

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 di scarti da birrificazione per
produzione di enzimi ligninolitici e
polifenoli**



Relatore

prof.ssa Francesca Bosco

Candidato

Vincenzo De Biasi

Luglio 2024

Sommario

1.1	Processo di produzione della birra	5
1.1.1	Orzo, frumento e maltazione	5
1.1.2	Ammostamento	6
1.1.3	Filtrazione e Sparging	8
1.1.4	Bollitura	9
1.1.5	Raffreddamento e Fermentazione	9
1.2	Composizione chimica della BSG.....	10
1.3	Possibili applicazioni della BSG	11
1.3.1	Nutrizione umana.....	11
1.3.2	Produzione di energia termica e produzione di biogas	11
1.3.3	Produzione di mattoni	12
1.4	Polifenoli	12
1.4.1	Classificazione e composizione chimica	12
1.4.2	Estrazione e produzione di polifenoli	13
1.5	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	14
1.5.1	Descrizione e caratteristiche del fungo	14
1.5.2	Produzione di enzimi ligninolitici.....	15
1.5.3	Processi fermentativi per produzione di composti fenolici	16
2.1	Caratterizzazione BSG	18
2.1.1	Umidità percentuale	19
2.1.2	pH	20
2.1.3	Contenuto proteico	20
2.1.4	Attività enzima laccasi	21
2.1.5	Gradi Brix.....	22
2.1.6	Contenuto dei polifenoli totali.....	22
2.1.6.1	Pretrattamento a microonde.....	23
2.1.6.2	Pretrattamento con bagno ad ultrasuoni	24
2.1.6.3	Pretrattamento con sonda ad ultrasuoni	24
2.2	Inoculo del fungo sulla BSG	25
2.3	Allestimento microcosmi.....	25
2.4	Inoculo del fungo su BSG	27
2.5	Mantenimento dei microcosmi e valutazioni respirometriche	27
2.5.1	Valutazione della CO ₂ prodotta	28
2.5.2	Valutazione dell'O ₂ consumato.....	29
2.6	Valutazioni analitiche sul contenuto dei microcosmi	29
2.7	Analisi dei risultati	30
2.8	Polifenoli totali.....	30
3.1	Caratterizzazione della BSG	32
3.1.1	Umidità percentuale	32
3.1.2	Valutazione pH.....	32
3.1.3	Polifenoli totali.....	32
3.1.4	Concentrazione di proteine.....	32

3.1.5	Gradi Brix.....	32
3.2	Prove in microcosmo	32
3.2.1	Prima sperimentazione	32
3.2.2	Seconda sperimentazione	36
3.2.3	Terza sperimentazione	41
3.1.4	Quarta sperimentazione	48
3.1.5	Quinta sperimentazione	56
3.1.6	Sesta sperimentazione	61
3.2	Polifenoli totali	66
BIBLIOGRAFIA.....		72

1. INTRODUZIONE

In un mondo sviluppato e globalizzato come quello di oggi particolare attenzione viene data agli scarti e ai sottoprodotti di processi industriali. La tendenza generale è di andare a riutilizzare tali prodotti per dare loro una seconda vita e valorizzarli. Questo è il concetto alla base della cosiddetta economia circolare che da diversi anni è al centro di un mercato sempre più industrializzato. Particolare attenzione viene posta agli scarti derivanti i processi dell'industria alimentare: essi rappresentano ogni giorno un'enorme quantità, e il loro riutilizzo risulta fondamentale. La riduzione degli scarti e dei sottoprodotti dell'industria alimentare sarà una delle sfide principali nei prossimi anni, come definito dalle Nazioni Unite (UN), che bisogna raggiungere secondo gli obiettivi del 2030 Sustainable Development Goals (1). Inoltre, la "Waste Framework Directive" si è focalizzata sulla riduzione dei prodotti di scarto dell'industria agroalimentare essa ha come obiettivo una riduzione degli scarti del 55% entro il 2025, del 60% entro il 2030 e del 65% entro il 2035 (2).

Nell'ambito dell'industria agroalimentare, gli scarti più abbondanti che si producono sono quelli legati alla produzione di caffè, carne, prodotti a base di grano, orzo, canna da zucchero e molto altro ancora (3). Lo smaltimento di tali rifiuti può risultare impegnativo per le seguenti ragioni (3):

- **Stabilità biologica e crescita potenziale di microrganismi patogeni:** la maggior parte degli scarti di tipo alimentare contiene ancora un gran numero di microrganismi al suo interno e la sua struttura verrà alterata attraverso l'attività di tali microrganismi. Ciò può portare a condizioni igieniche inaccettabili attraverso la crescita di muffe, larve di insetto e parassiti sulla matrice di scarto. A valle di ciò in seguito all'idrolisi di proteine si possono anche sviluppare forti odori;
- **Contenuto di acqua:** gli scarti alimentari di tipo animale e vegetale contengono acqua al loro interno in una percentuale che va dal 70% al 95% in peso. Ovviamente una grande quantità di acqua nello scarto aumenta i suoi costi di trasporto e smaltimento, e la rimozione meccanica di quest'acqua porta a ulteriori problemi di smaltimento in seguito alla presenza di materiale organico al suo interno;
- **Ossidazione della biomassa:** biomasse contenenti grandi quantità di grasso possono andare incontro a processi di ossidazione che portano anche in questo caso al rilascio di odori sgradevoli.

Chiaramente, anche il processo di produzione della birra porta alla produzione di una grande quantità di scarti prime tra tutte le trebbie (*Brewers' spent grain BSG*). La birra è una delle bevande più popolari e consumate al mondo, e secondo i dati riportati da Barth-Hass Group nel 2018 la produzione della birra ha raggiunto i 190.4 milioni di m³ 30% dei quali sono prodotti in America. La BSG è lo scarto solido più abbondante dell'industria della birra, esso rappresenta l'85% di tutti i sottoprodotti generati durante il processo di birrificazione. Tale residuo viene prodotto durante il processo di saccarificazione del malto, si producono 20 kg di BSG per ogni 100L di birra.

1.1 Processo di produzione della birra

La birra è una bevanda alcolica che viene prodotta in seguito a processi fermentativi ad opera di lieviti quali *Saccaromyces cerevisiae* e *Saccaromyces pastorianus*. Gli ingredienti principali utilizzati per la produzione della birra sono: orzo e/o frumento, acqua, luppolo. Il tenore alcolico della bevanda è dovuto proprio ad una fermentazione alcolica ad opera dei lieviti. Il processo di produzione della birra può essere suddiviso in due processi principali: Maltazione e Ammostamento.

1.1.1 Orzo, frumento e maltazione

Come precedentemente detto, l'ingrediente principale per la produzione della birra è l'orzo. Esistono diverse varietà di birra che si contraddistinguono, tra l'altro, in base al tipo di cereale che si utilizza. Per esempio, oltre all'orzo si possono utilizzare altri cereali come, il frumento, il riso, l'avena e la segale (Brewing Science: a multidisciplinary Approach 2017).

I chicchi d'orzo sono costituiti da tre parti principali: un *embrione* da cui nasce la pianta, l'*endosperma* che fornisce energia alla pianta nel momento della crescita ed è costituito principalmente da amido, e un *pericarpo* che avvolge il seme proteggendolo dall'ambiente esterno. Immediatamente al di sotto del pericarpo è presente uno strato di cellule chiamato *aleurone* che nel momento dell'idratazione produce enzimi (amilasi) che idrolizzano l'amido per fornire energia durante la crescita della pianta (Fig. 1.1.).

Prima di poter essere utilizzato come substrato da parte dei lieviti l'orzo va incontro ad un processo chiamato maltazione.

Tale processo permette di liberare i carboidrati, di cui si servirà successivamente il lievito durante la fermentazione, contenuti come amido all'interno dell'endosperma del chicco. L'amido è un polisaccaride del glucosio ed essendo un carboidrato complesso non può essere utilizzato così com'è durante la fermentazione. Infatti, i lieviti utilizzano carboidrati semplici, primo fra i quali il glucosio, come substrato durante la fermentazione. Per questo motivo l'amido deve andare incontro ad un processo di idrolisi che porta alla formazione di carboidrati a catena corta (destrine, maltodestrine, maltosio e glucosio). La maltazione prevede quindi di raccogliere il cereale, metterlo in acqua di modo che esso possa germinare. Il processo di germinazione permette di trasformare l'amido in zuccheri più semplici, esso viene terminato mediante essiccamento e la radichetta che si è formata precedentemente viene eliminata mediante processi meccanici. A questo punto del processo, i chicchi di orzo sono maltati e convenzionalmente si parla di malto d'orzo. Il malto d'orzo, così prodotto, viene inserito in appositi sacchi dalla capacità variabile e conservato finché non viene spedito nello stabilimento per la produzione della birra.

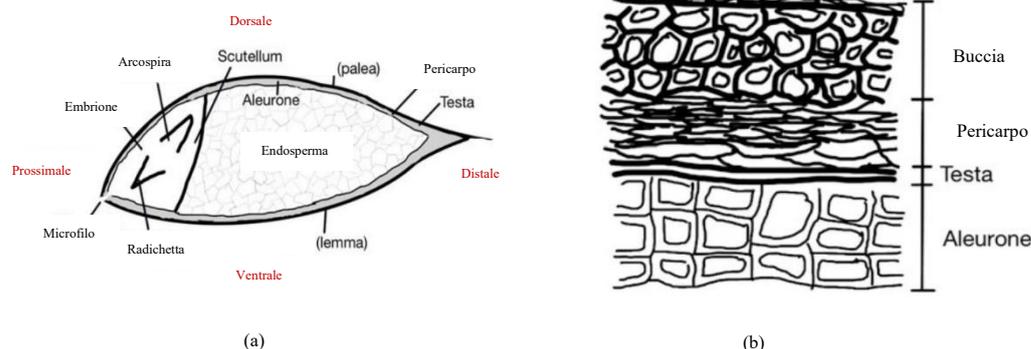


Figura 1.1: (a) Struttura del chicco di orzo; (b) Stratificazione esterna della buccia del chicco d'orzo (Brewing Science: a multidisciplinary Approach 2017)

1.1.2 Ammostamento

Il primo processo a cui va incontro il malto d'orzo è la molitura. Si utilizzano dei mulini a cilindro o a martello che macinano e frantumano i chicchi di orzo. Durante questa fase è importante mantenere la gluma del chicco la più integra possibile perché essa successivamente funge da mezzo filtrante del mosto durante il processo di “*Lautering*”. Una macinazione non adeguata può portare a tempi di filtrazione lunghi e una limpidezza del mosto non opportuna (Brewing Science: a multidisciplinary Approach 2017).

Il malto d'orzo viene poi aggiunto all'acqua con un rapporto orzo/acqua pari a tre e si innalza gradualmente la temperatura fino a valori di 60°C per 60 minuti. La miscela di acqua e orzo è chiamata mosto di birra. In questa fase la temperatura gioca un ruolo fondamentale perché è in grado di disattivare/attivare determinati enzimi presenti nella miscela.

Un altro parametro che governa l'eventuale attivazione degli enzimi è il pH del mosto. Diventa, quindi, fondamentale in questa fase del processo poter regolare nella maniera più precisa possibile il pH e la temperatura del mosto. Proprio grazie all'innalzamento della temperatura, infatti, l'amido va incontro ad un processo di gelatinizzazione grazie al quale verrà poi utilizzato da parte degli enzimi.

Gli enzimi più importanti in questa fase del processo sono:

- **Proteasi e Peptidasi:** tali enzimi agiscono sulle proteine e peptidi presenti in soluzione. Le proteasi catalizzano l'idrolisi dei legami peptidici tra gli amminoacidi delle proteine, mentre le peptidasi catalizzano la stessa reazione nei peptidi. Questi enzimi sono attivi per pH compresi tra 4.5 e 5.3 e a temperature tra 47°C e 54°C. Il risultato delle azioni di questi enzimi è il rilascio di dipeptidi e tripeptidi o di singoli amminoacidi nella soluzione.
- **α -amilasi:** questa classe di enzimi catalizza la reazione di idrolisi dei legami presenti nell'amido con produzione di destrine e maltodestrine. Gli enzimi appartenenti a questa classe rompono i legami presenti nell'amido in qualsiasi punto del polisaccaride. In questo modo si ottengono glucosio, maltosio, maltotriosio e carboidrati più complessi. Tali composti sono zuccheri complessi che non possono essere utilizzati dai lieviti nella fase fermentativa e destinati a rimanere in soluzione. Le α -amilasi sono attive

- per temperature comprese tra 63°C e 70°C e per pH nell'intorno di 5.7.
- **β -amilasi:** questi enzimi sono in grado di rompere i legami glicosidici che ci sono nell'amido in modo da produrre carboidrati più semplici come, ad esempio, il maltosio e fruttosio. A differenza delle α -amilasi non sono in grado di produrre a partire dall'amido molecole semplici di glucosio e maltotriosio (Fig. 1.2). Questi carboidrati sono poi facilmente utilizzabili dai lieviti durante la fase di fermentazione. Le β -amilasi sono attive per temperature comprese tra 55°C e 65°C e per pH nell'intorno di 5.5.

Considerati i diversi range di temperatura e pH di attività degli enzimi riportati, in genere si opera a valori di temperatura e pH intermedi di modo tale da poter massimizzare l'azione di tutti gli enzimi presenti. Per pH inferiori a 5.7 si favorisce l'attività delle β -amilasi. In seguito all'ammostamento si procede con il cosiddetto "*Mash-out*", che consiste in un graduale aumento della temperatura del mosto di modo tale che avvenga la denaturazione degli enzimi e delle proteine presenti nel mosto di birra. Il risultato di tale processo è una riduzione della viscosità del mosto, che permette la separazione successiva della parte liquida dalla parte solida.

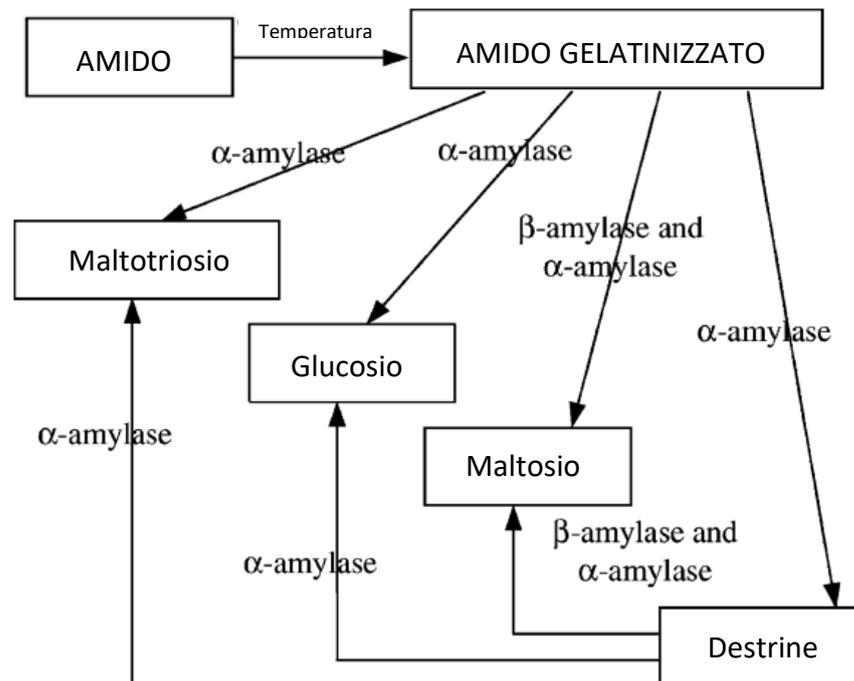


Figura 1.2: Azione delle alfa-amilasi e beta-amilasi nel processo di degradazione dell'amido (Brandam et al., 2003)

1.1.3 Filtrazione e Sparging

In una prima fase del processo, si filtra il mosto ottenuto mediante l'utilizzo dei grani stessi: le trebbie esauste vengono posizionate su una griglia e fungono da mezzo filtrante per il liquido. Dalla parte inferiore della griglia si raccoglie quindi il liquido filtrato e sulla parte superiore rimane la parte solida costituita dalle trebbie esauste. Prima di essere separate le trebbie, però, vanno incontro al processo di "*Sparging*": le trebbie vengono risciacquate con acqua calda che successivamente percola attraverso il letto filtrante e viene raccolta nella parte inferiore (Brewing Science: a multidisciplinary Approach 2017).

Questo processo ha il compito di portare in soluzione zuccheri che sono ancora intrappolati nelle trebbie. Più l'acqua è calda più gli zuccheri saranno solubili in acqua, ma allo stesso tempo una temperatura troppo alta dell'acqua porterebbe in soluzione i tannini variando il pH della soluzione (condizione da evitare).

In questa fase è importante regolare la quantità di acqua utilizzata perché un'eccessiva quantità può portare ad un mosto di birra troppo diluito. A valle di tale processo le trebbie esauste, che sono costituite principalmente dalle bucce dei grani sono definite spente e costituiscono la BSG.

1.1.4 Bollitura

Dopo il processo di filtrazione, il mosto di birra è mandato al tino di bollitura. In questa fase il mosto viene riscaldato fino alla sua completa bollitura. Le principali ragioni per cui viene condotta la bollitura sono (Brewing Science: a multidisciplinary Approach 2017):

- **Sterilizzazione del mosto:** è possibile che all'interno del mosto ci siano microrganismi indesiderati, in seguito a contaminazioni accadute durante i processi precedenti. Portare a ebollizione il mosto per circa 20 minuti assicura che il numero di microrganismi nel mosto si riduca praticamente a zero.
- **Incremento reazioni di Maillard:** l'aumento della temperatura del mosto di birra aumenta la velocità delle reazioni di Maillard. Tali reazioni producono composti organici che sono responsabili del gusto della bevanda. Inoltre, favoriscono un generale inacidimento del mosto.
- **Degassaggio del mosto:** il mosto può reagire con l'ossigeno presente nell'aria e quest'ultimo entrando in soluzione può reagire con gli zuccheri o qualsiasi altro composto presente. Aumentando la temperatura, l'ossigeno già presente nel mosto desorbe proprio perché la sua solubilità diminuisce.
- **Denaturazione delle proteine:** qualsiasi proteina in soluzione, in seguito all'aumento della temperatura, va incontro a denaturazione e idrolisi. Il risultato di tale processo è la presenza di una gran quantità di amminoacidi liberi utili successivamente alla fermentazione alcolica.
- **Riduzione in volume:** in seguito allo *Sparging* il mosto potrebbe non avere la densità adatta per la produzione della tipologia di birra desiderata. La bollitura riduce il volume della soluzione in seguito ad evaporazione dell'acqua presente. Tipicamente si ha una diminuzione del 10% di acqua per ogni ora di bollitura.
- **Conversione degli acidi contenuti nel luppolo:** durante la bollitura è inserito nel mosto il luppolo. La sua interazione con la soluzione ad alta temperatura porta al passaggio di acidi organici (umulone, lupulone) in soluzione. Tali sostanze sono responsabili del gusto amaro della birra e agiscono anche come conservanti naturali.

1.1.5 Raffreddamento e Fermentazione

A valle del processo di bollitura, il mosto deve essere raffreddato per il successivo processo di fermentazione con lieviti. Inoltre, in soluzione sono presenti ancora residui solidi che devono essere eliminati. Tali residui sono costituiti da coaguli di proteine, residui di trebbie rimaste in soluzione dopo la prima filtrazione o residui di luppolo. L'insieme di tali residui costituisce la cosiddetta "*torba*". Per poter eliminare la torba esistono diverse metodologie, la più semplice e diffusa è il "*Whirpooling*": mediante l'utilizzo di una pompa o di un agitatore si

mette in rotazione la soluzione e così facendo le particelle che costituiscono la torba per la forza centrifuga precipitano sul fondo. Dopo che la separazione della torba è stata effettuata il mosto deve essere raffreddato prima di andare incontro alla fermentazione. Il mosto deve essere portato da una temperatura di circa 100°C ad una temperatura di 18-22°C. Per fare ciò si possono utilizzare diversi tipi di scambiatori di calore (a serpentina, a piastre, a fascio tubiero ecc...). Il mosto così raffreddato può essere poi pompato all'interno del tino della fermentazione dove avviene il processo di fermentazione alcolica.

1.2 Composizione chimica della BSG

La BSG è un composto lignocellulosico costituito da: cellulosa (17-25%), polisaccaridi non cellulosici (25-35%), proteine (15-24%), lignina (8-28%), lipidi (10%) e ceneri (5%) (Del rio et al. 2013). La composizione chimica della BSG varia in base ai grani utilizzati, al processo di birrificazione a cui va incontro, ad eventuali additivi aggiunti durante il processo, ma in generale si può dire che la BSG è un materiale lignocellulosico ricco in fibre (70%) e proteine (20%). Altri composti presenti in minor quantità sono rappresentati da minerali (Calcio, Cobalto, Rame, Magnesio, Manganese, Ferro) e dalle vitamine (biotina, acido folico, niacina, ribloflavina, tiamina) (Musatto et al 2006).

La composizione, in macro- e micronutrienti varia in base a diversi fattori quali: tipo di grani utilizzati, processi di birrificazione differenti e annata di produzione. Il componente principale è più abbondante nella BSG è sicuramente l'emicellulosa (fino al 40% in peso secco). Essa rappresenta un gruppo eterogeneo di polisaccaridi (xilani, mannani, glucomammani, xiloglucani) che sono presenti nella parete cellulare delle cellule vegetali. Essa insieme alla cellulosa e alla lignina conferisce struttura e forza alla cellula.

1.3 Possibili applicazioni della BSG

Diverse sono le possibili applicazioni di riutilizzo della BSG. Di seguito ne vengono riportate alcune tra le più importanti e diffuse.

1.3.1 Nutrizione umana

Dato l'elevato contenuto in proteine e fibre, uno dei possibili utilizzi della BSG è in campo alimentare per la produzione di pasta secca. In tale senso, per poter utilizzare le caratteristiche nutrizionali proprie della BSG si è proposto di aggiungere la BSG alle farine usate per produrre la pasta. La BSG viene utilizzata in seguito ad un processo di macinazione di modo tale da ottenere un composto pulverulento. Si è visto che il contenuto delle proteine e delle fibre nella pasta è strettamente correlato alla dimensione delle particelle che costituiscono la farina di BSG: più le particelle sono piccole più il contenuto di fibre e proteine nell'alimento aumenta. Sono state preparate diverse miscele di farine, che si distinguono in base alla percentuale di semolina contenuta e di conseguenza anche di farina derivante da BSG, e successivamente utilizzate per preparare pasta secca (e.g. spaghetti).

Vengono fatte analisi chimiche (contenuto totale di amminoacidi) e analisi di tipo qualitativo (tempo di cottura ottimale, struttura, stabilità e rilascio di amido in cottura) per determinare il contenuto ottimale di BSG da aggiungere alla ricetta della pasta. In tal senso si è visto che l'aggiunta della farina di BSG, la quale è ricca in proteine e fibre, porta allo sviluppo di una nuova tipologia di pasta che dal punto di vista nutrizionale e "di qualità tecnologica" risulta migliore (Cuomo et al., 2022).

1.3.2 Produzione di energia termica e produzione di biogas

In seguito alle grandi quantità di BSG che vengono prodotte ogni anno e alla sua grande disponibilità, una delle possibili applicazioni della BSG è la produzione di biogas. Il metodo più semplice per riutilizzare la BSG in tal senso è la sua combustione per produzione di energia termica. In tal caso, l'energia ottenuta può essere riutilizzata dal birrificio stesso con conseguente diminuzione della richiesta energetica dell'azienda. La combustione diretta però porta all'insorgenza di due problemi differenti: la biomassa deve essere essiccata fino ad avere un contenuto di umidità minore del 55% ed in tale caso considerando i volumi in gioco si arriverebbe ad operare un processo di essiccamento costoso e gravoso dal punto di vista energetico.

Inoltre, la combustione porta alla formazione di composti NO_x e ceneri che sono difficili da gestire e abbattere e se dannosi se dispersi in ambiente (Musatto et al 2006). Per questo motivo, un'altra applicazione che negli ultimi anni si sta considerando per il riutilizzo della BSG è la produzione di biogas (Evelyn Wagner, 2022) mediante una fermentazione anaerobica. Uno dei microrganismi che è stato utilizzato è un ceppo modificato di *Escherichia coli* (Wagner et al 2022). La BSG viene sottoposta a pretrattamento con soluzioni acide diluite a temperature comprese tra 90°C e 130°C per poter idrolizzare la maggior parte di carboidrati costituenti l'emicellulosa e favorire la fermentazione successiva trasformando le strutture da cristalline ad amorfe.

Successivamente, la BSG pretrattata viene sottoposta a processi di saccarificazione, con lo scopo di andare ad aumentare la concentrazione di monosaccaridi utili alla fermentazione. Alla fine di questo pretrattamento saranno prodotti sia zuccheri pentosi che esosi. Per questo motivo, durante la fase fermentativa bisogna utilizzare microrganismi (*wild type* o geneticamente modificati) che sono in grado di utilizzare tali composti per la produzione di etanolo. Tra questi i ceppi più utilizzati sono *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis*. Tale processo risulta semplice, sviluppato in un singolo reattore e porta alla produzione di 251 litri di bio-etanolo ogni tonnellata di BSG.

1.3.3 Produzione di mattoni

Un'altra possibile applicazione della BSG è la produzione di mattoni (Russ et al 2005). In questo caso, la BSG viene addizionata ai materiali costituenti i mattoni. Si utilizza la matrice di scarto durante la cottura dei mattoni in modo tale da poter aumentare la porosità del mattone stesso. Questo porta ad avere un isolamento termico maggiore rispetto ai mattoni tradizionali in quanto la presenza di aria interna al mattone diminuisce lo scambio termico tra l'interno e l'esterno. Con l'utilizzo della BSG per la produzione di mattoni, inoltre, si ha una distribuzione più omogenea dei pori e una diminuzione della densità. Il conseguente minor peso del mattone determina una riduzione dei costi di trasporto del materiale. Infine, si è visto tramite prove meccaniche di resistenza, che i mattoni così formati hanno una resistenza meccanica uguale se non maggiore rispetto ai mattoni tradizionali.

1.4 Polifenoli

I polifenoli sono un gruppo di composti organici che vengono prodotti dalle piante come metaboliti secondari. I polifenoli hanno effetti benefici per le loro proprietà antimicrobiche, anti-ossidanti, neuroprotettive e cardio-protettive. Negli ultimi anni, in seguito ad una richiesta sempre maggiore di cibi funzionali con valori nutrizionali sempre maggiori, i polifenoli giocano un ruolo importante e un contributo fondamentale nella formulazione di tali alimenti.

1.4.1 Classificazione e composizione chimica

In base alla loro struttura chimica i polifenoli sono suddivisi in diverse classi:

- **Acidi fenolici:** sono i composti fenolici più abbondanti. Sono ulteriormente divisi in due classi (acidi idrossicinnamici e acidi idrossibenzoici) in base allo scheletro carbonioso e alla posizione del gruppo idrossido nell'anello aromatico. Alimenti come frutta e verdura contengono forme libere di tali composti, mentre alimenti come semi e cereali contengono forme legate che possono essere convertite in forme libere mediante reazioni di idrolisi;

- **Flavonoidi:** tali composti, che sono conosciuti anche come metaboliti secondari delle piante, contengono più di un gruppo idrossido legato all'anello aromatico. I flavonoidi sono composti bioattivi che hanno svariati effetti benefici per la salute (ad es. sono antinfiammatori, antidiabetici, anticancro, anti-tensione).
- **Stilbeni:** la loro struttura è costituita da due anelli fenolici connessi ad una porzione centrale di etilene. Tra gli stilbeni il più importante è sicuramente il resveratrolo che viene utilizzato in ambito bio-medicale. Esso ha un effetto antiossidante, anticancerogeno e antidiabetico. Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato che tale composto è in grado di limitare e rallentare malattie neurodegenerative quali l'Alzheimer.
- **Lignani:** i lignani sono composti di-fenolici presenti in grandi quantità nelle piante. Tali composti presentano diversi benefici per la salute come quello di diminuire il rischio di infarto, diminuire i sintomi della menopausa e prevenire l'insorgenza di cancro al seno.

1.4.2 Estrazione e produzione di polifenoli

Nella maggior parte dei casi, l'estrazione dei polifenoli avviene a partire dalle piante mediante processi che sono costosi e poco efficienti. Infatti, tali processi sono fortemente dipendenti dalle condizioni ambientali (stagionalità delle piante) ed inoltre il processo di down-stream di purificazione del prodotto è piuttosto complesso. Di contro, la produzione di composti polifenolici mediante fermentazione ad opera di microrganismi risulta più efficiente e sostenibile come processo. Ciò porta a diversi vantaggi, tra cui l'alta velocità di produzione, e gli alti valori di resa del prodotto. Inoltre, un altro vantaggio che porta la produzione di polifenoli mediante processi fermentativi è che i polifenoli legati presenti nella matrice vegetale proprio grazie alla presenza di enzimi idrolitici prodotti dai microrganismi vengono trasformati nella loro forma libera.

Gli enzimi responsabili della liberazione dei polifenoli che sono legati alla struttura della lignina e che in seguito vengono a trovarsi in soluzione sono amilasi, β -glucosidasi, cellulasi e xylanasi. La fermentazione può avvenire ad opera di microrganismi batterici (e.g. *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium animalis*), o di microrganismi fungini (e.g. *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Trametes versicolor*). In tal caso, la concentrazione totale di polifenoli aumenta. L'utilizzo di materiale di scarto come la BSG per la produzione di polifenoli mediante Solid-State Fermentation (SSF) ha mostrato, a differenza del caso senza il fungo, il contenuto di polifenoli totali è aumentato (zeko-pivac 2022). Il fungo infatti è in grado di interagire con le strutture lignocellulosiche della BSG andando a degradarle e a rilasciare i composti polifenolici. La bassa concentrazione di polifenoli nella BSG non inoculata è dovuta al fatto che essa è composta da grandi quantità di lignina (19.4-49.2g/100g di BSG) che è legata ai polisaccaridi, costituenti le pareti cellulari, con acidi fenolici. Risulta quindi fondamentale idrolizzare la rigida struttura della lignina per poter rilasciare gli acidi fenolici. Viene inoltre studiata la

possibilità di pretrattare la BSG per andare ad aumentare la concentrazione finale di polifenoli (Alonso-riano 2021). In questo caso, è stato applicato un pretrattamento della BSG con microonde e con bagno ad ultrasuoni. L'azione dei pretrattamenti sulla BSG è in grado di liberare i composti polifenolici che inizialmente erano legati alle pareti delle cellule vegetali della lignina. Più precisamente, si è visto che l'utilizzo della sonda ad ultrasuoni porta ad un aumento significativo della concentrazione finale di polifenoli, questo perché la sonda comporta delle cinetiche di estrazione più efficienti. Inoltre, si è valutata l'estrazione di polifenoli per BSG tal quale e BSG triturrata.

Si è visto che la triturazione della biomassa porta ad un aumento della concentrazione di polifenoli fino al 55% rispetto alla condizione non triturrata. Inoltre, si evidenzia come anche il tempo del pretrattamento gioca un ruolo fondamentale per l'estrazione.

Per tempi superiori di 15 minuti il 90% del totale dei polifenoli è già stato estratto, indice del fatto che condurre dei pretrattamenti troppo lunghi nel tempo risulta svantaggioso e dal punto di vista della concentrazione finale di polifenoli non porta ad un aumento significativo.

1.5 *Phanerochaete chrysosporium*

1.5.1 Descrizione e caratteristiche del fungo

In tale lavoro di tesi si utilizza un ceppo fungino di *Phanerochaete chrysosporium*. Esso, denominato anche fungo del maricume bianco è in grado di depolimerizzare i composti aromatici della lignina contenuta nella parete delle

cellule vegetali. I composti più abbondanti costitutivi la lignina sono composti fenolici. La lignina è il composto aromatico più abbondante in natura, e gioca un ruolo fondamentale nel ciclo del carbonio delle piante. Tale polimero a differenza della cellulosa e dell'emicellulosa non va incontro a processi idrolitici.

Infatti, per la sua degradazione è necessaria l'azione di funghi filamentosi che sono in grado di depolimerizzare tale composto.

P. chrysosporium è uno dei ceppi fungini più utilizzati a tale scopo poiché produce diversi enzimi quali perossidasi e ossidasi che sono in grado di degradare la lignina.

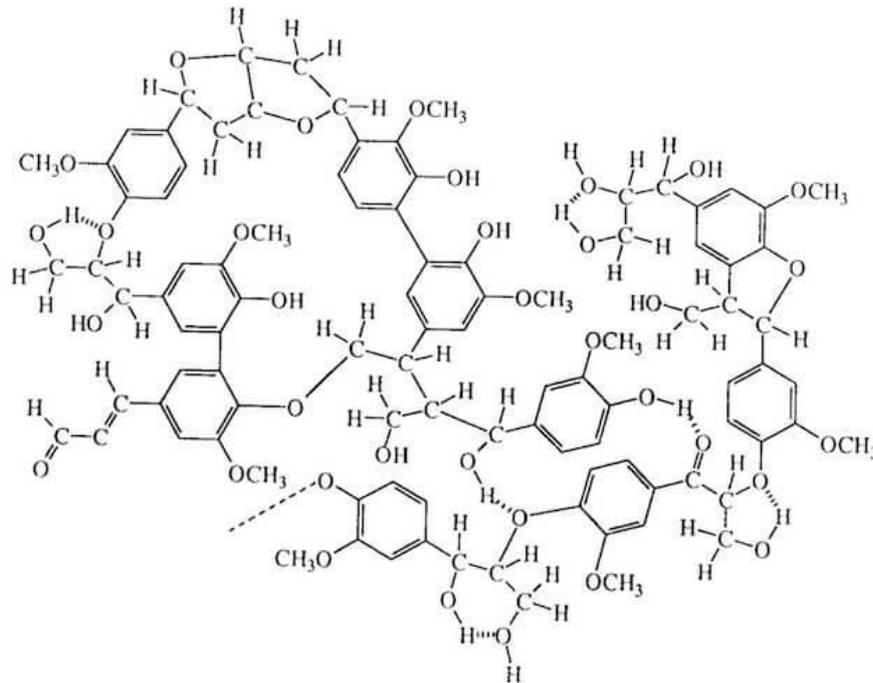


Figura 1.2: Struttura della lignina

Inoltre, tale fungo risulta molto versatile dal punto di vista biotecnologico, in quanto ha una temperatura di crescita intorno ai 40°C e una velocità di crescita molto alta. Inoltre, tale ceppo fungino può anche essere utilizzato per degradare composti chimici tossici (M. Asgher, 2006) (M. Asgher, 2006)).

1.5.2 Produzione di enzimi ligninolitici

Come detto nel paragrafo precedente, *P. chrysosporium* viene utilizzato principalmente per la produzione di diversi enzimi ligninolitici quali manganese perossidasi (MnP), laccasi, e lignina perossidasi (Hatakka 1994):

- **Manganese perossidasi:** la manganese perossidasi è un enzima che appartiene alla classe delle ossidoriduttasi che è in grado di degradare la lignina, oltre che ridurre la quantità di inquinanti nelle acque reflue (Bilal et al, 2023). MnP converte lo ione Mn^{2+} in Mn^{3+} che diffondendo attacca le strutture fenoliche sulla lignina liberandole (Martin hofrichter 2002).
- **Lignina perossidasi:** la lignina perossidasi è un enzima

appartenente alla classe delle ossidoreduttasi che catalizza una serie di reazioni in cui è presente il perossido di idrogeno come accettore di elettroni. Tale enzima è in grado di rompere il legame C_{alfa}-C_{beta} di composti fenolici legati alla struttura aromatica della lignina e portarli in soluzione (Happala 1993).

- **Laccasi:** le laccasi, così come la manganese perossidasi e la lignina perossidasi sono una classe di enzimi appartenenti alle ossidoriduttasi che utilizzano l'ossigeno per ossidare composti di tipo non fenolico in determinate condizioni (in presenza per esempio di ABTS). Tale enzima inoltre è in grado di rompere i legami tra gli anelli aromatici dei composti fenolici (Hatakka 1994).

Tali enzimi risultano, quindi, fondamentali nel processo di fermentazione allo stato solido ad opera di microrganismi fungini quali *P. chrysosporium* per poter degradare matrici di scarto quali per esempio la BSG e portare quindi ad una produzione di composti fenolici.

1.5.3 Processi fermentativi per produzione di composti fenolici

Per la produzione di composti fenolici si è visto che l'utilizzo di fermentazioni allo stato solido (SSF) porta ad un aumento della concentrazione di quest'ultimi. In tal senso si è visto che si possono utilizzare diverse specie fungine per la produzione di composti fenolici utilizzando come matrice di scarto la BSG (Tab 12.).

RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO	MATRICE UTILIZZATA	FUNGO UTILIZZATO	DURATA PROVA	CONDIZIONI DI COLTURA	TIPO DI INOCULO	CONCENTRAZIONE (MAX) POLIFENOLI
Tisma et al. (2017)	BSG	<i>Trametes versicolor</i>	15 giorni	Beuta con tappo di vetro (SSF)	Conidi	8,7 mg _{polifenoli} /g _{BSG secca} (15gg)
Zeko-Pivac et al. (2022)	BSG	<i>Trametes versicolor</i>	7 giorni	Beuta con tappo di vetro (SSF)	Conidi	15,20 mg _{polifenoli} /g _{BSG secca} (7gg)
Ibarurri et al. (2022)	BSG	<i>Rhizopus Sp.</i>	8 giorni	Beuta con tappo di vetro (SSF)	Conidi	2,05 mg _{polifenoli} /g _{BSG secca} (4gg)
Costa Maia et al. (2020)	BSG	<i>Aspergillus oryzae</i>	7 giorni	Beuta con tappo di vetro (SSF)	Conidi	8,45 mg _{polifenoli} /g _{BSG secca} (7gg)
Costa Maia et al. (2020)	BSG	<i>Aspergillus terreus</i>	7 giorni	Beuta con tappo di vetro (SSF)	Conidi	7,90 mg _{polifenoli} /g _{BSG secca} (4gg)

Tab.2.1: Confronto produzione composti polifenolici da diversi microrganismi

Come si può osservare dalla tabella 1.1 diversi sono gli studi che sono stati condotti in merito e che hanno portato a risultati differenti. In tutti i casi riportati si utilizzano sistemi costituiti da beute chiuse con tappo di vetro in cui avviene l'inoculo del microrganismo fungino mediante conidi. In questo caso i valori di concentrazione massima di polifenoli che sono stati ottenuti non sono così dissimili l'uno dall'altro. Ciò sta ad indicare che i processi fermentativi che vengono condotti sono confrontabili e i processi di degradazione della matrice di scarto ad opera del microrganismo fungino sono simili.

Le uniche differenze che si riscontrano possono essere dovute al fatto che nelle varie prove analizzate si utilizzano diversi microrganismi.

A valle di ciò si comprende come l'utilizzo di un ceppo fungino su una matrice di scarto quale la BSG può portare ad un aumento di concentrazione totale di polifenoli.

2. MATERIALI E METODI

Nel seguente lavoro di tesi è stata valutata la crescita del fungo filamentoso *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 su una matrice lignocellulosica di scarto, la Brewer's spent grain (BSG, denominata trebbie in italiano), per la produzione di prodotti ad alto valore aggiunto. Preventivamente, sulla BSG è stata condotta una caratterizzazione chimico-fisica. La crescita di *P. chrysosporium*, inoculato sulla BSG, è avvenuta all'interno di beute di due differenti capacità, 500 mL e 1000mL. La crescita del ceppo fungino è stata monitorata mediante analisi respirometriche. È stato allestito infatti un sistema per la cattura della CO₂, sviluppatasi durante la fermentazione, oppure, tramite l'utilizzo di tappi dotati di un sensore, è stato valutato l'O₂ consumato. Tali microcosmi sono stati sacrificati a tempi prestabiliti, è stata recuperata la matrice su cui è cresciuta la biomassa, per poterne determinare: l'umidità percentuale, i gradi Brix, il pH, il contenuto di proteine totali, l'attività dell'enzima laccasi e la concentrazione di polifenoli totali. I risultati derivanti da tali sperimentazioni vengono illustrati e commentati nel Capitolo 3.

2.1 Caratterizzazione BSG

Le prove sperimentali sono state condotte utilizzando due lotti di BSG denominati *Forna 1* e *Forna 2*. Tali lotti sono stati conservati a -20°C fino al momento del loro utilizzo. La differenza principale che si riscontra tra i due lotti *Forna 1* e *Forna 2* è la loro composizione, in particolare nella tipologia di malti che vengono utilizzati.

Di seguito è riportata tale composizione:

Forna 1	Forna 2
<ul style="list-style-type: none"> • 70% malto Chateau Pilsner • 30% malto Chateau wheat Blanc 	<ul style="list-style-type: none"> • 50% malto Pilsner; • 15% malto Pale Ale; • 15% Fiocchi d'avena; • 20% malto Cara Ruby;

Tab.2.1: Composizione della BSG *Forna 1* e *Forna 2*.

La matrice, come descritto nei seguenti paragrafi, è stata caratterizzata in termini di: umidità, pH, contenuto proteico totale, gradi Brix e contenuto di polifenoli.

2.1.1 Umidità percentuale

La BSG umida, suddivisa in campioni di circa 20 g ciascuno, viene essiccata in stufa (*Isco 9000*) alla temperatura di 80°C per un tempo minimo di 24 ore e fino a raggiungimento del peso costante. Il peso è stato valutato mediante l'utilizzo di una bilancia di precisione (*Scaltec SBC 31*). Ciò ha permesso di calcolare il contenuto di umidità percentuale (%) su ogni singolo campione tramite la seguente formula:

$$Umidità (\%) = \frac{massa\ umida\ (g) - massa\ secca\ (g)}{massa\ umida\ (g)} \times 100$$

Per ogni misurazione di umidità % i campioni sono stati triplicati per valutare il valor medio e la relativa deviazione standard.

2.1.2 pH

La valutazione del pH è stata effettuata su campioni di BSG umida dal peso di 20g. I campioni sono stati suddivisi in tre gruppi in base al tipo di valutazione che è stata effettuata. Il primo gruppo è trattato con acqua distillata, il secondo con una soluzione di KCl 1M, ed il terzo con una soluzione di CaCl₂ 0,01M. Al campione posto in becher viene aggiunto un volume di acqua distillata o soluzione in rapporto 2:5 (peso:volume, w:v) e le sospensioni così ottenute sono messe in agitazione a 150 rpm per due ore su un agitatore magnetico (*IKA C-Mag HS*). Al termine, la sospensione viene lasciata sedimentare. Il pH del surnatante è misurato tramite l'utilizzo di un pH-metro (inoLab® pH 730) dotato di un elettrodo SenTix® 81.

Si determina preventivamente il pH dei solventi puri, prima della miscelazione con la BSG.

2.1.3 Contenuto proteico

Per valutare la concentrazione di proteine totali contenute nella BSG, 20g della matrice vengono miscelati per 60 min con un volume di acqua distillata pari a 50mL. Al termine la miscela viene posta in provette Falcon da 50 mL e si opera una separazione per centrifugazione a 4000rpm per 12 min a temperatura ambiente. Terminata la centrifugazione, il surnatante viene recuperato e utilizzato per determinare le proteine totali e i °Brix come sarà descritto nel successivo capitolo.

La valutazione delle proteine totali avviene tramite determinazione spettrofotometrica UV/Vis (*LAMBDA 465 UV/Vis PerkinElmer*). Viene effettuata una misura diretta dell'assorbanza dei campioni alla lunghezza d'onda pari a 280nm. La valutazione del bianco viene effettuata utilizzando acqua distillata. Per effettuare tali misure si utilizzano cuvette apposite per la lettura spettrofotometrica nel campo degli UV.

Al fine di correlare i valori di assorbanza con la concentrazione proteica è necessario costruire una retta di taratura. Per fare ciò, come riferimento, si utilizzano soluzioni, a concentrazione nota (0.15, 0.25, 0.5, 1 g/L), delle proteine del siero del latte (Milei 90). Questo permette di individuare la retta di taratura, come mostrato nella figura 2.1. Ogni lettura di assorbanza dei campioni e della retta di taratura è ripetuta tre volte.

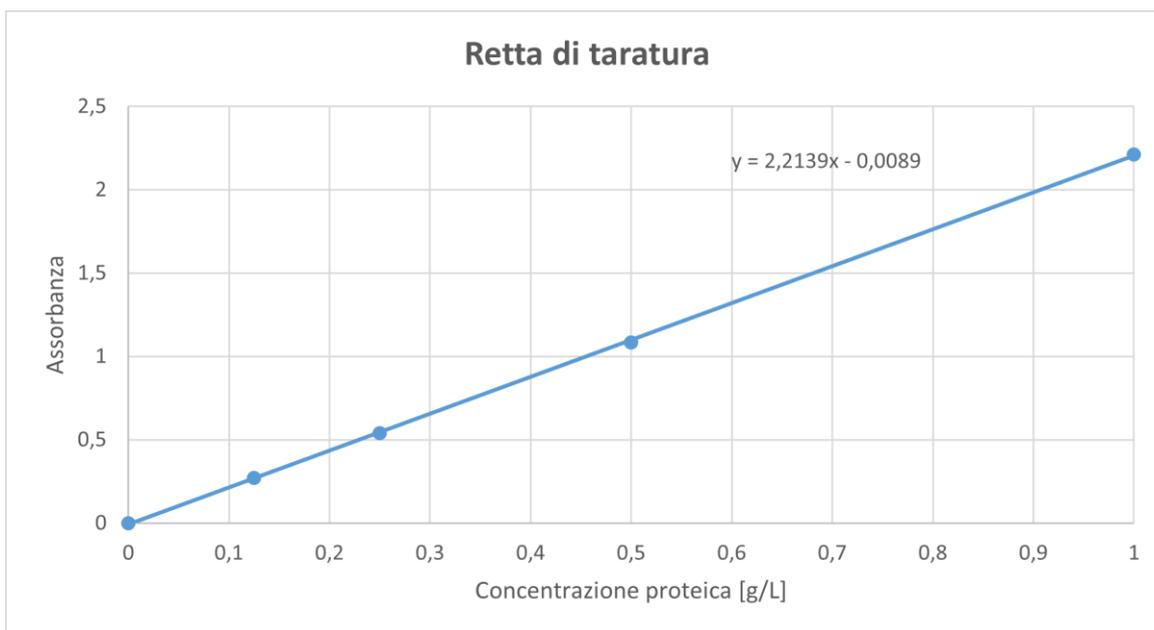


Figura 2.1: Retta di taratura costruita su soluzione di proteine di siero di latte a concentrazione nota.

2.1.4 Attività enzima laccasi

L'attività enzimatica della laccasi è valutata per mezzo di una misura spettrofotometrica ad una lunghezza d'onda pari a 468nm sull'estratto ottenuto in buffer sodio fosfato 50 mM pH=6.5 (rapporto BSG:buffer w:v 1:10, durata dell'estrazione 60 minuti, centrifugazione a 8000 rpm per 23 min). Il 2,6-dimetossifenolo (2,6-DMP, $\epsilon = 23,100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 10mM, è utilizzato come substrato per tale valutazione enzimatica.

La valutazione è condotta alla temperatura di 22°C. La miscela di reazione, preparata in cuvette dalla capacità di 3000 μL (Vol_{tot}), è la seguente:

- Tampone sodio tartrato 200 mM, pH 5: 1500 μL
- 2,6-DMP 10 mM: 300 μL
- MnSO_4 10 mM: 30 μL
- Campione: 1000 μL (Vol_{cam})
- Acqua distillata: 120 μL
- Perossido di idrogeno 10mM;

Al termine della determinazione della durata di 15 min, dopo l'aggiunta del perossido di idrogeno, si calcola l'attività dell'enzima Laccasi [UI/L] secondo la seguente formula:

$$\text{Attività Laccasi [UI/L]} = \frac{\Delta Abs \times Vol_{tot} \times 60 \times 10^6}{\varepsilon \times \Delta t \times Vol_{camp.}}$$

Dove:

- ΔAbs = la differenza di assorbanza della soluzione nell'intervallo Δt ;
- Vol_{tot} = volume totale della soluzione (3000 μL);
- ε = coefficiente di estinzione molare pari a 23100 [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$];
- Δt = intervallo di tempo [s];
- $Vol_{camp.}$ = volume del campione (1000 μL).

2.1.5 Gradi Brix

Per valutare gli zuccheri solubili della BSG viene fatta una misura dei gradi Brix ($^{\circ}\text{Bx}$). I gradi Brix, $^{\circ}\text{Bx}$, permettono di misurare il rapporto in peso di una data quantità di zuccheri disciolti in un volume noto di acqua. La misurazione è stata effettuata automaticamente con il rifrattometro. Tale strumento investe la soluzione da analizzare con un fascio di luce che, attraversando la soluzione, viene in parte deviato secondo un certo angolo, da cui è calcolata la concentrazione di zuccheri solubili.

Si preleva un'aliquota di surnatante, prodotto come descritto nel precedente capitolo, si inserisce all'interno dell'alloggiamento del rifrattometro e si rileva il valore riportato dallo strumento. Ogni misurazione è ripetuta tre volte per calcolarne la media aritmetica con la relativa deviazione standard.

2.1.6 Contenuto dei polifenoli totali

L'estrazione e la valutazione dei polifenoli totali è stata effettuata sulla BSG tal quale, intera o triturrata, oppure sulla BSG derivante dalla fermentazione con *P. chrysosporium*. Inoltre, come verrà descritto con maggior dettaglio in seguito, tale valutazione è stata anche effettuata sulla BSG, intera o triturrata, preventivamente sottoposta a pretrattamento con microonde o con ultrasuoni (nel bagno o con una sonda).

I polifenoli vengono estratti dalla BSG, preventivamente essiccata a 80°C , con una miscela acqua e etanolo al 50%, in rapporto (v:v) 1:40. La miscela da estrarre si pone in un bagno termostatico a 80°C , in continua agitazione, per un tempo totale di due ore.

Passato tale tempo la miscela così ottenuta viene filtrata mediante l'utilizzo di una carta da filtro Whatman N°1 e il filtrato recuperato è sottoposto all'analisi spettrofotometrica UV/Vis.

La valutazione della concentrazione dei polifenoli totali viene eseguita sul filtrato ottenuto come descritto da Vijayalaxmi et al. Tale metodologia si basa su una reazione colorimetrica seguita dalla valutazione allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 760 nm. La soluzione di reazione presenta la seguente composizione: 100 µL del campione da esaminare, 500 µL del reagente di Folin-Ciocalteu, diluito (1:10), 400 µL di carbonato di sodio (Na₂CO₃) 7.5%. La soluzione viene mantenuta al buio per 30 min a temperatura ambiente e successivamente viene eseguita la valutazione spettrofotometrica. Il bianco viene misurato trattando 100 µL di acqua distillata con gli stessi reagenti utilizzati per trattare i campioni.

Al fine di determinare la concentrazione di polifenoli (0.05, 0.15, 0.27 g/L) totali viene costruita una retta di taratura con soluzioni a concentrazione nota di acido gallico, (Fig. 2.2).

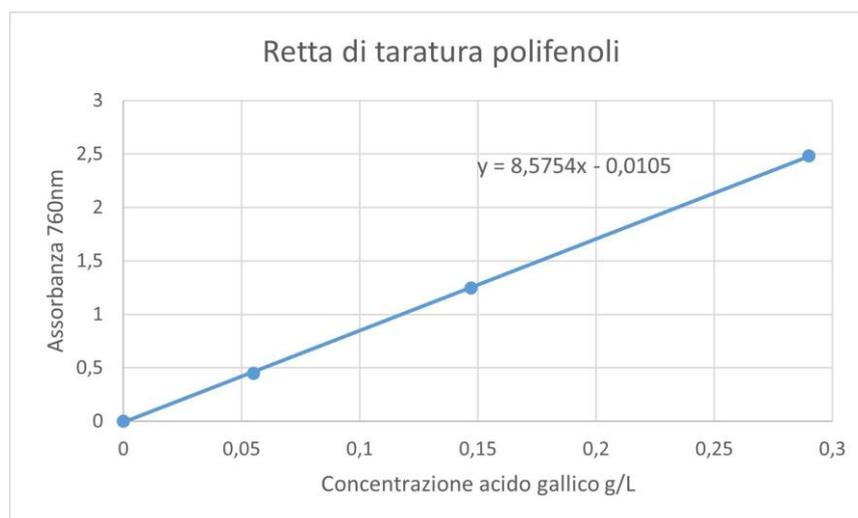


Figura 2.2: Retta di taratura costruita su soluzione acido gallico a concentrazione nota

2.1.6.1 Pretrattamento a microonde

Il pretrattamento con le microonde prevede di utilizzare la BSG essiccata in stufa a 80°C miscelata con la sola porzione di acqua, anziché con l'intera soluzione acqua:etanolo al 50%. Si miscela la BSG essiccata (1 g) con il solo volume di acqua (20 mL), pari a quello normalmente utilizzato nella preparazione della soluzione di estrazione, e si pesa la miscela direttamente all'interno del matraccio in vetro che verrà utilizzato per l'estrazione. Il pretrattamento è stato

effettuato per un tempo fisso pari a 60 secondi, mentre è stata variata la potenza, 400W e 800W. Durante il trattamento la miscela si scalda sino a 100 °C e parte dell'acqua addizionata evapora. Dopo il pretrattamento con le microonde, si pesa il matraccio contenente la miscela, si aggiunge il quantitativo di acqua evaporata e, successivamente, il volume di etanolo necessario. Si procede poi all'estrazione dei polifenoli totali come precedentemente descritto.

2.1.6.2 Pretrattamento con bagno ad ultrasuoni

Un pretrattamento viene effettuato nel bagno ad ultrasuoni. La miscela da estrarre viene preparata utilizzando la BSG secca e la sola acqua come descritto per il pretrattamento con le microonde. La miscela è posta in provette Falcon da 50 mL che sono immerse nel bagno ad ultrasuoni (da mettere). In questo caso viene mantenuta fissa la frequenza del trattamento pari a 37 kHz, mentre viene variato il tempo di trattamento, pari a 20 minuti e 40 minuti. Al termine del trattamento si aggiunge eventuale acqua evaporata e l'etanolo come descritto per il precedente pretrattamento. A valle di ciò, si procede con l'estrazione dei polifenoli totali.

2.1.6.3 Pretrattamento con sonda ad ultrasuoni

Un ultimo pretrattamento effettuato prima dell'estrazione dei polifenoli totali è realizzato con una sonda ad ultrasuoni della potenza di 580W. La miscela di BSG ed acqua che è preparata è quella già descritta precedentemente. Una volta preparata, la miscela viene inserita in un beaker e sottoposta a pretrattamento. La sonda ad ultrasuoni viene immersa direttamente nella miscela da estrarre. Per evitare che la sonda surriscaldi la miscela, il beaker è mantenuto in un bagno con del ghiaccio. Viene variato il tempo del pretrattamento: verranno scelti tre tempi di 10 minuti, 15 minuti e 30 minuti. La sonda utilizzata ha una, in cui la pulsazione è regolata su due tempi diversi: 5s on/ 5s off e 5s on/ 15s off. A seguito del pretrattamento con la sonda si procede con l'estrazione come già descritto.

2.2 Inoculo del fungo sulla BSG

Il fungo filamentoso *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725, utilizzato nelle prove sperimentali descritte, è stato mantenuto su terreno Malt Extract Agar (MEA) in capsule di Petri (diametro di 9 cm) alla temperatura di 4°C.

Il terreno di coltura presenta la seguente composizione: Glucosio 20 g/L; Estratto di Malto 20 g/L; Peptone 2 g/L. Ad esso è aggiunto agar con una concentrazione di 20 g/L. In ogni piastra viene inoculato, con un'ansa sterile, il fungo mediante tondino di micelio (Ø 5mm) asportato dal bordo di una colonia precedentemente cresciuta e mantenuta sullo stesso terreno. Tutte queste operazioni vengono eseguite in sterilità sotto cappa biohazard. Per permettere lo sviluppo del fungo, le capsule così inoculate sono poste in termostato ad una temperatura di 39°C.

L'inoculo di *P. chrysosporium* sulla BSG, contenuta all'interno dei microcosmi, è fatto secondo due procedimenti diversi:

- **Inoculo con tondino di micelio:** Si prelevano cinque tondini realizzati sul bordo di una colonia di *P. chrysosporium* cresciuta su MEA per 72 ore a 39°C mediante l'utilizzo di un fora tappi da laboratorio. Una volta prelevati, i tondini vengono posti in una provetta e spezzettati mediante un'ansa sterile. I frammenti così ottenuti vengono poi posizionati nel microcosmo a contatto con la BSG.
- **Inoculo con sospensione standardizzata:** il micelio fungino viene portato in sospensione, tramite un'ansa sterile, dopo aver dispensato dell'acqua distillata sulla superficie del micelio. La standardizzazione della sospensione microbica avviene diluendola fino a una densità ottica (misurata tramite spettrofotometria) compresa tra 0.8 e 1. L'inoculo su BSG avviene spargendo 3 mL di sospensione di *P. chrysosporium* standardizzata sulla biomassa in maniera uniforme mediante l'utilizzo di una micropipetta da 1000 µL.

2.3 Allestimento microcosmi

Si allestiscono due differenti tipologie di microcosmi a seconda del contenitore utilizzato:

- Beuta da 500 mL: si utilizza una beuta Erlenmeyer di vetro dalla capacità di 500mL. Tale sistema presenta ha un diametro esterno della

base pari a 10,5 cm e altezza pari a 17,5 cm.

- Beuta da 1000 mL: si utilizza una beuta di vetro dalla capacità di 1000 mL. Tale sistema presenta un diametro esterno di base pari a 13 cm e altezza pari a 22,5cm.



Figura 2.1: Microcosmi allestiti in beute da 500 mL e beute da 1000 mL

All'interno delle beute da 500mL viene inserita una quantità di BSG pari a 40g. Inoltre, è successivamente immessa una provetta sterile contenente acqua (4 mL). La chiusura di tali contenitori viene effettuata in due modi differenti:

- **Chiusura con tappo di cotone:** In questo caso, all'interno di ciascun microcosmo si inserisce una provetta con acqua distillata (4 mL) per garantire l'umidità del sistema. La chiusura avviene con tappo di cotone.
- **Chiusura con tappo di vetro.** In questo caso, all'interno di ciascun microcosmo, oltre alla provetta contenente acqua, si inserisce anche una provetta con una soluzione di NaOH 3M (8mL) per la cattura della CO₂ sviluppatasi.

All'interno delle bottiglie da 1000mL si inserisce una quantità di BSG pari a 60g, una provetta con un volume di acqua sterile pari a 12 mL e una seconda provetta con un volume di soluzione di NaOH (3M) pari a 11 mL. In questo caso si utilizza un solo tipo di chiusura:

- **Chiusura con tappo dotato di sensore** in grado di misurare il valore di depressione all'interno delle bottiglie. A partire da tale valore è possibile valutare l'O₂ consumato.

Entrambi i microcosmi, allestiti nella beuta da 500mL e nella beuta da 1000mL, sono stati preparati inserendo la BSG e sono stati sterilizzati in autoclave a 120°C e alla pressione di 2 atm per 20 minuti. Al termine della sterilizzazione, operando sotto cappa biohazard, è stato inoculato *P. chrysosporium* e sono state inserite le provette contenenti l'acqua e la soda. Nel caso dei microcosmi utilizzati come controllo non è stato realizzato l'inoculo fungino, mentre sono state ugualmente inserite le due provette.

2.4 Inoculo del fungo su BSG

L'inoculo fungino sulla BSG contenuta all'interno dei microcosmi è fatto secondo due procedimenti diversi:

- **Inoculo con tondino di micelio:** Si prelevano cinque tondini dal bordo di una colonia di *P. chrysosporium* cresciuta su MEA per 72 ore a 39°C mediante l'utilizzo di un foro tappi da laboratorio. Una volta prelevati i tondini vengono posti in provetta sterile e spezzettati mediante un'ansa sterile. Il composto così ottenuto viene poi posizionato nel microcosmo a contatto con la BSG.
- **Inoculo con sospensione standardizzata:** il micelio fungino viene portato in sospensione tramite un'ansa sterile, dopo aver dispensato dell'acqua distillata sulla superficie del micelio. La standardizzazione avviene diluendo la sospensione del fungo fino a raggiungere una densità ottica (misurata tramite spettrofotometria) compresa tra 0.8 e 1. L'inoculo su BSG avviene spargendo 3 mL sospensione di *P. Chrysosporium* standardizzata sulla biomassa in maniera uniforme mediante l'utilizzo di una micropipetta da 1000 μ L.

2.5 Mantenimento dei microcosmi e valutazioni respirometriche

Periodicamente, nel corso dell'incubazione, i microcosmi vengono aperti ed aerati. L'operazione viene effettuata secondo due modalità. Nelle prove preliminari i microcosmi sono stati mantenuti aperti, sotto cappa biohazard, per 5 minuti nel caso dei microcosmi allestiti nelle beute da 500mL o per 10 minuti nel caso dei sistemi da 1000mL. Successivamente, invece, si è utilizzato un sistema di aerazione dotato di filtro da 0.22 μ m per la sterilizzazione dell'aria in ingresso e una beuta contenente acqua sterile per umidificare l'aria inserita. L'aria (pressione=0.5 bar) viene quindi sterilizzata tramite filtrazione ed umidificata nella beuta contenente l'acqua.

Dopo essere stata umidificata, fluisce nel microcosmo da aerare.

L'aerazione viene condotta per un tempo di 5 min a temperatura ambiente ed è realizzata solo per i microcosmi realizzati nelle beute da 500 mL. Tale procedura viene condotta in ambiente sterile per evitare eventuali contaminazioni inattese.

2.5.1 Valutazione della CO₂ prodotta

Per determinare la CO₂ sviluppata, correlata alla crescita del fungo, una soluzione di soda 3M è inserita all'interno di ogni microcosmo. Ciò ha l'obiettivo di catturare la CO₂ e determinarne la quantità prodotta tramite una titolazione. L'acqua che viene utilizzata per preparare la soluzione deve andare incontro a decarbonatazione, in modo tale che la CO₂ in essa disciolta possa liberarsi. Per far ciò la si porta ad ebollizione. per 2h e successivamente l'acqua priva di CO₂ viene fatta raffreddare a temperatura ambiente. Si procede quindi a dispensare il volume prestabilito (8mL per le beute da 500mL e 11mL per le beute da 1000mL) all'interno delle provette nei microcosmi. Nel caso delle beute da 500 mL la provetta contenente la soda è sospesa al collo del contenitore tramite un filo.

Per le beute da 1000mL la provetta con la soda è posta nell'apposito alloggiamento posizionato nella parte inferiore del tappo sensore. Periodicamente, come successivamente indicato, si determina la quantità di CO₂ che si sviluppa in ogni microcosmo per mezzo di una titolazione. La soluzione di NaOH viene prelevata dalla provetta e viene titolata con una soluzione di HCl (1,5M) mediante l'utilizzo di una buretta. La titolazione viene condotta come segue: in un becher da 50mL viene inserita la soluzione di soda, una soluzione sovrassatura di cloruro di bario (BaCl₂, 400g/L) (agente precipitante) e una soluzione di fenolftaleina (indicatore). Si fa poi gocciolare la soluzione di HCl all'interno del becher e si misura il volume necessario affinché il colore della soluzione da titolare viri dal rosa al bianco. La quantità di CO₂ è calcolata mediante la seguente formula:

$$CO_2(mg) = (V_0 - V) \times f^*$$

dove:

V₀ = Volume di HCl usato per titolare i bianchi (mL);

V = volume di HCl usato per titolare i campioni (mL);

f* = fattore di conversione (f* = 22 M della soluzione di HCl usata per titolare). Nel caso in esame f* = 33.

2.5.2 Valutazione dell'O₂ consumato

La valutazione dell'ossigeno consumato nelle beute da 1000mL è stata effettuata tramite un apposito tappo sensore, denominato RESPIROMETRIC Sensor VELP che registra la depressione all'interno dei sistemi chiusi. I dati raccolti dal sensore vengono memorizzati dal DataBox VELP e, tramite l'apposito software, RESPIROSoft VELP, trasmessi in modalità wireless al PC. Il software raccoglie i valori di pressione in un range tra 500 e 1100 mbar (hPa), in base alla frequenza di trasmissione dei dati impostata prima di iniziare l'analisi. La variazione di pressione misurata viene quindi utilizzata per valutare, attraverso la seguente equazione, l'ossigeno consumato:

$$RO_2 = 3200 \cdot V_{fg} \cdot \Delta P / (t \cdot R \cdot T_{msd})$$

dove :

- RO₂ è la velocità specifica di consumo dell'O₂ sulla base della massa secca all'interno del microcosmo (mg O₂ g⁻¹ h⁻¹)
- 32000 è la massa molare dell'O₂ (mg/mol);
- V_{fg} è il volume di gas libero, in litri;
- R è la costante dei gas (83,14 hPa l·mol⁻¹ ·K⁻¹);
- T è la temperatura di misura, in kelvin;
- msd è la massa del suolo secco, in grammi;
- ΔP è la riduzione di pressione misurata, in ettopascal;
- t è il tempo trascorso, in ore.

2.6 Valutazioni analitiche sul contenuto dei microcosmi

I microcosmi sono sacrificati in 6 set di sperimentazioni diverse a tempi prestabiliti per determinare l'umidità della BSG su cui è

avvenuta la crescita fungina, il contenuto proteico, i gradi Brix, il pH, l'attività enzimatica e i polifenoli totali.

Il sacrificio dei microcosmi prevede di prelevare interamente la BSG contenuta nel sistema. La valutazione dell'umidità percentuale, del pH, della concentrazione di proteine e dei gradi Brix viene eseguita come già illustrato per la caratterizzazione della BSG tal quale nei capitoli 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3 e 2.1.4 rispettivamente.

2.7 Analisi dei risultati

I dati riportati nel capitolo dei risultati sono un valor medio di 3 misure. La significatività statistica tra due gruppi di dati è stata calcolata con il Student t-test ($p < 0.05$). Nel caso di differenze tra più di due gruppi di dati è stata invece utilizzata l'analisi della varianza (ANOVA) assieme al test di Bonferroni. Le differenze considerate significative hanno un valore di $p < 0.05$.

2.8 Polifenoli totali

Per la determinazione dei polifenoli totali le sperimentazioni vengono raggruppate in base al tipo di areazione e al tipo di BSG utilizzata. Si riscontrano quindi tre tipologie di sperimentazioni: un primo gruppo in cui l'areazione avviene mediante apertura della beuta sotto cappa sterile e si utilizzano microcosmi con BSG *Forna 1* tal quale; un secondo gruppo in cui l'areazione avviene sotto cappa sterile in seguito all'utilizzo del sistema di areazione apposito e si utilizzano microcosmi con BSG *Forna 1* tal quale; e un ultimo gruppo in cui l'areazione avviene sotto cappa sterile in seguito all'utilizzo del sistema di areazione apposito e si utilizzano microcosmi con BSG *Forna 2* tal quale e tritata.

Il raggruppamento appena descritto viene esposto nella tabella seguente:

Da tale Tabella si comprende che le prove sono state raggruppate in tre gruppi principali: un primo gruppo in cui si considera l'areazione del microcosmo mediante apertura sotto cappa sterile per diversi tempi (in tal caso i sistemi utilizzati sono costituiti da beute da 500 mL e beute da 1000 mL); un secondo gruppo in cui si utilizzano beute da 500 mL e l'areazione avviene per insufflaggio di aria sterile sotto cappa; e un terzo ed ultimo gruppo in cui si utilizzano beute da 500 mL in cui l'areazione avviene per insufflaggio di aria sterile e la BSG utilizzata è la *Forna 2*. I risultati relativi a tali sperimentazioni verranno illustrati nel Capitolo 3.

	BSG	CAPACITÀ BEUTA	CHIUSURA BEUTA	AERAZIONE	DURATA TOT. (gg)	CO ₂	O ₂
1	FORNA 1 T.Q.	500 mL	TAPPO DI VETRO	BEUTA APERTA 15 min	9	ND	ND
2	FORNA 1 T.Q.	1000 mL	TAPPO SENSORE	BEUTA APERTA 30 min	13	X	X
3	FORNA 1 T.Q.	500 mL	TAPPO DI VETRO	ARIA STERILE 5 min	12	X	ND
4	FORNA 1 T.Q.	500 mL	TAPPO DI VETRO	ARIA STERILE 5 min	13	X	ND
5	FORNA 1 T.Q.	500 mL	TAPPO DI VETRO	ARIA STERILE 5 min	14	X	ND
6	FORNA 2 TQ	500 mL	TAPPO DI VETRO	ARIA STERILE 5 min	10	X	ND
7	FORNA 2 TRIT.	500 mL	TAPPO DI VETRO	ARIA STERILE 5 min	10	X	ND

Tabella 2.1: Raggruppamento prove sperimentali valutazione polifenoli.

3. ANALISI DEI RISULTATI

In questo capitolo, si riportano e si analizzano i risultati che sono stati ottenuti durante il lavoro di tesi. Si esaminano dapprima i risultati di caratterizzazione dei due lotti di BSG utilizzati, *Forna 1* e *Forna 2*, e successivamente i risultati ottenuti in sei differenti sperimentazioni in microcosmo, a seguito della fermentazione della BSG con il fungo ligninolitico *P. chrysosporium*.

3.1 Caratterizzazione della BSG

3.2 Prove in microcosmo

Sono state condotte sei prove in microcosmo utilizzando come matrice di scarto la BSG su cui viene inoculato il ceppo fungino *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725. L'obiettivo è quello di andare a determinare quale sia la configurazione del sistema che porta a dei valori di concentrazione massima di proteine totali e di polifenoli totali. I Microcosmi sono costituiti da beute di diverso volume all'interno delle quali è inserita la BSG umida su cui verrà poi inoculato il ceppo fungino. Le beute sono incubate in termostato a 39°C operando uno shift di temperatura a 30°C per tempi successivi dall'inizio della prova (che variano in base alla sperimentazione). I microcosmi sono poi sacrificati a tempi prestabiliti per determinare parametri caratteristici quali:

- Umidità percentuale;
- Gradi Brix;
- pH;
- Concentrazione totale di proteine e attività dell'enzima laccasi;
- Concentrazione totale di polifenoli.

3.2.1 Prima sperimentazione

Per la prima sperimentazione, si utilizzano beute Erlenmeyer da 500 mL all'interno delle quali è inserita una quantità di BSG *Forna 1* umida (umidità 70%) pari a 40 g. In questo caso, si vuole valutare quale sia la tipologia di inoculo migliore per la crescita del fungo, sono stati effettuati due inoculi differenti: tondino di micelio e sospensione di conidi. I microcosmi sono incubati in termostato a 39°C e dopo 7 giorni si opera uno shift di temperatura a 30°C. Il tempo totale di sperimentazione è di 14 giorni e i microcosmi sono sacrificati a 7, 10, e 14 giorni dall'inizio della prova, per ogni sacrificio è stato previsto un microcosmo di controllo non inoculato al fine di valutare

correttamente l'influenza della fermentazione sulla BSG.

Il primo parametro che si vuole commentare è l'umidità percentuale (Tab 3.7). In tal caso, si evidenzia che l'umidità risulta maggiore nei microcosmi inoculati rispetto alla condizione di controllo per ogni tempo di sacrificio. Considerando, per esempio, il quattordicesimo giorno di sperimentazione, si vede che l'umidità relativa nei microcosmi inoculati con sospensione di conidi e tondino di micelio assume valori di 71.87% e 70.88% rispettivamente, mentre nel caso del controllo assume un valore di 52.33%.

TEMPO (gg)	UMIDITÀ (%)		
	CONTROLLO	INOCULO CON MICELIO	INOCULO IN CONIDI
7	70,71	73,20	73,88
10	59,00	72,13	74,61
14	52,33	70,88	71,87

Tabella 3.7: Valori di umidità percentuale prima sperimentazione.

Tale comportamento si può spiegare col fatto che la crescita del fungo e il suo metabolismo aerobico portano ad un aumento dell'acqua presente nel microcosmo e, conseguentemente, ad un aumento dell'umidità. Inoltre, tra i due tipi di inoculo esaminati, i valori di umidità non risultano così differenti è ciò è probabilmente dovuto al fatto che la crescita del micelio nei due casi risulta uniforme e confrontabile, come è possibile osservare in Fig. 3.1.



(a)



(b)

Figura 3.1: (a) Crescita in beuta inoculo con micelio 14esimo giorno di sperimentazione; (b) Crescita in beuta inoculo in conidi 14esimo giorno di sperimentazione.

Successivamente, si valutano i gradi Brix (Tab. 3.8). Considerando i microcosmi inoculati si vede che i valori risultano massimi per tempi di 7 giorni (0.80% per l'inoculo con micelio e 0.70% per l'inoculo in conidi) e diminuiscono ulteriormente a 14 giorni registrando valori di 0.50% per l'inoculo con micelio e 0.43% per l'inoculo in conidi.

Tale comportamento è dovuto al fatto che nelle prime fasi di crescita (fino a tempi pari a sette giorni), in seguito al metabolismo del ceppo fungino, i processi di degradazione della BSG, quali per esempio l'idrolisi di zuccheri complessi, portano ad una liberazione di carboidrati e conseguentemente ad una maggiore concentrazione di zuccheri semplici liberi in soluzione. Al contrario, nel microcosmo di controllo i valori (%) di Gradi Brix non variano sensibilmente (valore medio dello 0.5%), questo poiché il fungo è assente e, conseguentemente, non si ha la presenza di enzimi che degradano la BSG.

TEMPO (gg)	GRADI BRIX (%)		
	CONTROLLO	INOCULO CON MICELIO	INOCULO IN CONIDI
7	0.50	0.80	0.70
10	0.55	0.52	0.50
14	0.50	0.50	0.43

Tabella 3.8: Gradi Brix prima sperimentazione.

Un ulteriore parametro che viene valutato è il pH (Tab. 3.9). In tal caso si osserva che, nel caso dei microcosmi inoculati, il pH non cambia sensibilmente (da un valore di 5.4 registrato a 7 giorni ad un valore di 6.0 registrato a 14 giorni per i microcosmi inoculati con tondino di micelio, e da un valore di 5.7 registrato a 7 giorni ad un valore di 6.2 registrato a 14 giorni per i microcosmi inoculati con conidi), e ciò è indice del fatto che la presenza del fungo e il suo metabolismo non influenzano notevolmente il pH. Lo stesso comportamento lo si ha nel caso del microcosmo di controllo in cui si registra un valore iniziale di pH a 7 giorni di 5.7 e un valore di pH a 14 giorni di 5.8. Fatte tali considerazioni si comprende che il pH sia nel caso dei microcosmi inoculati sia nel caso dei microcosmi di controllo durante tutta la prova non cambia e non viene influenzato dalla presenza del fungo sulla BSG durante la fermentazione.

Gli ultimi parametri che si commentano sono la concentrazione totale di proteine e l'attività enzimatica della laccasi (Tab 3.10). La concentrazione di proteine assume un valore massimo di 0.128 $\frac{\text{g}_{\text{proteine}}}{\text{g}_{\text{BSGsecca}}}$ al quattordicesimo giorno di sperimentazione, nel caso di

inoculo in conidi a cui corrisponde un valore massimo di attività della laccasi pari a 0.60 UI/L. La stessa cosa si riscontra nel caso di inoculo con micelio: al quattordicesimo giorno si ha una concentrazione di proteine pari a 0.120 g_{proteine}/g_{B_{SG}secca} e un'attività della laccasi pari a 0.81 UI/L. La concentrazione di proteine totali è influenzata dalla produzione di laccasi,

TEMPO (gg)	pH		
	CONTROLLO	INOCULO CON MICELIO	INOCULO IN CONIDI
7	5,7	5,4	5,7
10	5,8	5,7	5,8
14	5,8	6,0	6,2

Tabella 3.9: pH prima sperimentazione.

TEMPO (gg)	CONCENTRAZIONE PROTEINE (g _{proteine} /g _{B_{SG} secca})			ATTIVITÀ ENZIMATICA LACCASI (UI/L)	
	CONTROLLO	INOCULO CON MICELIO	INOCULO IN CONIDI	INOCULO CON MICELIO	INOCULO IN CONIDI
7	0.009	0.087	0.077	0	0
10	0.007	0.088	0.105	0.29	0.52
14	0.008	0.120	0.128	0.81	0.60

Tabella 3.10: Concentrazione di proteine e attività enzimatica laccasi prima sperimentazione.

Inoltre, per quanto concerne la concentrazione di proteine si evidenzia come essa per ogni tempo di sperimentazione è sempre maggiore nel caso dei microcosmi inoculati rispetto ai microcosmi di controllo.

Ad esempio, si ottiene un valore di concentrazione di proteine al quattordicesimo giorno di $0.008 \text{ g}_{\text{proteine}}/\text{g}_{\text{BSGsecca}}$ nel caso del controllo, mentre si ottengono valori di $0.120 \text{ g}_{\text{proteine}}/\text{g}_{\text{BSGsecca}}$ e $0.128 \text{ g}_{\text{proteine}}/\text{g}_{\text{BSGsecca}}$ nel caso di inoculo con micelio e inoculo in conidi, rispettivamente (t-Student test $p=0.69$). Tale risultato è dovuto al fatto che la presenza del fungo e la produzione di enzimi ligninolitici nei microcosmi inoculati determina un maggior rilascio di proteine dalla BSG rispetto al controllo non inoculato.

I risultati ottenuti (proteine totali e attività laccasica) con i due differenti tipi di inoculo sono confrontabili; considerata la più semplice standardizzazione dell'inoculo con conidi, si è deciso di procedere con questa tipologia di inoculo nelle sperimentazioni successive in microcosmo.

3.2.2 Seconda sperimentazione

La seconda sperimentazione prevede di utilizzare come sistema una beuta Erlenmeyer da 500 mL all'interno della quale viene inserita una quantità di BSG umida (umidità pari al 70%) pari a 40g. L'inoculo del microorganismo fungino è fatto in conidi per un volume pari a 3 mL per ogni microcosmo. In tale sperimentazione si vuole verificare se un sistema di umidità, costituito da una provetta sterile all'interno della quale è inserito un volume di acqua distillata pari a 4mL, possa favorire la crescita del fungo durante la fermentazione. Inoltre, si allestiscono microcosmi di controllo, in cui viene inserito lo stesso sistema per garantire l'umidità. I microcosmi sono incubati in termostato a 39°C e si opera uno shift di temperatura a 30°C dall'inizio della prova. Il tempo totale di sperimentazione è di 9 giorni e i microcosmi sono sacrificati a 6 e 9 giorni dall'inizio della sperimentazione.

I valori di umidità vengono misurati e sono riportati in tabella 3.11.

TEMPO (gg)	UMIDITÀ (%)		
	CONTROLLO CON SISTEMA PER L'UMIDITÀ	BEUTA CON SISTEMA PER L'UMIDITÀ	BEUTA SENZA SISTEMA PER L'UMIDITÀ
6	59.30	79.60	71.92
9	56.21	75.41	68.57

Tabella 3.11: Umidità percentuale seconda sperimentazione.

Si evidenzia come nel sistema in cui è presente la provetta con acqua, per ogni tempo di sacrificio, i valori di umidità percentuali sono sempre maggiori rispetto al caso in cui non è presente la provetta con acqua. Infatti, considerando il sacrificio al nono giorno di sperimentazione si osserva che nel caso

della beuta con il sistema per l'umidità si registra un valore di umidità percentuale pari al 75.41%, mentre nel caso della beuta senza sistema per l'umidità tale valore è del 68.57%.

Tale differenza è proprio dovuta alla presenza di acqua nel microcosmo che porta ad una crescita del fungo che è più marcata ed omogenea come è possibile osservare in Fig. 3.2b. Un'altra differenza che si vuole commentare è il valore di umidità percentuale al nono giorno di sperimentazione per il microcosmo di controllo. Infatti, tale valore (56.21%) risulta minore rispetto ai valori di umidità percentuale dei microcosmi inoculati (75.41% nel caso in cui è presente il sistema per l'umidità e 68.57% nel caso in cui il sistema per l'umidità è assente), e ciò è dovuto alla presenza del fungo: infatti in seguito alla fermentazione e al metabolismo del microrganismo fungino si ha una maggiore produzione di acqua e un conseguente aumento di umidità percentuale rispetto alla condizione di controllo in cui il fungo non viene inoculato.



(a)



(b)

Figura 3.2: Crescita in beuta nono giorno di sperimentazione (a) senza sistema per l'umidità; (b) con sistema per l'umidità.

I valori dei gradi Brix, riportati in Tab. 3.12, evidenziano che nel caso in cui si considerano i microcosmi inoculati si ottengono valori maggiori per tempi di sacrificio a 6 giorni rispetto a 9 giorni: nel microcosmo con il sistema per l'umidità si ottengono valori di gradi Brix di 0.63% e 0.45% a 6 e 9 giorni rispettivamente, mentre nel microcosmo senza il sistema l'umidità si ottengono valori di gradi Brix pari a 0.60% e 0.44% per i sacrifici a 6 e 9 giorni rispettivamente. Pertanto, i valori sono confrontabili. Tale comportamento può essere dovuto al fatto che nelle prime fasi di crescita il fungo iniziando a degradare la BSG libera una maggior quantità di carboidrati in soluzione rispetto alle fasi finali in cui il ceppo fungino utilizza tali carboidrati nel durante il suo metabolismo, diminuendone conseguentemente la concentrazione.

TEMPO (gg)	GRADI BRUX (%)		
	CONTROLLO CON SISTEMA PER L'UMIDITÀ	BEUTA CON SISTEMA PER L'UMIDITÀ	BEUTA SENZA SISTEMA PER L'UMIDITÀ
6	0.53	0.63	0.60
9	0.30	0.45	0.44

Tabella 3.12: Gradi Brix seconda sperimentazione.

Inoltre, una differenza sostanziale si evidenzia anche nei risultati ottenuti per il controllo e per i microcosmi inoculati al sesto giorno: per quanto riguarda la condizione di controllo si ottiene un valore di gradi Brix pari allo 0.53%, mentre per i microcosmi inoculati in cui è presente il sistema per l'umidità tale valore è dello 0.63%, e per i microcosmi sprovvisti di sistema per l'umidità il valore dei gradi Brix è dello 0.60%. Tale differenza risiede nella capacità del fungo, nei microcosmi inoculati, di degradare la BSG e quindi aumentare la concentrazione di carboidrati in soluzione, a differenza della condizione di controllo in cui il microrganismo fungino è assente.

Successivamente si riportano i valori ottenuti del pH (Tab. 3.13).

TEMPO (gg)	pH		
	CONTROLLO CON SISTEMA PER L'UMIDITÀ	BEUTA CON SISTEMA PER L'UMIDITÀ	BEUTA SENZA SISTEMA PER L'UMIDITÀ
6	5.5	4.5	4.4
9	5.0	5.1	4.7

Tabella 3.13: pH seconda sperimentazione.

I valori di pH, nel caso del sacrificio a 9 giorni non risultano così differenti: si ottiene un valore di 5.0 nel caso del microcosmo di controllo, un valore di 5.1 nel caso del microcosmo inoculato in cui è presente il sistema per l'umidità e un valore di 4.7 nel caso del microcosmo in cui è assente il sistema per l'umidità. Ciò sta ad indicare che il pH non risulta così influenzato dalla presenza o meno del microorganismo fungino e che non è troppo dipendente dalla fermentazione ad opera del microorganismo fungino (valore di 4.4 al sesto giorno di sperimentazione per il microcosmo in cui è assente il sistema per l'umidità, e valore di 4.7 al nono giorno di sperimentazione per lo stesso tipo di microcosmo).

I valori di concentrazione di proteine e dell'attività dell'enzima laccasi vengono riportati in Tab 3.14.

In tal caso considerando il microcosmo provvisto del sistema per l'umidità, si ottengono valori di concentrazione di proteine pari a 0.008 $\text{g}_{\text{proteine}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$ al sesto giorno di sperimentazione e di 0.155 $\text{g}_{\text{proteine}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$ al nono giorno di sperimentazione. Tale differenza è dovuta alla presenza del fungo, all'aumentare del tempo di fermentazione aumentano i processi degradativi della BSG e conseguentemente la concentrazione di proteine in soluzione. Analogamente, ciò accade per il microcosmo in cui è assente il sistema per l'umidità in cui si ricavano valori di concentrazione di proteine totali pari a 0.006 e 0.130 $\text{g}_{\text{proteine}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$ al sesto e nono giorno di sperimentazione rispettivamente. L'attività enzimatica della laccasi presenta valori massimi, al nono giorno di sperimentazione: 1.08 UI/L per il microcosmo con il sistema per l'umidità e di 0.92 UI/L per il microcosmo senza il sistema per l'umidità. Con l'avanzare del tempo di fermentazione aumenta la concentrazione di laccasi sintetizzata.

Per quanto concerne la condizione di controllo, la concentrazione di proteine totali assume valori di 0.007 $\text{g}_{\text{proteine}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$ al sesto giorno e di 0.006 $\text{g}_{\text{proteine}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$ al nono giorno di sperimentazione. Questa trascurabile differenza tra i due valori è dovuta al fatto che in assenza del fungo e in assenza di processi che interessano la BSG la concentrazione di proteine durante la sperimentazione rimane pressoché costante. Per tali microcosmi non viene valutata l'attività enzimatica dal momento che in assenza del fungo non si ha produzione di enzimi.

TEMPO (gg)	CONCENTRAZIONE PROTEINE ($\text{g}_{\text{proteine}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$)			ATTIVITÀ ENZIMATICA LACCASI (UI/L)	
	CONTROLLO CON SISTEMA PER L'UMIDITÀ	BEUTA CON SISTEMA PER L'UMIDITÀ	BEUTA SENZA SISTEMA PER L'UMIDITÀ	BEUTA CON SISTEMA PER L'UMIDITÀ	BEUTA SENZA SISTEMA PER L'UMIDITÀ
6	0.007	0.008	0.006	0.56	0.51
9	0.006	0.155	0.130	1.08	0.92

Tabella 3.14: Concentrazione di proteine e attività enzimatica laccasi seconda sperimentazione.

L'ultimo parametro che viene valutato è la concentrazione totale di polifenoli (Tab. 3.15). In questo specifico caso, i valori sono stati determinati solo al nono giorno di sperimentazione per i due sistemi di microcosmi e per il microcosmo di controllo.

TEMPO (gg)	POLIFENOLI TOTALI ($\text{mg}_{\text{polifenoli}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$)		
	CONTROLLO CON SISTEMA PER L'UMIDITÀ	BEUTA CON SISTEMA PER L'UMIDITÀ	BEUTA SENZA SISTEMA PER L'UMIDITÀ
9	2.2	2.7	2.6

Tabella 3.15: Concentrazione di polifenoli totali seconda sperimentazione.

Si registrano valori di concentrazione totale di polifenoli pari a $2.7 \text{ mg}_{\text{polifenoli}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$ nel caso di microcosmo con il sistema per l'umidità, $2.6 \text{ mg}_{\text{polifenoli}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$ nel caso del microcosmo senza il sistema per l'umidità e $2.2 \text{ mg}_{\text{polifenoli}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$ nel caso del microcosmo di controllo. La differenza tra i valori dei microcosmi inoculati e quello di controllo risiede nel fatto che la presenza del fungo porta ad una maggiore liberazione di polifenoli legati alla BSG. Infatti, il fungo degradando la componente lignocellulosica porta in soluzione parte dei composti fenolici legati alla matrice.

In seguito al valore di concentrazione di proteine più elevato (0.155 g_{proteine}/g_{BMSG secca}, la significatività statistica rispetto al valore ottenuto, a parità di tempo, nel microcosmo senza controllo dell'umidità, 0.130 g_{proteine}/g_{BMSG secca}, t-Student test, p=0.00012), al valore di attività (1.08 UI/L) e all'evidente maggiore crescita della biomassa (Fig. 3.2) ottenuti nei microcosmi con il sistema per l'umidità, questa configurazione è stata utilizzata nelle sperimentazioni successive.

3.2.3 Terza sperimentazione

La terza sperimentazione utilizza beute Erlenmeyer da 500 mL all'interno delle quali viene inserita una quantità di BSG umida (umidità percentuale pari al 70%) pari a 40 g. Le beute sono dotate di una provetta con acqua sterile (4 mL) per garantire l'umidità del sistema, e una provetta con una soluzione di NaOH (3M) per determinare la CO₂ prodotta dal metabolismo fungino. I microcosmi sono chiusi con tappo di vetro e vengono posti in termostato a 39°C. Dopo 2 giorni si opera uno shift di temperatura a 30°C. La durata della prova è di 12 giorni e i sacrifici sono fatti a 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 12 giorni dall'inizio della stessa. Inoltre, in tale sperimentazione i microcosmi vengono areati con aria sterile, ogni 24 ore, per un tempo totale di 5 minuti.

L'umidità dei microcosmi per ogni tempo di sacrificio è stata valutata e i valori sono riportati in Tab 3.16.

TEMPO (gg)	UMIDITÀ (%)
4	76
5	76,84
6	77,22
7	76,59
8	76,82
9	76,32
10	76,48
12	76,58

Tabella 3.16: Umidità terza sperimentazione.

L'umidità presenta un massimo del 77.22% al sesto giorno di sperimentazione, e un minimo del 76% al quarto giorno di sperimentazione.

Ciò sta ad indicare che durante tutta la prova il valore di umidità si mantiene pressoché costante e non risulta particolarmente influenzato dalla fermentazione del microrganismo fungino, la presenza del provetta con acqua distillata ha contribuito a mantenere costante il valore di umidità per la durata della sperimentazione.

Di seguito si riportano i valori relativi ai gradi Brix (Tab. 3.17). In questo caso si ottiene un valore di 0.43% al quinto giorno di sperimentazione, che risulta il valore più alto registrato, e un valore di 0.18% al sesto di sperimentazione che risulta il valore più basso ottenuto.

TEMPO (gg)	GRADI BRUX (%)
4	0,25
5	0,43
6	0,18
7	0,28
8	0,30
9	0,20
10	0,25
12	0,20

Tabella 3.17: Gradi Brix terza sperimentazione.

Ciò sta ad indicare che i gradi Brix non sono vengono particolarmente alterati durante la prova, in quanto è una misura del contenuto totale di carboidrati disciolti in soluzione e non di uno specifico composto zuccherino che viene prodotto durante la fermentazione.

Anche il valore di pH è stato valutato in corrispondenza del sacrificio dei microcosmi (Tab. 3.18).

TEMPO (gg)	pH
4	4,91
5	5,05
6	5,20
7	5,18
8	5,77
9	5,94
10	7,07
12	6,83

Tabella 3.18: pH terza sperimentazione.

Si osserva che i valori ottenuti sono tutti valori al di sotto di sette (valore di pH neutro) ad eccezione del valore registrato al decimo giorno di sperimentazione pari a 7.07. Tali valori acidi di pH, compresi tra un valore minimo di 4.91 ed un valore massimo di 6.83, stanno ad indicare che la biomassa che cresce sulla BSG durante la fermentazione è sempre caratterizzata da acidità. Questo tipo di comportamento può essere spiegato col fatto che in seguito a processi di degradazione della BSG e in seguito a processi di sintesi di prodotti derivanti dal metabolismo ad opera del fungo durante la fermentazione si può avere un insieme di reazioni che porta ad basificare leggermente il sistema. Inoltre, considerando un valore di pH per la BSG non inoculata, determinato durante la caratterizzazione, pari a 5.95 si comprende che già di per sé la matrice di scarto è caratterizzata da una leggera acidità, e quindi la presenza del fungo e la fermentazione in beuta porta solo ad una leggera diminuzione di tale valore. Per quanto concerne il contenuto totale di proteine e l'attività dell'enzima laccasi, i valori ottenuti sono stati riportati in Tab 3.19. In tal caso questi valori sono strettamente correlati alla curva di produzione di CO₂ (Fig. 3.3).

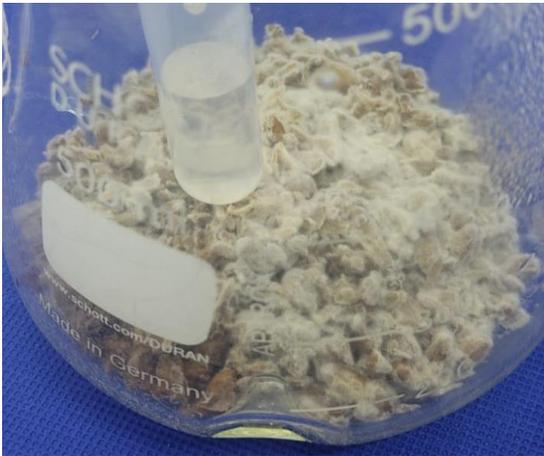
TEMPO (gg)	CONCENTRAZIONE PROTEINE ($\text{g}_{\text{proteine}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$)	ATTIVITÀ ENZIMATICA LACCASI (UI/L)
4	0,009	0,03
5	0,011	0,54
6	0,017	0,72
7	0,018	1,23
8	0,017	0,83
9	0,019	0,79
10	0,019	0,81
12	0,020	0,54

Tabella 3.19: Concentrazione di proteine e attività enzimatica laccasi terza sperimentazione.

In tal caso, si osserva una maggiore aumento della concentrazione di proteine per i primi sette giorni di sperimentazione: si ha infatti un delta di concentrazione pari a 0.009 tra il valore a quattro giorni e il valore a sette giorni, e un delta di 0.002 tra il valore a sette giorni e il valore a dodici giorni. Questa differenza sta ad indicare come nelle prime fasi di fermentazione il ceppo fungino cresca più velocemente e in maniera più evidente rispetto agli ultimi giorni di sperimentazione (Fig. 3.3 c). Ciò ovviamente si rispecchia in aumenti di valori di concentrazione di proteine maggiori all'inizio della sperimentazione piuttosto che al termine di essa. Infatti, nelle prime fasi di crescita il ceppo fungino inizia a degradare la matrice di scarto e a sintetizzare composti proteici, mentre nelle fasi successive di crescita la matrice di BSG che è in parte degradata porta comunque a sintetizzare composti proteici da parte del ceppo fungino, ma con una velocità che risulta minore. L'attività dell'enzima laccasi presenta lo stesso andamento: a sette giorni si osserva un valore massimo di attività pari a 1.23 UI/L che poi tende a diminuire fino a un valore di 0.53 UI/L al dodicesimo giorno. Tali risultati suggeriscono che il ceppo fungino produce maggiormente composti nelle fasi iniziali di crescita per poi gradualmente diminuire tale produzione.

Nelle ultime fasi della sperimentazione, a partire dal settimo giorno fino al dodicesimo, si osserva un graduale aumento di concentrazione di proteine da un valore di 0.018 $\text{g}_{\text{proteine}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$ fino ad un valore di 0.020 $\text{g}_{\text{proteine}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$ e una diminuzione dell'attività enzimatica della laccasi da un valore di 1.23 UI/L ad un valore di 0.54 UI/L.

Questo andamento opposto sta ad indicare che durante il processo fermentativo il ceppo fungino sintetizza sempre composti proteici a partire dalla BSG, ma durante l'ultima parte della fermentazione la velocità di produzione dell'enzima laccasi in particolare diminuisce e conseguentemente anche la sua concentrazione.



(a)



(b)



(c)

Figura 3.3: Crescita microrganismo fungino a tempi diversi :(a) quarto giorno di sperimentazione; (b) settimo giorno di sperimentazione; (c) dodicesimo giorno di sperimentazione.

In Figura 3.3, viene riportato l'andamento della produzione di CO₂ durante la terza sperimentazione. Sull'asse delle ascisse è riportato il tempo in giorni, mentre sull'asse delle ordinate viene riportato il valore della CO₂ media cumulata in mg. I punti della curva sono calcolati come media cumulata di CO₂ e si riporta inoltre la deviazione standard indicata con le barre verticali.

Dal grafico si evince che per tempi compresi tra l'inizio della prova e il quinto giorno di sperimentazione si raggiunge un valore di CO₂ media cumulata pari a 526.9 mg_{CO2} e la pendenza della curva non varia e ciò si riflette in un aumento costante della CO₂ prodotta. Per un tempo compreso tra il sesto e il settimo giorno di sperimentazione si raggiunge un valore di CO₂ media cumulata pari a 792.0 mg_{CO2} e conseguentemente una velocità di produzione di CO₂ pari a 265.1 Δmg_{CO2}/Δt.

Questo aumento della pendenza della curva è correlato con la produzione dell'enzima laccasi e con la concentrazione totale di proteine: in questa fase della fermentazione il ceppo fungino raggiunge il massimo di velocità di produzione di CO₂ e conseguentemente raggiunge anche il massimo di attività dell'enzima laccasi. Dal settimo giorno di sperimentazione fino al nono si osservano valori sempre crescenti della CO₂ media cumulata, ma in tal caso la velocità di produzione della CO₂ torna a diminuire (tra l'ottavo e il nono giorno di sperimentazione si registra una decrescita nella produzione di CO₂ con una velocità associata pari a -13.2 Δmg_{CO2}/Δt). Infine, a partire dal nono giorno di sperimentazione in poi fino al termine della prova la velocità di produzione di CO₂ torna ad aumentare (si ottengono valori di velocità di produzione di CO₂ per il decimo giorno di sperimentazione pari a 251.9 Δmg_{CO2}/Δt) ed il valore della CO₂ media cumulata al termine della sperimentazione raggiunge i 1540.3 mg.

A valle di quanto descritto si può quindi concludere che la crescita del micelio è maggiore nelle prime fasi di crescita fino a tempi di sperimentazione pari a 7 giorni, in cui si registra anche un valore massimo di attività dell'enzima laccasi pari a 1.23 UI/L, per tempi intermedi di sperimentazione compresi tra sette e nove giorni la crescita e di conseguenza il consumo di CO₂ subiscono un rallentamento, ed infine per tempi di sperimentazione compresi tra nove e dodici giorni la produzione di CO₂ torna ad essere simile a quella che si ha nelle prime fasi di sperimentazione.

TEMPO (gg)	CO ₂ MEDIA CUMULATA (mg)	VELOCITÀ PRODUZIONE DI CO ₂ ($\Delta mg_{CO_2}/\Delta t$)
4	257,4	64,3
5	526,9	134,7
6	792,0	265,1
7	882,4	90,4
8	869,2	-13,2
9	1046,1	176,8
10	1298,0	251,9
12	1540,3	242,2

Tabella 3.20: Valori di CO₂ media cumulata e velocità di produzione di CO₂ terza sperimentazione.

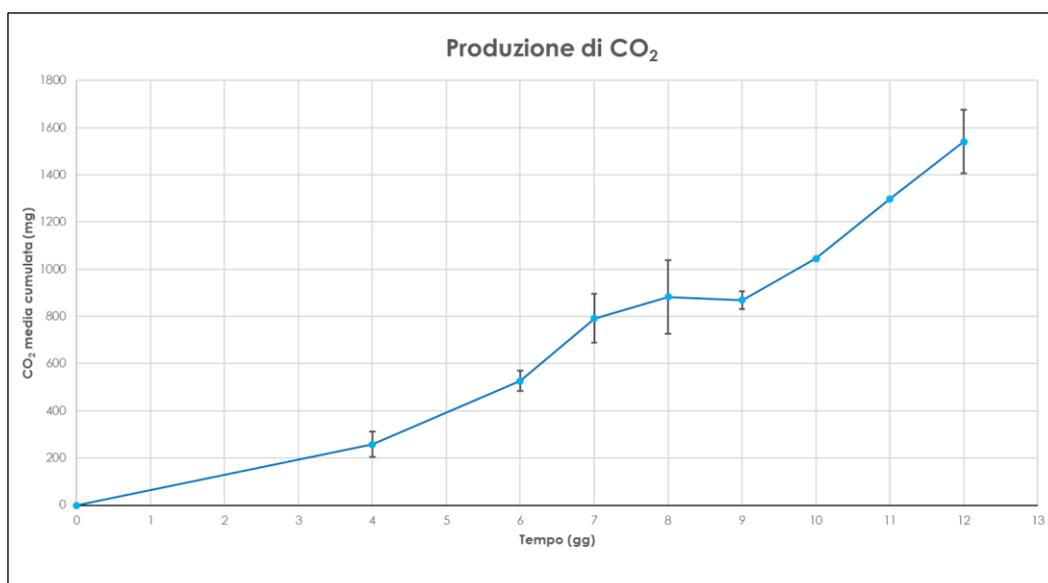


Figura 3.4: Andamento della produzione della CO₂ terza sperimentazione.

3.1.4 Quarta sperimentazione

La quarta sperimentazione prevede di confrontare due sistemi diversi per l'allestimento di microcosmi: Beuta da 500 mL e Beuta da 1000 mL. La beuta da 500 mL viene chiusa con il tappo di vetro, mentre la beuta da 1000 mL viene chiusa con il tappo sensore che permette di determinare il valore di O₂ consumato durante la fermentazione. Entrambi i sistemi sono inoltre dotati della provetta con acqua per garantire l'umidità, e della provetta con la soluzione di NaOH (3M) per la cattura della CO₂ sviluppata. Le beute da 500 mL per un tempo totale di cinque minuti, mentre l'aerazione delle beute da 1000 mL avviene sotto cappa sterile mediante apertura del sistema per un tempo totale di trenta minuti. Le beute da 500 mL sono preparate inserendo una quantità di BSG (umidità percentuale pari al 70%) pari a 40 g e inoculando 3 mL di sospensione di conidi. Le beute da 1000 mL sono preparate inserendo una quantità di BSG (umidità percentuale pari al 70%) pari a 65 g e inoculando 6 mL di sospensione di conidi. I microcosmi sono incubati in termostato a 39°C e si opera uno shift di temperatura a 30°C dopo due giorni dall'inizio della prova. In entrambi i casi la sperimentazione viene condotta per un tempo totale di tredici giorni, operando i sacrifici a 4, 7, 8, 9, 10 e 13 giorni dall'inizio della sperimentazione.

Il primo parametro che si vuole commentare è l'umidità percentuale (Tab. 3.21):

TEMPO (gg)	UMIDITÀ (%)	
	BEUTA DA 500 mL	BEUTA DA 1000 mL
4	76,60 (76) *	73,03
7	77,22 (76,5) *	78,27
8	77,12 (76,82) *	77,75
9	77,50 (76,32) *	76,63
10	76,31 (76,48) *	77,31
13	78,71	77,12

*: i dati fanno riferimento alla terza sperimentazione.

Tabella 3.21: Umidità percentuale quarta sperimentazione.

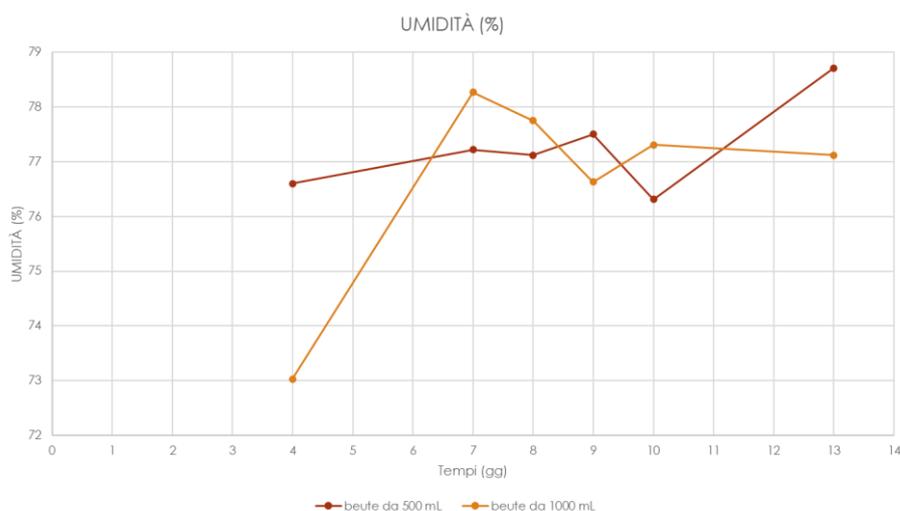


Figura 3.5: Andamento umidità percentuale beute da 500 mL e beute da 1000 mL quarta sperimentazione.

I valori di umidità, durante tutta la sperimentazione, non risultano così differenti l'uno dall'altro: per quanto concerne le beute da 500 mL si ottiene un valore minimo di umidità di 76.6% al quarto giorno e valore massimo di umidità pari al 78.71% al tredicesimo giorno, mentre per quanto concerne le beute da 1000 mL si ottiene un valore minimo di umidità di 73.6% al quarto giorno di sperimentazione e valore massimo di umidità pari al 78.27% al settimo giorno di sperimentazione. Tale minima differenza che si riscontra nei valori ottenuti sta ad indicare che i sistemi costituiti dalle provette con acqua sterile all'interno dei microcosmi risultano efficienti dal punto di vista del controllo dell'umidità. Una differenza che si riscontra è il valore di umidità al quarto e al settimo giorno di sperimentazione per il sistema costituito dalla beuta da 1000 mL: 73.03% al quarto giorno e 78.27% al settimo giorno (Fig. 3.5). Tale differenza è dovuta al fatto che in questo caso il sistema per l'umidità viene inserito non all'inizio della prova bensì dopo quattro giorni dall'inizio della prova. Come si può vedere dalla figura 3.3 infatti senza il sistema per l'umidità la crescita del microrganismo fungino su BSG risulta meno efficiente ed omogenea rispetto al caso in cui è presente il sistema per l'umidità.

Infine, come si può vedere da tabella 3.21 i valori di umidità per il sistema della beuta da 500 mL sono stati confrontati con quelli ottenuti durante la terza sperimentazione: in tal caso i risultati ottenuti per ogni giorno di sacrificio non sono così differenti, indice di buona riproducibilità del sistema.



(a)



(b)

Figura 3.6: Crescita ceppo fungino in beuta da 1000 mL: (a) senza sistema per l'umidità; (b) con sistema per l'umidità.

Successivamente, si confrontano i dati ottenuti per i gradi Brix (Tab. 3.22). In questo caso si ricavano valori non troppo differenti durante tutta la sperimentazione sia per le beute da 500 mL sia per le beute da 1000 mL. Infatti, nel caso di beute da 500 mL si registra un valore massimo di gradi Brix pari a 0.3% al tredicesimo giorno di sperimentazione, e un valore minimo di 0.20% al settimo e ottavo giorno di sperimentazione. In tal senso questa minima differenza di valori che si riscontra durante tutta la sperimentazione sta ad indicare che durante la fermentazione i processi di degradazione della BSG ad opera del ceppo fungino portano ad una concentrazione finale di carboidrati che è simile e che quindi dal punto di vista di sintesi di composti zuccherini durante la sperimentazione si hanno processi simili. Inoltre, i valori ricavati per le beute da 500 mL sono confrontati con i valori ottenuti alla terza sperimentazione, e si osserva che non vi sono differenze sostanziali (l'unica differenza che si può osservare è il valore dei gradi Brix ottenuto all'ottavo giorno di sperimentazione pari a 0.3% per la terza prova e pari a 0.2% per la quarta), e ciò sta ad indicare che le due prove e le fermentazioni in beuta ad esse associate sono confrontabili.

TEMPO (gg)	GRADI BRUX (%)	
	BEUTA DA 500 mL	BEUTA DA 1000 mL
4	0,27 (0,25) *	0,38
7	0,20 (0,28) *	0,28
8	0,20 (0,3) *	0,5
9	0,25 (0,2) *	0,42
10	0,25 (0,25) *	0,45
13	0,3	0,38

*: i dati fanno riferimento alla terza sperimentazione.

Tabella 3.22: Gradi Brix quarta sperimentazione.

Considerando i valori ottenuti per le beute da 1000 mL, si osserva che per ogni tempo questi risultano sempre maggiori rispetto a quelli ottenuti con le beute da 500 mL (Fig. 3.7). Infatti, il valore massimo per le beute da 1000 mL si ottiene all'ottavo giorno ed è pari a 0.5% (nel caso della beuta da 500 mL tale valore è pari a 0.2%), mentre il valore minimo è pari a 0.28% (nel caso della beuta da 500 mL tale valore è pari a 0.2%). Tale differenza è giustificata dal fatto che per le beute da 1000 mL si è inoculata una quantità maggiore di ceppo fungino, si ha una maggiore quantità di BSG e di conseguenza la concentrazione finale di carboidrati in soluzione è maggiore.



Figura 3.7: Andamento gradi Brix beute da 500 mL e beute da 1000 mL quarta sperimentazione.

In Tab. 3.23, si riportano i dati relativi alla variazione di pH durante la prova. Questi non superano mai il valore di 7 (valore massimo nelle beute da 500 mL pari a 6.48 e valore massimo nel caso delle beute da 1000 mL pari a 5.18). Questo sta ad indicare che partendo da una BSG tal quale che presenta un valore di pH pari 5.59 la fermentazione del ceppo fungino porta ad un leggero aumento del pH che però risulta trascurabile. Infatti, considerando un valore minimo di pH per le beute da 500 mL di 5.18 ed un valore massimo di 6.48 si ottiene una differenza pari a 1.3 che risulta trascurabile.

TEMPO (gg)	pH	
	BEUTA DA 500 mL	BEUTA DA 1000 mL
4	5,57 (4,91) *	5,10
7	5,18 (5,18) *	5,18
8	5,35 (5,77) *	4,62
9	5,56 (5,94) *	4,90
10	6,10 (6,07) *	4,83
13	6,48	4,70

*: i dati fanno riferimento alla terza sperimentazione.

Tabella 3.23: pH quarta sperimentazione.

Inoltre, come mostrato in Figura 3.8 i valori di pH per le beute da 500 mL risultano sempre maggiori rispetto ai valori di pH per le beute da 1000 mL. Ciò può essere dovuto al fatto che nelle beute da 1000 mL la fermentazione porta ad una sintesi di composti da parte del fungo che acidificano maggiormente il sistema rispetto alle beute da 500 mL.

Infine, così come visto nel caso dei gradi Brix e dell'umidità percentuale, i valori del pH per le beute da 500 mL vengono confrontati con quelli ottenuti durante la terza sperimentazione: in tal caso i valori sono confrontabili e non vi sono differenze sostanziali tra i risultati ottenuti (la maggior differenza si ha al quarto giorno di sperimentazione in cui si ottiene una differenza pari a 0.66). Anche in questo caso la confrontabilità dei risultati è indice di riproducibilità del sistema.

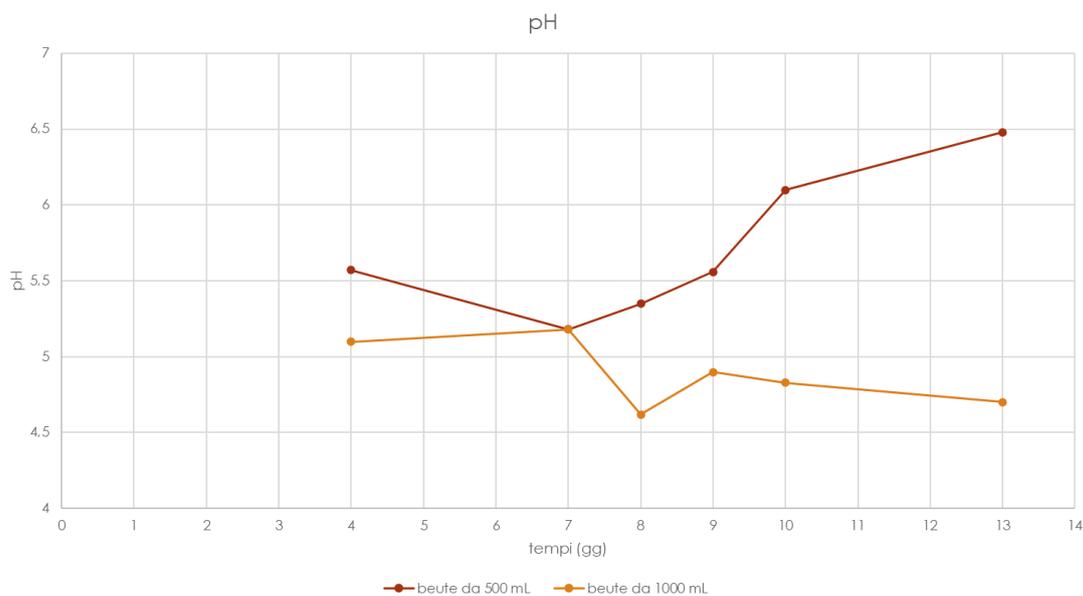


Figura 3.8: Andamento pH beute da 500 mL e beute da 1000 mL quarta sperimentazione.

In Tab. 3.24, sono riportati i risultati relativi alla concentrazione totale di proteine e l'attività dell'enzima laccasi. In questo caso, come già riscontrato durante la terza sperimentazione, si trova un valore massimo di attività al settimo giorno di sperimentazione. Inoltre, i dati di attività enzimatica risultano sempre maggiori nel caso delle beute da 1000 mL ma comunque confrontabili con i valori ottenuti nel caso delle beute da 500 mL. L'attività enzimatica delle beute da 500 mL viene successivamente confrontata con l'attività enzimatica determinata durante la terza sperimentazione. I valori che si ottengono durante la quarta sperimentazione non sono dissimili da quelli ottenuti durante la terza sperimentazione, e ciò è una conferma del fatto che nonostante si usi lo stesso microcosmo per due sperimentazioni diverse alla fine i risultati ottenuti non variano sensibilmente.

I dati relativi alla concentrazione di proteine mostrano sia nel caso delle beute da 500 mL sia nel caso delle beute da 1000 mL un andamento crescente (valore minimo per le beute da 500 mL pari a $0.012 \text{ g}_{\text{proteine}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$ al quarto giorno di sperimentazione valore massimo pari a $0.027 \text{ g}_{\text{proteine}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$ al tredicesimo giorno di sperimentazione). Inoltre, si evidenzia come per le beute da 1000 mL i valori di concentrazione di proteine siano sempre minori rispetto ai valori ottenuti per le beute da 500 mL: per esempio nel caso del sacrificio al tredicesimo giorno di sperimentazione per le beute da 1000 mL si ottiene un valore di $0.012 \text{ g}_{\text{proteine}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$, mentre nel caso delle beute da 500 mL si ottiene un valore di $0.027 \text{ g}_{\text{proteine}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$ (t-Student test $p=0.0047$).

Inoltre, come mostrato in tabella 3.20 i dati di concentrazione totale di proteine per le beute da 500 mL sono confrontati con i dati ottenuti durante la terza sperimentazione: in tal caso i valori sono confrontabili e non presentano differenze sostanziali.

TEMPO (gg)	CONCENTRAZIONE PROTEINE (g _{proteine} /g _{BSG secca})		ATTIVITÀ ENZIMATICA LACCASI (UI/L)	
	BEUTA DA 500 mL	BEUTA DA 1000 mL	BEUTA DA 500 mL	BEUTA DA 1000 mL
4	0,012 (0,009) *	0,006	0,019 (0,026) *	0,018
7	0,017 (0,018) *	0,008	1,18 (1,23) *	1,55
8	0,017 (0,017) *	0,009	0,91 (0,83) *	1,12
9	0,026 (0,019) *	0,009	0,85 (0,79) *	0,87
10	0,026 (0,019) *	0,010	0,86 (0,81) *	0,9
13	0,027	0,012	0,49	0,73

*: i dati fanno riferimento alla terza sperimentazione.

Tabella 3.24: concentrazione di proteine e attività enzimatica laccasi quarta sperimentazione.

3.1.5 Quinta sperimentazione

La quinta sperimentazione viene condotta utilizzando beute da 500 mL all'interno delle quali è inserita una quantità di BSG umida (umidità pari al 70%) pari a 40 g. Anche in questo caso le beute sono provviste del sistema che garantisce e del sistema di cattura della CO₂ prodotta. I microcosmi una volta allestiti sono poi incubati in termostato a 39°C operando uno shift di temperatura a 30°C dopo due giorni dall'inizio della prova. La sperimentazione viene portata avanti per un tempo totale di quattordici giorni e sono stati condotti sacrifici a 4, 7, 8, 9, 10, 13 e 14 giorni dall'inizio della prova.

In Tab. 3.25 si riportano i dati relativi all'umidità percentuale:

TEMPO (gg)	UMIDITÀ (%)
4	61,25 (60,25)*
7	76,10 (76,60)*
8	76,90 (77,22)*
9	77,33 (77,12)*
10	77,12 (77,50)*
13	76,98 (76,31)*
14	76,95 (78,71)*

*: i dati fanno riferimento alla quarta sperimentazione.

Tabella 3.25: Umidità percentuale quinta sperimentazione.

In questo caso, ad eccezione del primo valore di umidità pari a 61.25%, si registrano valori di umidità percentuale che, durante tutta la prova, non presentano differenze sostanziali. Infatti, si ha un valore massimo di umidità pari al 77.33% al nono giorno di sperimentazione e un valore minimo di umidità pari al 76.10% al settimo giorno di sperimentazione.

Nel corso della fermentazione, il sistema utilizzato per il controllo dell'umidità è in grado di mantenere tale valore costante, così come evidenziato nelle prove precedenti.

I valori dei gradi Brix (Tab. 3.26) mostrano un andamento pressoché costante: si evidenzia un valore massimo di 0.27% al decimo giorno di sperimentazione e un valore minimo di 0.20% al quarto giorno di sperimentazione. Tali risultati suggeriscono che durante la fase fermentativa i processi degradativi della BSG ad opera del ceppo fungino portano ad una produzione di zuccheri semplici che risulta pressoché costante. Inoltre, come per i valori di umidità percentuale i risultati relativi ai gradi Brix sono confrontati con quelli ottenuti alla quarta sperimentazione: in questo caso i valori non sono così dissimili l'uno dagli altri (si ottiene un valore di 0.3 al terzo giorno di sperimentazione).

TEMPO (gg)	GRADI BRIX (%)
4	0,20 (0,27)*
7	0,23 (0,20)*
8	0,21 (0,20)*
9	0,17 (0,25)*
10	0,27 (0,20)*
13	0,21 (0,30)*
14	0,22

*: i dati fanno riferimento alla quarta sperimentazione.

Tabella 3.26: Umidità percentuale quinta sperimentazione.

Di seguito sono riportati i risultati relativi al pH (Tab. 3.27). I valori mostrano che durante la prova il pH non supera mai il valore di 6.43 (al quattordicesimo giorno di sperimentazione) e che il valore minimo di 5.48 si ha al quarto giorno di sperimentazione. Inoltre, si comprende che i risultati ottenuti non variano così tanto l'uno dall'altro e che quindi il pH non risulta fortemente dipendente dal processo di fermentazione. Infine, si confrontano i valori di pH con quelli ottenuti durante la quarta sperimentazione: in questo caso non vi sono sostanziali differenze nei risultati e ciò sta ad indicare che i due sistemi delle due sperimentazioni sono simili

e confrontabili.

TEMPO (gg)	pH
4	5,48 (5,57)*
7	5,50 (5,18)*
8	5,63 (5,35)*
9	5,61 (5,56)*
10	6,17 (6,10)*
13	6,25 (6,48)*
14	6,43

*: i dati fanno riferimento alla quarta sperimentazione.

Tabella 3.27: pH quinta sperimentazione.

Infine, si riportano i risultati ottenuti per la concentrazione di proteine e per l'attività dell'enzima laccasi (Tab. 3.28).

TEMPO (gg)	CONCENTRAZIONE PROTEINE (g _{proteine} /g _{BSG secca})	ATTIVITÀ ENZIMATICA LACCASI (UI/L)
4	0,010 (0,012)*	0,015 (0,019)*
7	0,016 (0,017)*	1,08 (1,18)*
8	0,018 (0,017)*	0,89 (0,91)*
9	0,021 (0,026)*	0,79 (0,85)*
10	0,022 (0,026)*	0,81 (0,86)*
13	0,024 (0,027)*	0,38 (0,49)*
14	0,027	0,35

*: i dati fanno riferimento alla quarta sperimentazione.

Tabella 3.28: concentrazione totale di proteine e attività enzima laccasi quinta sperimentazione.

Per quanto concerne la concentrazione di proteine, si osserva come essa risulti crescente durante tutta la sperimentazione: si registra un valore iniziale di concentrazione pari a $0.010 \text{ g}_{\text{proteine}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$ e un valore finale di concentrazione pari a $0.027 \text{ g}_{\text{proteine}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$. Questo comportamento sta ad indicare che durante la fermentazione il ceppo fungino, in seguito a processi di degradazione della matrice di scarto, produce composti proteici e di conseguenza la loro concentrazione in soluzione aumenta. Inoltre, la concentrazione di proteine è strettamente legata all'attività enzimatica della laccasi: ad un valore massimo di attività dell'enzima pari a 1.08 UI/L registrato al settimo giorno di sperimentazione corrisponde un valore di concentrazione di proteine pari a $0.016 \text{ g}_{\text{proteine}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$. Al settimo giorno si ha il maggior valore di attività della laccasi, successivamente tale valore diminuisce e di conseguenza i composti proteici che si osservano per giorni successivi al settimo sono di natura diversa rispetto al composto enzimatico della laccasi. Infine, come si osserva da Tabella 3.28 i valori di concentrazione delle proteine e dell'attività enzimatica sono confrontati con quelli ottenuti alla quarta sperimentazione, valore massimo al settimo giorno pari a 1.18 UI/L per la quarta sperimentazione e un valore massimo pari a 1.08 UI/L per la quinta sperimentazione, a conferma della ripetibilità delle prove. In Fig. 3.11, si riportano le curve respirometriche relative alla

quarta e quinta sperimentazione: come si può osservare le due curve presentano un andamento molto simile e di conseguenza anche le due fermentazioni durante le prove evolvono similmente.

Le principali differenze si evidenziano dal decimo giorno di sperimentazione in poi (valore di CO_2 media cumulata pari a 1018.4 mg per la quarta prova e 1094.5 mg per la quinta prova), si registra una differenza massima di 301.4 mg di CO_2 prodotta.

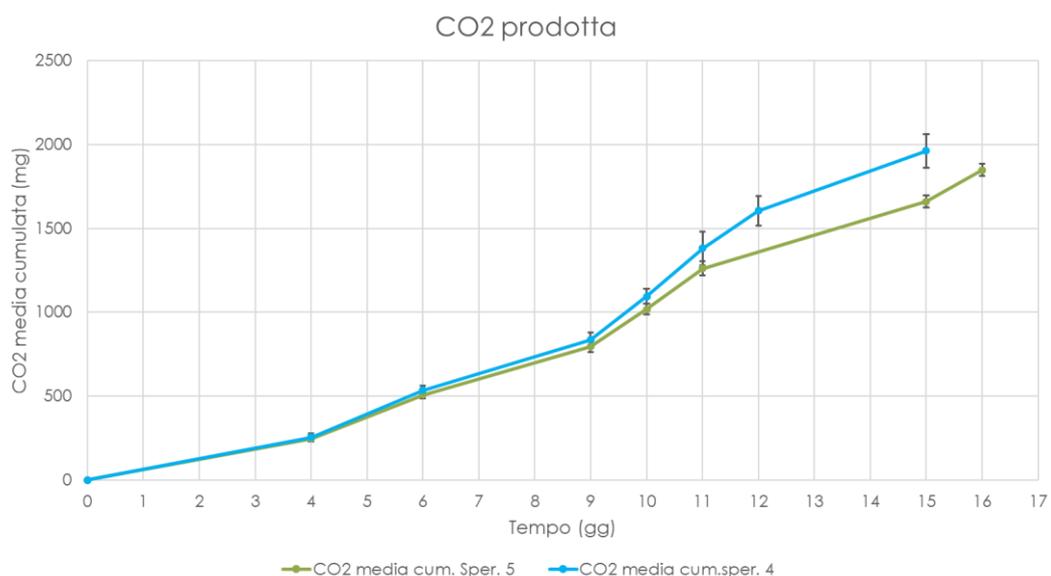


Figura 3.11: curve respirometriche quarta e quinta sperimentazione.

In Fig 3.12, si confronta la curva respirometrica ottenuta con la velocità di produzione di CO₂. È possibile osservare che il valore di velocità è strettamente legata alla pendenza della curva respirometrica: infatti per tempi fino a 9 giorni la pendenza risulta più o meno costante e ciò si riflette in un valore di velocità di produzione di CO₂ anch'esso costante, per tempi compresi tra 9 giorni e 11 giorni e tempi superiori ai 15 giorni la pendenza della curva respirometrica aumenta e di conseguenza anche la velocità di produzione di CO₂ aumenta. Infine, per tempi compresi tra gli 11 giorni e 15 giorni la pendenza torna a diminuire e di conseguenza anche la velocità di produzione di CO₂.

Nella Figura 3.13, si confrontano la velocità di produzione di CO₂ relative alla quarta e quinta sperimentazione. Il grafico non è riportato per tempi di sacrificio dei microcosmi, ma per intervalli di tempo (Δt) di areazione del sistema. Si comprende che per valori di Δt bassi (24 ore) la velocità di produzione di CO₂ è alta e tende a decrescere all'aumentare dell'intervallo di tempo di aerazione. Questo dimostra che l'aerazione frequente del sistema porta ad avere una crescita migliore del fungo sulla BSG e, conseguentemente, ad una migliore degradazione del substrato lignocellulosico. Per le considerazioni appena fatte, si decide di areare i microcosmi ogni 24 ore.

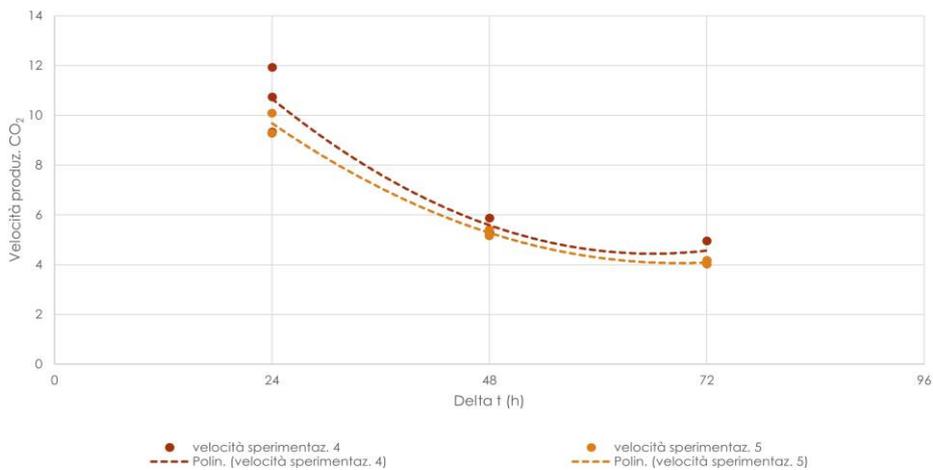


Figura 3.13: Velocità produzione CO₂ quarta e quinta sperimentazione.

3.1.6 Sesta sperimentazione

La sesta ed ultima sperimentazione viene allestita utilizzando come matrice di scarto la BSG denominata *Forna 2*. In questo caso la BSG viene utilizzata sia tal quale sia triturata. Le prove in microcosmo sono fatte in beute da 500 mL in cui viene inserita una quantità di BSG (umidità pari al 70%) pari a 40 g. Le beute sono dotate di sistema per garantire l'umidità e del sistema costituito dalla soluzione di NaOH 3M in grado di catturare la CO₂ sviluppata. I microcosmi sono chiusi con tappo di vetro e incubati in termostato a 39°C. Dopo due giorni dall'inizio della prova si effettua uno shift di temperatura a 30°C. La sperimentazione è portata avanti per dieci giorni e si operano tre sacrifici: 4, 7, e 10 giorni dall'inizio della prova.

I primi dati ottenuti che si vogliono commentare sono quelli relativi all'umidità percentuale (Tab. 3.29).

TEMPI (gg)	UMIDITÀ (%)	
	TAL QUALE	TRITURATA
CONTROLLO	62.31	77.31
4	75.12 (76.10)*	78.27
7	77.19 (76.90)*	78.17
10	77.31 (62.90)*	67.26

*: i dati fanno riferimento alla quinta sperimentazione.

Tabella 3.29: Umidità percentuale sesta sperimentazione.

I valori di umidità in tal caso vengono valutati anche per microcosmi di controllo. Andando a considerare i microcosmi inoculati si osserva che l'umidità non varia sensibilmente durante la prova sia nel caso di utilizzo di BSG tal quale sia nel caso di utilizzo di BSG triturata (si ottiene un valore minimo di 75.12% al quarto giorno di sperimentazione, e si raggiunge un valore massimo di 77.31% al decimo giorno per la BSG tal quale), e quindi si comprende che la fermentazione, e la presenza del sistema che garantisce l'umidità, non portano ad un aumento di acqua all'interno dei microcosmi. Per quanto concerne i valori ottenuti per la BSG triturata si capisce che anche essi non variano sensibilmente durante tutta la sperimentazione. I risultati che invece risultano differenti sono quelli relativi ai controlli per la BSG tal quale (62.31%), e la BSG triturata (77.31). Questa differenza si può

spiegare col fatto che il processo di triturazione dei grani può aver liberato una maggior quantità di acqua presente nei chicchi di orzo e conseguentemente ad un maggiore valore di umidità nel caso di BSG triturata.

Inoltre, i dati relativi alla BSG tal quale vengono confrontati con quelli ottenuti durante la quinta sperimentazione (BSG Forna 1): non vi sono differenze sostanziali in quanto i due sistemi considerati sono allestiti allo stesso modo, nonostante la BSG provenga da due produzioni differenti.

In Tab. 3.30 vengono riportati i dati relativi ai gradi Brix.

TEMPI (gg)	GRADI BRUX (%)	
	TAL QUALE	TRITURATA
CONTROLLO	0,25	0,29
4	0,32 (0,23) *	0,42
7	0,38 (0,21) *	0,43
10	0,27	0,32

*: i dati fanno riferimento alla quinta sperimentazione.

Tabella 3.30: Gradi Brix sesta sperimentazione.

I gradi Brix, sia nel caso di BSG tal quale sia nel caso di BSG triturata, non mostrano sostanziali differenze nel corso della sperimentazione (si registra una differenza dello 0.11% nel caso di BSG triturata così come per la BSG tal quale), così come non si riscontrano differenze a pari tempo di sperimentazione per la BSG tal quale e per la BSG triturata (maggiore differenza pari a 0.10% al quarto giorno di sperimentazione). Inoltre, per quanto concerne la BSG triturata i valori sono confrontati con quelli ottenuti alla quinta sperimentazione: in tal caso i risultati sono simili e confrontabili. A valle di ciò si può ipotizzare che in tal caso i gradi Brix potrebbero non essere così influenzati dall'avanzare dei processi fermentativi sia nel caso di BSG tal quale sia nel caso di BSG triturata.

Di seguito vengono esaminati i valori di pH ottenuti durante la sperimentazione (Tab.3.31).

TEMPI (gg)	pH	
	TAL QUALE	TRITURATA
CONTROLLO	6,01	6,12
4	6,07 (5,48) *	6,14
7	6,13 (5,50) *	6,44
10	6,12	6,22

*: i dati fanno riferimento alla quinta sperimentazione.

Tabella 3.31: Gradi Brix sesta sperimentazione.

Anche in questo caso i risultati della BSG tal quale vengono confrontati con i risultati ottenuti alla quinta sperimentazione. Andando a confrontare il valore di pH del microcosmo di controllo con BSG tal quale (6.01) con il valore massimo ottenuto durante la fermentazione al settimo giorno (6.13) si osserva che questi due valori non sono così diversi e che quindi il processo fermentativo ad opera del fungo non porta a variazioni significative del pH nel microcosmo. Lo stesso ragionamento può essere fatto nel caso di BSG triturrata in cui si ottiene un valore di pH per il microcosmo di controllo pari a 6.12 e un valore massimo di pH durante la fermentazione al settimo giorno pari a 6.44. Di conseguenza, è possibile concludere che in questo caso il pH non è dipendente dalla fermentazione e si mantiene pressoché costante durante tutto il tempo della prova.

Successivamente vengono esposti e commentati i dati relativi alla concentrazione di proteine e all'attività dell'enzima laccasi (Tab. 3.32). I valori di concentrazione di proteine presentano un andamento crescente durante la sperimentazione sia nel caso di BSG tal quale sia nel caso di BSG triturrata. Confrontando invece i valori per i due tipi di BSG si comprende che nel caso di BSG triturrata per ogni tempo di sperimentazione si ottengono valori sempre maggiori rispetto all'utilizzo di BSG tal quale (per esempio al decimo giorno di sperimentazione per la BSG tal quale si ottiene un valore di concentrazione di proteine pari a $0.023 \text{ g}_{\text{proteine}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$ mentre per la BSG triturrata si ottiene un valore di $0.032 \text{ g}_{\text{proteine}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$) (t-Student test $p=0.0098$). Questa differenza può essere dovuta al fatto che nel caso della triturazione la rottura dei chicchi costituenti la BSG ha liberato portato ad una matrice che risulta più efficiente nel processo di fermentazione. Infatti, il ceppo fungino in tal caso è in grado di utilizzare durante la fermentazione anche le parti interne dei chicchi che altrimenti non sarebbero utilizzate nel caso della BSG tal quale. Per quanto invece

concerne l'attività enzimatica della laccasi si registrano valori massimi di tale parametro al settimo giorno di sperimentazione (1.21 UI/L e 1.35 UI/L per la BSG tal quale e la BSG triturrata rispettivamente), ed in generale si ottengono valori maggiori per ogni tempo di sperimentazione nel caso di BSG triturrata (ad esempio al decimo giorno di sperimentazione si ha un valore di 0.9 UI/L nel caso di BSG tal quale e un valore di 1.12 UI/L nel caso di BSG triturrata). Questo si può spiegare, come già esposto nel caso della concentrazione delle proteine, col fatto che la triturazione porta alla rottura dei chicchi di BSG e quindi ad una quantità di BSG disponibile alla fermentazione che è maggiore.

TEMPI (gg)	CONCENTRAZIONE PROTEINE (g _{proteine} /g _{BSG secca})		ATTIVITÀ ENZIMATICA LACCASI (UI/L)	
	TAL QUALE	TRITURATA	TAL QUALE	TRITURATA
CONTROLLO	0.009 (0.010) *	0.010	0	0
4	0.014 (0.016) *	0.020	0,025* (0,015)	0,036
7	0.021 (0.022) *	0.027	1,21* (1,08)	1,35
10	0.023	0.032	0,90* (0,81)	1,12

*: i dati fanno riferimento alla quinta sperimentazione.

Tabella 3.32: Concentrazione totale di proteine e attività enzimatica laccasi sesta sperimentazione.

Infine, si riportano i dati respirometrici ottenuti durante tale sperimentazione. Per prima cosa si fa in aggiunta un confronto della curva respirometrica per la BSG triturrata e la BSG tal quale (Fig. 3.14).

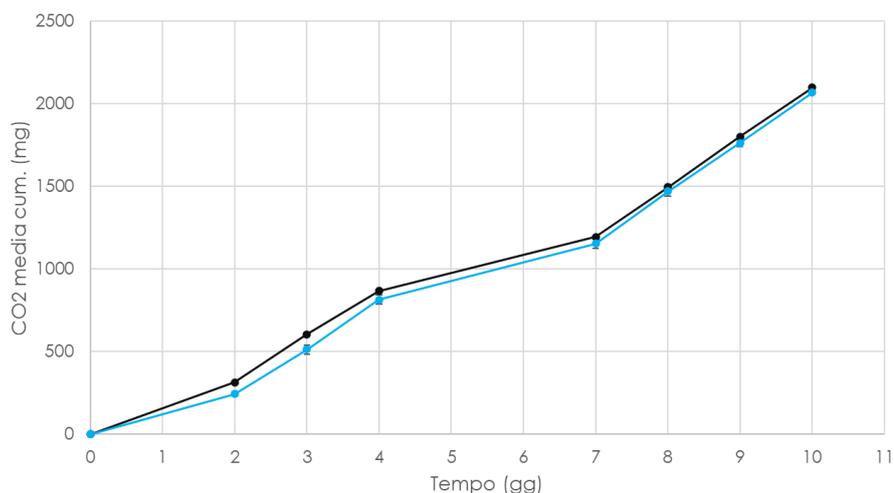


Figura 3.14: Curve respirometriche BSG tal quale e triturata sesta sperimentazione.

Come mostrato in figura 3.14 le due curve sono confrontabili. La curva relativa alla BSG triturata è leggermente superiore alla curva relativa alla BSG tal quale e questo può essere dovuto al fatto che il fungo sulla BSG triturata cresce in maniera più efficiente rispetto alla crescita su BSG tal quale. Inoltre, è risultato che nelle prima fasi di sperimentazione (fino a 6 giorni) la differenza tra la curva relativa alla BSG triturata e la BSG tal quale è più marcata rispetto alle fasi successive di sperimentazione. Questo è dovuto al fatto che per tempi minori di 6 giorni si è registrata una crescita più intensa del fungo sulla BSG triturata rispetto alla BSG tal quale.

Infine, si vogliono di confrontare le curve respirometriche ottenute durante la quinta e la sesta sperimentazione (Figura 3.15). Si può notare che la curva respirometrica della sesta sperimentazione per ogni tempo di sacrificio è sempre maggiore rispetto a quella della quinta sperimentazione e questo può essere dovuto alla composizione in grani del lotto di BSG *Forna 2* e quindi ad una migliore crescita del fungo sulla BSG *Forna 2* rispetto alla BSG *Forna 1*.

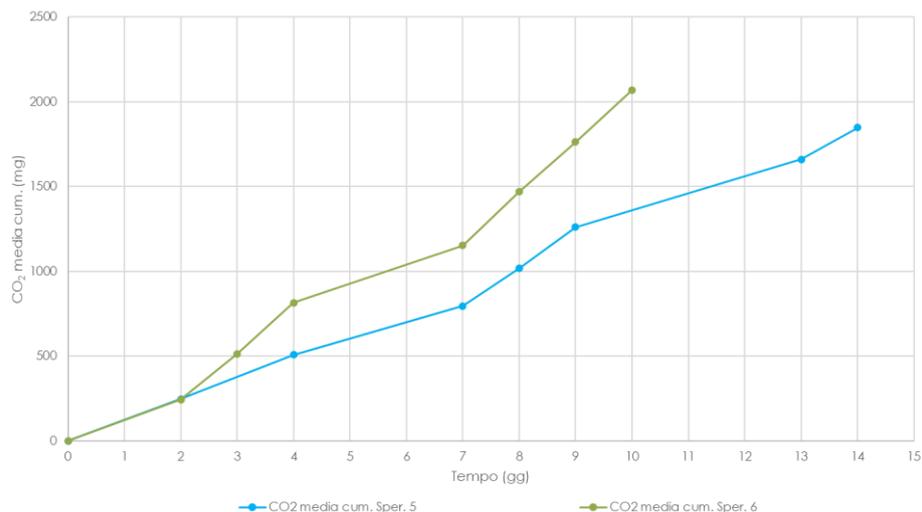


Figura 3.15: Curve respirometriche quinta e sesta sperimentazione.

3.2 Polifenoli totali

In tale capitolo si analizzano i risultati di concentrazione totale di polifenoli ottenuti per le sei sperimentazioni.

Le prime due prove, evidenziate in turchese, presentano condizioni operative che sono le stesse, così come i parametri valutati. Cambiano le dimensioni del sistema: beute da 500 mL (prova 4) e beute da 1000 mL (prova 5).

Per tali prove, la concentrazione totale di polifenoli viene determinata al giorno di massima attività dell'enzima laccasi (nono per la prima prova ed il settimo per la seconda prova). I valori che si ottengono sono presentati in tabella 3.33. Come si può osservare, i risultati ottenuti non sono così dissimili l'uno dall'altro ($3.0 \text{ mg}_{\text{polifenoli}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$ nel caso della prima prova e $2.6 \text{ mg}_{\text{polifenoli}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$) ($t\text{-Student } p=0.008$), e ciò sta ad indicare che nonostante si usino dei sistemi diversi (beute da capacità differente) il valore di concentrazione finale di polifenoli non cambia sensibilmente. In questo caso si può quindi pensare che la concentrazione totale di polifenoli non risulti così tanto dipendente dal sistema di microcosmo che si utilizza.

	BSG	Giorno raggiungiment o attività max	Attività enzimatica max UI/L	Polifenoli (mg _{polifenoli} / g _{BSGDM})	DURATA TOT. (gg)
1	FORNA 1 T.Q.	9	1.08	3.0	9
2	FORNA 1 T.Q.	7	1.55	2.6	13

Tabella 3.33: Concentrazione totali polifenoli prime due prove.

Per le prove successive la concentrazione totale di polifenoli viene determinata ad ogni tempo di sacrificio durante le sperimentazioni.

		TEMPI DI CAMPIONAMENTO (gg)							
		0	4	7	8	9	10	13	
	BSG	DURATA TOT. (gg)	POLIFENOLI (mg _{polifenoli} /g _{BSG secca})						
3	FORNA 1 T.Q.	12	ND	ND	3.5	ND	ND	ND	ND
4	FORNA 1 T.Q.	13	2,4	3	3,4	3,9	4	4.4	4.6
5	FORNA 1 T.Q.	14	2,1	3	3,1	3,8	4	4.3	4.3
6	FORNA 2 T.Q.	10	3,4	3,5	3,6	-	-	4.5	-
7	FORNA 2 TRIT.	10	4	4,2	4,4	-	-	5	-

Tabella 3.34: Concentrazione totali polifenoli prova 3, 4, 5, 6 e 7.

Da tali risultati si comprende che la concentrazione totali di polifenoli, per tutte le prove, presenta un andamento crescente all'aumentare del tempo di incubazione. La concentrazione di polifenoli totali più elevata, pari a 5 mg_{polifenoli}/g_{BSG secca} è stata ottenuto nella prova sette (BSG Forna 2 triturata) al decimo giorno. Questo sta ad indicare che la triturazione della matrice lignocellulosica e la conseguente rottura dei chicchi porta ad una liberazione maggiore dei polifenoli e ad una fermentazione da

parte del fungo che, come conseguenza, aumenta tale concentrazione. Inoltre, si nota che per la sintesi e liberazione di polifenoli dalla matrice di scarto un tempo maggiore di sperimentazione porta ad una concentrazione maggiore.

I valori massimi ottenuti per ogni prova sperimentale sono confrontati con i dati presenti in letteratura (Tab. 3.35).

Si evidenzia come i valori ottenuti nelle diverse prove siano confrontabili con quelli presenti in letteratura. Infatti, considerando il valore massimo che è stato ottenuto in tale tesi sperimentale ($5.0 \text{ mg}_{\text{polifenoli}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$) con il valore ottenuto da Costa Maia et al. (2020) ($8.45 \text{ mg}_{\text{polifenoli}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$) si comprende che tale differenza risulta trascurabile e che può essere dovuta a diversi fattori quali per esempio il tipo di microrganismo ligninolitico utilizzato. Inoltre, vengono riportati anche i valori dei tempi ai quali si registra la massima concentrazione di polifenoli, e si comprende che in questo caso tali tempi sono sempre verso il termine della sperimentazione (ad esempio nel caso della sperimentazione condotta da Tisma et al (2017) si ha una concentrazione massima di polifenoli pari a $8.7 \text{ mg}_{\text{polifenoli}}/\text{g}_{\text{BSG secca}}$ al quindicesimo ed ultimo giorno di sperimentazione) così come avviene per le sperimentazioni condotte durante tale lavoro di tesi.

Alla luce di quanto esposto si comprende che le sperimentazioni che sono state condotte hanno portato a risultati confrontabili con quelli presenti in letteratura, e che in particolare la concentrazione di polifenoli in microcosmi inoculati porta ad ottenere valori massimi per tempi finali di sperimentazione.

RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO	FUNGO UTILIZZATO	DURATA PROVA	CONDIZIONI DI COLTURA	GIORNO MASSIMA CONCENTRAZIONE DI POLIFENOLI	CONCENTRAZIONE (MAX) POLIFENOLI
Tisma et al. (2017)	<i>Trametes versicolor</i>	15 giorni	Beuta con tappo di vetro (SSF)	15 gg	8,7 mg _{polifenoli/g} BSG secca
Zeko-Pivac et al. (2022)	<i>Trametes versicolor</i>	7 giorni	Beuta con tappo di vetro (SSF)	7 gg	15,20 mg _{polifenoli/g} BSG secca
Ibarurri et al. (2022)	<i>Rhizopus Sp.</i>	8 giorni	Beuta con tappo di vetro (SSF)	4 gg	2,05 mg _{polifenoli/g} BSG secca (4gg)
Costa Maia et al. (2020)	<i>Aspergillus oryzae</i>	7 giorni	Beuta con tappo di vetro (SSF)	7 gg	8,45 mg _{polifenoli/g} BSG secca (7gg)
Costa Maia et al. (2020)	<i>Aspergillus terreus</i>	7 giorni	Beuta con tappo di vetro (SSF)	4 gg	7,90 mg _{polifenoli/g} BSG secca (4gg)
Prima prova	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	9 giorni	Beuta con tappo di vetro (SSF)	9 gg	3.0 mg _{polifenoli/g} BSG secca (9gg)
Seconda prova	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	13 giorni	Beuta con tappo sensore (SSF)	13 gg	2.6 mg _{polifenoli/g} BSG secca (13gg)
Terza prova	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	12 giorni	Beuta con tappo di vetro (SSF)	12 gg	3.5 mg _{polifenoli/g} BSG secca (12gg)
Quarta prova	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	13 giorni	Beuta con tappo di vetro (SSF)	13 gg	4,6 mg _{polifenoli/g} BSG secca (13gg)
Quinta prova	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	14 giorni	Beuta con tappo di vetro (SSF)	14 gg	4,,3 mg _{polifenoli/g} BSG secca (14gg)
Sesta prova	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	10 giorni	Beuta con tappo di vetro (SSF)	10 gg	4,,5 mg _{polifenoli/g} BSG secca (10gg)
Settima prova	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	10 giorni	Beuta con tappo di vetro (SSF)	10 gg	5.0 mg _{polifenoli/g} BSG secca (10gg)

Tabella 3.35: confronto concentrazione polifenoli ottenuti dalle sperimentazioni con dati di letteratura.

4. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

In questo lavoro di tesi si è dimostrato che è possibile produrre polifenoli e laccasi a partire da Brewers' spent grain (BSG), una abbondante matrice di scarto di produzione della birra. Tali composti sono ottenuti attraverso un processo di fermentazione allo stato solido (SSF) con un ceppo di *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725. In particolare, l'utilizzo di una matrice di scarto per la produzione di polifenoli rappresenta un grande vantaggio dal punto di vista dell'economia del processo, in quanto attualmente la maggior parte di questi prodotti derivano da processi lunghi e costosi.

La BSG è stata sottoposta ad una preliminare caratterizzazione in cui sono state valutate le caratteristiche chimico-fisiche della matrice (umidità percentuale, pH, gradi Brix, contenuto proteico) ed è stata valutata la concentrazione di polifenoli totali. Per quanto riguarda questi ultimi, sono stati valutati diversi pretrattamenti della matrice (microonde, bagno ad ultrasuoni e sonda ad ultrasuoni) al fine di identificare quale di essi porta all'ottenimento della massima resa di estrazione. In tal senso, si è trovato che l'utilizzo della sonda ad ultrasuoni, ad una potenza di 580W, per un tempo totale di quindici minuti con frequenza 5s on/5s off porta ad un massimo valore di concentrazione di polifenoli totali pari a 5,8 mg_{polifenoli}/g_{BSGsecca}, e quindi ad un aumento nella resa di estrazione, rispetto alla condizione di controllo, pari al 32%.

Successivamente, sono state condotte sei prove sperimentali in cui la BSG, inoculata con il microrganismo fungino, viene inserita in microcosmi costituiti da beute Erlenmeyer di differente volume (500 mL e 1000 mL). Nel corso delle sperimentazioni, sono stati valutati i seguenti parametri: umidità percentuale, gradi Brix, pH, contenuto proteico e attività dell'enzima laccasi e concentrazione di polifenoli totali. Il sistema che ha permesso di ottenere la massima attività dell'enzima laccasi e la massima concentrazione di polifenoli totali è costituito dalla beuta Erlenmeyer (500 mL) all'interno della quale è inserita una quantità di BSG (umidità 70%) pari a 40 g, tritata manualmente mediante l'utilizzo di una lama e effettuando un inoculo in conidi. All'interno del sistema inoltre è inserita una provetta con acqua sterile (4 mL) in modo da poter mantenere un valore di umidità costante all'interno del microcosmo, e una provetta con una soluzione di NaOH 3M (8mL) per catturare la CO₂ sviluppata.

Visti i buoni risultati ottenuti tramite SSF condotta su BSG tritata, in futuro è necessario uno *scale-up* del sistema al fine di aumentare il quantitativo dei composti ad alto valore aggiunto.

Inoltre, sarà necessario attuare l'automatizzazione del sistema di triturazione mediante l'utilizzo di mulini meccanici o tamburi rotanti, in modo tale da rendere la BSG triturata in maniera più uniforme.

BIBLIOGRAFIA

- Anđela Zeko-Pivač, A. B. (2022). Improvement of the Nutraceutical Profile of Brewer's Spent Grain after Treatment with *Trametes versicolor*. *Microorganisms*, 10(11), 2295.
- Brandam, C., Meyer, X., Proth, J., Strehaiano, P., & Pingaud, H. (2003). An original kinetic model for the enzymatic hydrolysis of starch during mashing. *Biochemical Engineering Journal* 13(1), 43-52.
- Evelyn Wagner, E. S.-I. (2022). One-pot bioethanol production from brewery spent grain using the ethanologenic *Escherichia coli* MS04. *Renewable Energy*, Volume 189, Pages 717-725.
- Francesca Cuomo 1, M. C. (2022). Sustainable Re-Use of Brewer's Spent Grain for the Production of High Protein and Fibre Pasta. *Foods*, 11(5), 642.
- Hatakka, A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 13, Issue 2-3, March 1994, Pages 125–135,.
- Hofrichter, M. (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 30, Issue 4, 16 April 2002, Pages 454-466.
- Jone Ibarruri, M. C. (2022). Solid State Fermentation of Brewer's Spent Grain Using *Rhizopus* sp. to Enhance Nutritional Value. *Waste and biomass valorization*, vol. 10 3687-3700.
- José C. del Río, P. P. (2013). Chemical composition of lipids in brewer's spent grain: A promising source of valuable phytochemicals. *Journal of Cereal Science*, Volume 58, Issue 2, September 2013, Pages 248-254.
- Jovine K. Emmanuel, *. P. (2022). Evaluating the potential applications of brewers' spent grain in biogas generation, food and biotechnology industry: A review. *Heliyon*, 19;8(10).
- M. Asgher, M. A. (2006). Enhanced lignin peroxidase synthesis by *Phanerochaete Chrysosporium* in solid. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22: 449–453.
- Marina Tišma a, P. Ž.-P.-K. (2021). Optimization of Laccase Production by *Trametes versicolor* Cultivated on Industrial Waste. *Bioresource Technology*, Volume 330 124997.

- Michael Mosher, K. T. (2017). *Brewing Science: a multidisciplinary approach*. Switzerland: Sprinfer.
- Muhammad Bilal a, J. Z. (2023). Manganese peroxidases as robust biocatalytic tool — An overview of sources, immobilization, and biotechnological applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 234, 123531.
- P. Alonso-Riaño, M. S.-R. (2021). Subcritical water as hydrolytic medium to recover and fractionate the protein fraction and phenolic compounds from craft brewer's spent grain. *Food Chemistry*, Volume 351, 30 July 2021, 129264.
- R Haapala, S. L. (1993). Production of Phanerochaete chrysosporium lignin peroxidase under various culture conditions. *Applied microbiology and biotechnology*,, Volume 40, pages 494-498.
- S. Vijayalaxmi, S. K. (2015). Polyphenols from different agricultural residues: extraction, identification and their antioxidant properties. *J Food Sci Technol*, 2761-2769.
- S.I. Mussatto, G. D. (2006). Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, Volume 43, Issue 1, January 2006, Pages 1-14.
- Winfried Russ, H. M.-P. (2005). Application of spent grains to increase porosity in bricks. *Construction and Building Materials*, Volume 19, Issue 2, March 2005, Pages 117-126.