano una classe di composti estremamente promettente in quanto saranno la prossima generazione di biosurfattanti che raggiungeranno il mercato. Infatti, un numero elevato di pubblicazioni scientifiche e brevetti (più di 300 a copertura mondiale) è stato dedicato recentemente a questa classe di molecole. I ramnolipidi vengono spesso descritti come i migliori tensioattivi microbici finora caratterizzati. Hanno un gruppo glicosilico (ramnosio) e una coda costituita da un acido grasso, acido 3-idrossidecanoico. Precisamente, esistono due classi principali di ramnolipidi: mono-ramnolipidi

e di-ramnolipidi formati, rispettivamente, da uno e due gruppi di ramnosio. Inoltre, i ramnolipidi sono eterogenei nella lunghezza e nel grado di ramificazione della frazione idrofobica, che è funzione dei terreni di crescita e delle condizioni ambientali applicate nei processi fermentativi per la loro produzione industriale. La ragione per cui *P. aeruginosa* produce i ramnolipidi è ancora oggetto di studio. È stato dimostrato tramite studi di inattivazione del gene *rhlA* che questa classe di glicolipidi è coinvolta in cinque funzioni principali: assorbimento di substrati idrofobici, proprietà antimicrobiche, virulenza, modalità di crescita del biofilm e motilità.

I ramnolipidi sono caratterizzati da un elevato potenziale applicativo industriale in quanto aumentano la solubilità, la capacità di espansione e le tensioni superficiali più basse e, inoltre, sono caratterizzati da alta biodegradabilità, bassa tossicità, produzione da substrati rinnovabili e attività antifungina. Per questi motivi, il loro utilizzo è in crescente aumento nell'industria cosmetica per prodotti come idratanti, shampoo, nell'industria dei detergenti, nel biorisanamento di siti inquinati da metalli pesanti e organici e persino nella realizzazione di dispositivi nanotecnologici. Risultano efficaci anche nella rimozione di idrocarburi policiclici aromatici (IPA), pentaclorofenolo e naftaline dal suolo con un'efficienza di rimozione del 60-80% e, nel complesso, questi glicolipidi trovano applicazioni migliorative rispetto ai tensioattivi tradizionali. I biosurfattanti hanno importanti proprietà chimico-fisiche potenzialmente preziose per il mantenimento della salute della pelle. Ad esempio, le loro estremità di acidi grassi sono efficaci per idratare la pelle ruvida e superfici cutanee secche. Inoltre, *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) (precedentemente noto come *Propionibacterium acnes*), impiegato per l'idrolisi dei trigliceridi nella catena degli acidi grassi dei biotensioattivi microbici, potrebbe aiutare a mantenere il pH acido della pelle, favorendo così l'adesione della flora cutanea residente e scoraggiando l'adesione e la crescita di microbi patogeni della pelle per mantenere un microbioma cutaneo sano. Inoltre, gli acidi grassi potrebbero agire come antiossidanti per prevenire la generazione di radicali liberi indotti dai raggi UV. A differenza dei tensioattivi chimici, i componenti dei biotensioattivi (zuccheri, lipidi e proteine)

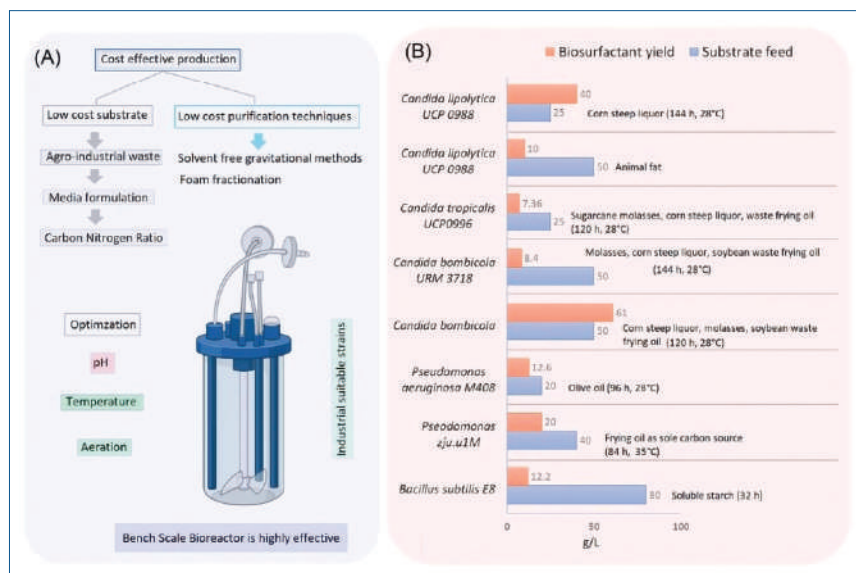


Fig. 2 - Produzione su larga scala dei biosurfattanti e ottimizzazione dei processi fermentativi (da [5])

sono simili a quelli presenti nella membrana delle cellule della pelle (fosfolipidi e proteine). Poiché il movimento dei composti attraverso la membrana delle cellule della pelle dipende dalla loro lipofilità e dall'attività superficiale, la struttura unica dei biosurfattanti offre loro un elevato tasso di permeabilità attraverso la membrana delle cellule della pelle per regolare le funzioni delle proteine e della barriera cutanea e innescare effetti benefici relativi ai meccanismi di riparazione dei capelli e di protezione della pelle. Inoltre, diversi studi *in vitro* hanno dimostrato che ramnolipidi, soforolipidi, MEL e surfattina sono compatibili con la pelle umana. In aggiunta, le proprietà emulsionanti, schiumogene, bagnanti e le funzioni solubilizzanti, che dipendono dalla loro struttura chimica, li rendono interessanti da utilizzare come ingredienti in prodotti cosmetici e per uso veterinario.

Il passaggio dall'utilizzo di prodotti petrolchimici all'utilizzo di fonti rinnovabili come materie prime di partenza per la sintesi dei tensioattivi è stato promosso dal concetto di "going green" spinto da preoccupazioni ambientali, nonché legislazioni governative che hanno proposto restrizioni sui detersivi tossici nei prodotti di consumo. Possono essere utilizzate diverse materie prime che vengono modificate chimicamente per produrre tensioattivi *green*. In particolare, trigliceridi, carboidrati e alcuni acidi organici sono stati estremamente utili come

materiali di partenza nella sintesi dei biosurfattanti. Esempi di tensioattivi prodotti attraverso la sintesi chimica sono saponine, solfati di alcoli grassi, acidi grassi, esteri di zucchero, alchilpoliglucosidi e alcanolammine. I biosurfattanti di seconda generazione si riferiscono a quelli che fanno uso degli organismi della comunità biotica (microbi, lieviti, piante ecc.) attraverso processi biologici, biocatalisi o fermentazione, per produrre i tensioattivi, da cui si estrae il prodotto desiderato e purificato. I biosurfattanti sono tensioattivi microbici come i glicolipidi, in particolare ramnolipidi e soforolipidi e lipopeptidi, specificamente la surfattina, prodotta in questo modo. Le fonti,

le proprietà e gli usi di alcuni ben noti a base oleo-chimica, insieme alle loro caratteristiche strutturali, possono servire sia per la classificazione sia per la determinazione delle loro proprietà fisico-chimiche. Come qualsiasi tensioattivo, contengono una porzione idrofoba (satura, insatura, idrossilata o ramificata) e una porzione idrofila (estere, carbossilato, gruppo ossidrilico, fosfato, peptide, amminoacido o carboidrato). Come in precedenza menzionato, tali prodotti sono considerati estremamente importanti nello scenario attuale, grazie alla loro solidità ecologica e bassa (o nulla) tossicità ed elevata biodegradabilità.

La struttura anfipila nei biosurfattanti è costituita da un acido grasso a catena lunga e da un composto idrofilo, che comprende un amminoacido, acido carbossilico e fosfati. La sintesi delle loro componenti con proprietà idrofobe e idrofile viene effettuata da due vie metaboliche primarie, vale a dire idrocarburi e carboidrati. I percorsi per la sintesi di questi due tipi di precursori è diversificata e basata su insiemi distinti di enzimi. I primi enzimi coinvolti nella sintesi di questi precursori sono spesso regolatori enzimatici. Per Syltatk e Wagner, esistono quattro possibilità per cui possono esistere contemporaneamente sintesi di legami idrofili (HPL) e porzioni idrofobiche (HB) dei biosurfattanti.

I biosurfattanti possono essere prodotti da varietà di microrganismi come batteri, funghi e lieviti. Le

loro caratteristiche composizione chimica e qualità dipendono dai microrganismi che li producono. Questi organismi hanno la capacità di utilizzare substrati potenzialmente nocivi poiché sono stati isolati da terreno, o da acque reflue. I possibili substrati possono essere ampiamente descritti, come rifiuti agroindustriali, industriali, rifiuti di origine vegetale e/o animale e altri rifiuti industriali. I rifiuti agroindustriali si riferiscono agli scarti di lavorazione degli oli vegetali, scarti di macinazione (OMWE) e materiali di scarto amidacei, come quelli della lavorazione di patate, scarti industriali di impianti caseari, come siero di latte ma anche melassa e melassa di soia. Poiché tale processo dipende da microrganismi, culture variabili in base a condizioni e parametri tra cui l'agitazione, il pH, la concentrazione degli elettroliti, temperatura, velocità di diluizione, aerazione e tipi di fonti di carbonio e azoto influenzano il tipo, la qualità e la quantità della produzione di biosurfattanti. Modificando queste condizioni, lo stesso microrganismo può produrre un biosurfattante diverso cambiando anche il substrato di cultura utilizzato. Gli enzimi possono essere isolati, immobilizzati e utilizzati per la produzione di biosurfattanti di base nonché impiegati per la raffinazione o il post-trattamento per produrre altri tipi di biosurfattanti con proprietà modificate. Usando gli enzimi, spesso è possibile trovare una via alternativa per la sintesi di tensioattivi invece di utilizzare la fermentazione. L'esempio più noto è l'utilizzo di lipasi per produrre esteri di zucchero. L'esterificazione senza solventi di un APG (alchilpoliglucoside semplice) avviene utilizzando acidi grassi e lipasi da *Candida antarctica* (CAL).

Saponine

Le saponine vengono classificate in base al numero di zuccheri in tre categorie: monodesmosidiche, bidesmosidiche e saponine tridesmosidiche. Le saponine monodesmosidiche hanno un'unità di zucchero attaccata al carbonio-3; le saponine bidesmosidiche hanno due unità di zucchero attaccate a C-3 e C-26 o C-28, mentre le saponine tridesmosidiche sono costituite da tre unità di zucchero. Le catene degli zuccheri possono essere ramificate o lineari e, tipicamente, contengono acido glucuronico (GlcA), D-fruttosio (Fuc), D-xilosio (Xyl), L-ramnosio (Rha), L-arabinosio (Ara), D-galattosio (Gal) e D-glucosio (Glc). Le saponine sono una classe

diversa di metaboliti secondari presenti in oltre un centinaio di famiglie di piante vascolari e alcune in fonti algali marine.

Le saponine triterpeniche derivano principalmente da quelle di piante dicotiledoni come le Fabaceae, le Araliaceae e le Caryophyllaceae famiglie. Le saponine steroidee si trovano principalmente nelle piante monocotiledoni come le Liliaceae, le Dioscoreaceae e famiglie di Agavaceae. Le saponine sono presenti in varie parti delle piante, compresi steli, radici, foglie, frutti, pericarpo, fiori e semi; la loro composizione e concentrazione variano significativamente tra le diverse piante e anche all'interno della stessa pianta nelle diverse parti. L'ambiente di crescita della pianta e il processo di estrazione influenzano anche la quantità e la composizione delle saponine estratte.

BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- [1] A.A. Simms, P.J. Naughton *et al.*, *Pharmaceutics*, 2020, **12**, 1099, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111099>
- [2] A. Karnwal, S. Shrivastava *et al.*, in *Personal and Skin Care Products: A Critical Review*, Hindawi BioMed Research International, vol. 2023, article ID 2375223, <https://doi.org/10.1155/2023/2375223>
- [3] V.S. Nagtode, C. Cardoza *et al.*, *ACS Omega*, 2023, **8**, 11674, <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c00591>
- [4] Y.P. Timilsena, A. Phosanam, R. Stockmann, *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, **24**, 13538. <https://doi.org/10.3390/ijms241713538>
- [5] R. Kumari, L.P. Singha, P. Shukla, *FEMS Microbes*, 2023, **4**, 1.

Biosurfactants

Surfactants are a group of amphiphilic molecules, having both hydrophobic and hydrophilic domains. They can be derived from petroleum-based sources or microbial/plant origins. Biosurfactants are surfactants of microbial or plant origins and offer much added advantages such as high biodegradability, lesser toxicity, ease of raw material availability, and easy applicability.