

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 Brewery Spent Grains
per la produzione di polifenoli**



Relatore

prof.ssa Francesca Bosco

Candidato

Mirela Madalina Baitanu

Marzo 2025

INDICE

1	INTRODUZIONE.....	1
1.1	Residui dell'industria birraria: le brewer's spent grains.....	1
1.1.1	Struttura del chicco d'orzo.....	1
1.1.2	Processo di generazione della BSG.....	2
1.1.3	Composizione media della BSG.....	3
1.2	Applicazioni della BSG.....	4
1.2.1	Produzione di biogas.....	4
1.2.2	Alimentazione animale.....	4
1.2.3	Alimentazione umana.....	5
1.3	Polifenoli.....	5
1.3.1	Polifenoli nella BSG.....	6
1.3.2	Applicazione dei polifenoli.....	6
1.4	Estrazione dei polifenoli.....	7
1.4.1	Pretrattamento.....	7
1.4.2	Estrazione solido /liquido.....	8
1.4.3	Estrazione assistita da ultrasuoni.....	8
1.4.4	Fermentazione allo stato solido.....	9
1.4.5	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	10
1.5	Scopo della tesi.....	11
2	MATERIALI E METODI.....	13
2.1	Origine e trattamento preliminare della BSG utilizzata.....	13
2.2	Allestimento dei microcosmi biotici e abiotici.....	13
2.2.1	Inoculo della BSG.....	16
2.3	Monitoraggio dei microcosmi.....	16
2.4	Estrazione dei polifenoli totali.....	17
2.4.1	Estrazione con solvente.....	17
2.4.2	Pretrattamento con sonda ad ultrasuoni.....	18
2.5	Determinazioni analitiche.....	18
2.5.1	Analisi della BSG.....	18
2.5.1.1	Umidità della BSG.....	18
2.5.2	Analisi dell'estratto acquoso.....	18
2.5.2.1	pH.....	18
2.5.2.2	Gradi Brix.....	18
2.5.2.3	Determinazione del D-glucosio.....	18
2.5.2.4	Determinazione delle proteine totali.....	19
2.5.2.5	Attività dell'enzima laccasi.....	19

2.5.3	Valutazione del contenuto di polifenoli totali e della capacità antiossidante	20
2.5.3.1	Analisi del contenuto di polifenoli totali.....	20
2.5.3.2	Valutazione della capacità antiossidante	20
2.6	Analisi statistica dei dati	21
3	ANALISI E DISCUSSIONE DEI RISULTATI	22
3.1	Caratterizzazione della BSG	22
3.2	SSF con <i>P. chrysosporium</i> : Prova 1	22
3.2.1	CO ₂ media cumulata e velocità di produzione della CO ₂	23
3.2.2	Umidità'	25
3.2.3	pH.....	25
3.2.4	Gradi Brix e D-glucosio	26
3.2.5	Proteine totali e attività della laccasi.....	27
3.2.6	Valutazione dei polifenoli totali (TPC)	29
3.2.7	Capacità antiossidante	31
3.3	SSF con <i>P. chrysosporium</i> : Prova 2	33
3.3.1	CO ₂ media cumulata e velocità di produzione della CO ₂	33
3.3.2	Umidità.....	35
3.3.3	pH.....	36
3.3.4	Gradi Brix e D-glucosio	36
3.3.5	Proteine totali e attività della laccasi.....	37
3.3.6	Valutazione dei polifenoli totali (TPC)	38
3.3.7	Capacità antiossidante	39
3.4	Confronto dati prova 1 e prova 2	41
3.4.1	CO ₂ media cumulata e velocità di produzione della CO ₂	41
3.4.2	D-glucosio	42
3.4.3	Proteine totali e attività della laccasi.....	43
3.4.4	Valutazione dei polifenoli totali (TPC)	43
3.4.5	Capacità antiossidante	45
4	CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE.....	47
5	ABBREVIAZIONI.....	49
6	BIBLIOGRAFIA.....	50

1 INTRODUZIONE

1.1 Residui dell'industria birraria: le brewer's spent grains

La birra, essendo la terza bevanda più consumata al mondo dopo l'acqua e il tè [1], rappresenta anche una delle principali fonti di sottoprodotti, tra cui la "brewer's spent grains" (BSG), che costituisce circa l'85% dei rifiuti generati nel processo di produzione. In particolare, si stima che per ogni 100 litri di birra prodotta, si ottengono circa 20 kg di BSG. Questo sottoprodotto, dunque, è disponibile a basso costo o addirittura gratuitamente durante tutto l'anno, ed è generato in grandi quantità sia dai birrifici di grandi dimensioni che da quelli più piccoli [2].

Questo paragrafo fornisce una descrizione dell'origine e della composizione della BSG. Inizialmente, viene descritta la struttura del chicco d'orzo che è il cereale più utilizzato nella produzione della birra. Successivamente, si offre una panoramica del processo produttivo della birra, con particolare attenzione alla formazione della BSG come sottoprodotto. Si conclude poi con la composizione media di questa materia prima.

1.1.1 Struttura del chicco d'orzo

La birra può essere prodotta a partire da una combinazione di cereali non maltati e maltati. Sebbene l'uso di fonti di amido non maltato, come orzo, riso, mais o sorgo, stia diventando sempre più comune come ingrediente aggiuntivo, la maggior parte delle birre contiene almeno il 70% di malto d'orzo (*Hordeum vulgare*), che rappresenta la principale fonte di amido nella produzione della birra a livello mondiale grazie al suo elevato contenuto di enzimi idrolitici [3]. Anche il frumento (*Triticum aestivum*) e il sorgo (*Sorghum vulgare*) vengono maltati in quantità significative, soprattutto in Africa, mentre in misura minore si utilizzano anche segale (*Secale cereale*), avena (*Avena sativa*) e miglio (di varie specie) [4].

Come si nota in Figura 1.1 il chicco d'orzo è costituito da tre parti: l'embrione (comprendente lo scutello), l'endosperma (che include lo strato aleuronico e l'endosperma amidaceo), e il rivestimento esterno. Quest'ultimo può essere suddiviso in tre frazioni: il tegumento seminale (testa), che rappresenta lo strato più interno che circonda l'aleurone; sopra il tegumento seminale si trova il pericarpo, che a sua volta è ricoperto dalla glumella [2].

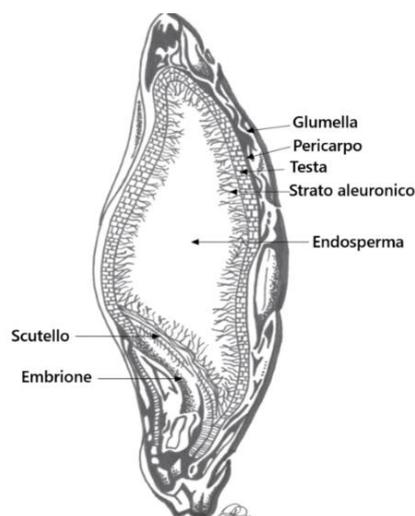


Figura 1.1 Rappresentazione della sezione trasversale di un chicco d'orzo tratta da [5] con modifiche

1.1.2 Processo di generazione della BSG

L'amido è il componente più importante nel chicco d'orzo costituendo circa il 62-65% del suo peso secco [3]. Tuttavia, tale polisaccaride non è direttamente fermentescibile dai lieviti. Per renderlo utilizzabile, l'orzo viene sottoposto a maltazione, un processo che ne permette la trasformazione in malto attraverso tre fasi controllate: macerazione, germinazione ed essiccazione. Durante questo processo si attivano e si sintetizzano enzimi fondamentali, che nella successiva fase di ammostamento scompongono i componenti del malto, rendendoli disponibili per la fermentazione.

Durante la macerazione, i chicchi di orzo puliti vengono immersi in serbatoi con acqua a una temperatura compresa tra 5 e 18 °C per circa 2 giorni, fino a raggiungere un contenuto di umidità tra il 42 e il 48%.

Una volta idratati, i chicchi vengono disposti in uno strato sottile, in apposite camere a temperatura controllata. Qui, a contatto con un flusso d'aria umida, iniziano a germogliare sviluppando una radichetta all'estremità inferiore della cariosside. Questa fase di germinazione favorisce la sintesi e l'attivazione degli enzimi nell'aleurone e nell'endosperma, inclusi amilasi, proteasi, β -glucanasi e altri enzimi che modificano la struttura dell'endosperma.

Se il processo proseguisse, si svilupperebbe una nuova pianta di orzo. Per evitare ciò, la germinazione viene interrotta prima che il germoglio emerga, sottoponendo il malto verde a un'essiccazione controllata. Questo passaggio non solo blocca la crescita, ma favorisce anche lo sviluppo delle sostanze aromatiche.

La prima fase che viene effettuata in birrificio è la miscelazione di diversi malti nelle quantità definite dal tipo di birra che si vuole produrre [2].

Una volta effettuata la miscela questa viene convogliata al molino dove viene macinata. Il processo di molitura ha lo scopo di separare il rivestimento esterno dall'endosperma e di esporre l'amido interno facilitando l'accesso agli enzimi durante la fase successiva di ammostamento [6]. Tuttavia, la macinazione non deve essere eccessiva in modo da mantenere intatto il rivestimento esterno del chicco poiché queste parti si sono rivelate un ottimo coadiuvante per la filtrazione, che seguirà la fase di ammostamento. Una macinazione eccessiva porta ad avere una diminuzione della porosità del letto filtrante con un più rapido intasamento dello stesso e una riduzione della resa poiché l'amido rimane intrappolato [3].

Nel birrificio, i cereali macinati vengono miscelati con acqua nella vasca di ammostamento, dove la temperatura viene gradualmente aumentata. Durante questo processo gli enzimi presenti nel malto idrolizzano l'amido convertendolo in zuccheri fermentescibili come il maltosio e in zuccheri non fermentescibili (destrine), mentre le proteine vengono parzialmente degradate in polipeptidi e amminoacidi [2].

Questa fase di conversione enzimatica produce un liquido noto come mosto. La parte insolubile e non degradata dei cereali maltati si deposita formando un letto filtrante attraverso il quale il mosto viene filtrato. Il mosto filtrato diventa poi il substrato per la fermentazione nella produzione della birra, mentre la frazione solida residua costituisce le trebbie (Brewers' Spent Grain, BSG) [2].

La Figura 1.2 mostra una rappresentazione schematica del processo che porta alla produzione delle trebbie.

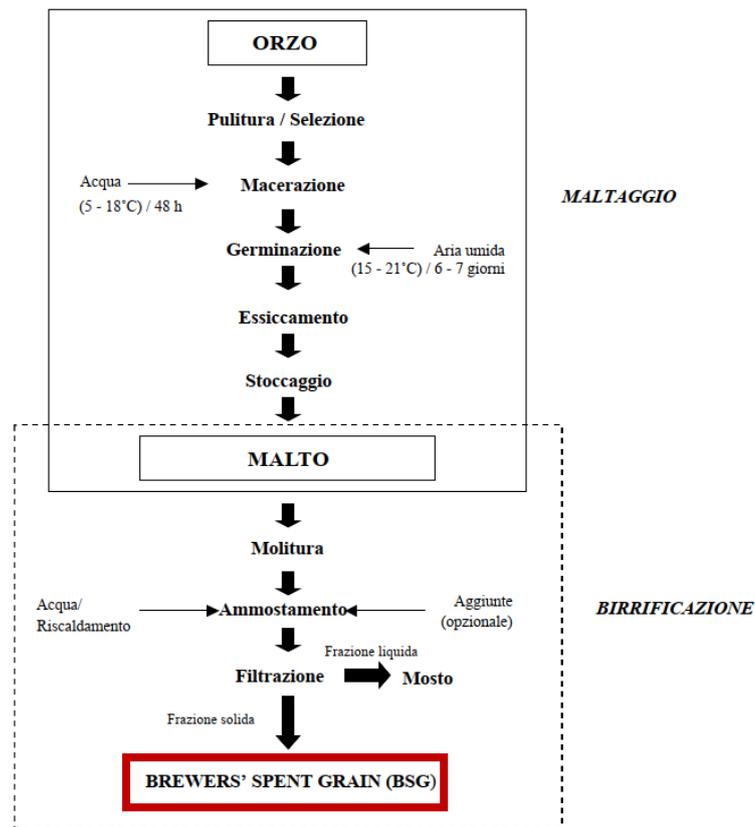


Figura 1.2 Rappresentazione del processo che porta alla produzione della BSG a partire dall'orzo, tratta da [1] e modificata.

1.1.3 Composizione media della BSG

La BSG è composta principalmente dal tegumento seminale (testa), dal pericarpo e dalla glumella, che avvolgono il chicco d'orzo. In quantità minori, può contenere frazioni di endosperma e residui non trasformati in zuccheri solubili durante l'ammostamento [7].

La sua composizione varia in base alla tipologia e alla qualità del malto, così come alle condizioni di maltazione e ammostamento. Tuttavia, in generale, la BSG è ricca di fibre, tra cui cellulosa, emicellulosa e lignina (macromolecola polifenolica) ma anche di proteine e lipidi come riportato in Tabella 1.1.

Tabella 1.1 Composizione media della BSG [8]

Composizione chimica BSG	
Componente	Quantità [g/100g]
Emicellulosa	25
Cellulosa	22
Proteine	23
Lignina	18
Lipidi	10
Ceneri	2
Composti fenolici	0.7-2.0

1.2 Applicazioni della BSG

La BSG viene impiegata come materiale per diverse applicazioni a causa della sua composizione chimica, del suo basso costo e della sua grande disponibilità. In questo paragrafo si discutono le principali applicazioni della BSG. Circa il 70% della BSG viene impiegata come mangime per il bestiame, mentre il 10% è usato nella produzione del biogas e il restante 20% viene smaltito in discarica. A causa del suo profilo nutrizionale la BSG è stata recentemente impiegata in prodotti alimentari destinati al consumo umano [9].

1.2.1 Produzione di biogas

La BSG, ricca di polisaccaridi cellulósici e non cellulósici, può essere usata come materiale per la produzione di biocombustibili contribuendo alla riduzione del consumo di combustibili fossili. Il biogas, un biocombustibile ottenuto tramite digestione anaerobica di materiale organico ad opera di colture microbiche miste, è composto per il 55-65% da metano, 30-45% da anidride carbonica, e da tracce di altri gas come azoto e ossigeno [10].

Molti materiali organici di scarto possono essere utilizzati come materiale di partenza per la produzione di biometano. Tuttavia, il problema principale riguarda la loro composizione variabile e il fatto che possano contenere plastiche; invece, la BSG rappresenta un materiale organico omogeneo [11]. Autori come Vitanza et al. [12] hanno riportato che l'utilizzo della BSG come substrato ha prodotto il 52.4% di metano nel biogas raggiungendo una produzione specifica di metano di 0.284 L di CH₄ per g di COD. Ezeoenu et al. [13] hanno registrato una produzione di 3476 cm³ di biogas per 100 g BSG dopo 15 giorni con un contenuto di metano pari al 66%. Nonostante ciò, la degradazione della cellulosa e dell'emicellulosa rappresenta lo step limitante nella produzione di biogas. A tal fine, sono stati studiati diversi pretrattamenti, che però comportano un'elevata richiesta energetica e l'utilizzo di reagenti economicamente e ambientalmente insostenibili.

Per superare queste limitazioni, Cater et al. [14] hanno analizzato l'effetto del bioaumento, un processo che prevede l'aggiunta di microrganismi alla comunità microbica già presente nel digestore anaerobico. Questi batteri sono in grado di scomporre i polimeri complessi della biomassa, come cellulosa, emicellulosa e lignina, trasformandoli in composti più semplici, favorendone la degradazione e la produzione di biogas. Tra tutti i microrganismi analizzati, *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5T ha consentito un aumento della produzione di metano del 17.8%.

1.2.2 Alimentazione animale

La BSG, a causa del suo elevato contenuto di proteine e fibre, può essere usata come additivo nei mangimi per pesci, mucche e pollame. Kaur e Saxena [15] hanno valutato la possibilità di sostituire la crusca di riso nell'alimentazione di diverse specie di pesci e i risultati hanno dimostrato che i pesci nutriti con il 30% di BSG mostrano un maggiore aumento di peso corporeo rispetto ai pesci nutriti esclusivamente con la crusca di riso. Nazzaro et al [16] confermano che l'inclusione del 20-30% di BSG è adatta per l'alimentazione sia di pesci di acqua salata (*Sparus aurata*) che di acqua dolce (*Oncorhynchus mykiss*) con una digeribilità che può raggiungere l'88% per entrambe le specie.

Inoltre, quando la BSG viene inserita nell'alimentazione delle mucche si ha un aumento nella resa di latte e dei solidi totali (grassi, proteine, lattosio e sali minerali) senza

1.3.1 Polifenoli nella BSG

L'orzo e il malto da esso derivato sono di grande interesse per il loro elevato contenuto di composti fenolici, tra cui acidi benzoici e cinnamici, proantocianidine, tannini e flavonoidi, in forma libera o legata [22]. Poiché questi composti si trovano principalmente nel rivestimento del chicco d'orzo, la BSG rappresenta una fonte preziosa di polifenoli ad elevato valore aggiunto [2].

I materiali lignocellulosici, tra cui la BSG, sono costituiti da cellulosa, emicellulosa e lignina. Quest'ultima è una macromolecola polifenolica che fornisce rigidità strutturale alle pareti cellulari della pianta e funge da collante tra l'emicellulosa e la cellulosa. Questa macromolecola è ricca di acidi fenolici, tra cui gli acidi idrossicinnamici. I più abbondanti nella BSG sono l'acido ferulico (FA) e l'acido p-cumarico (p-CA), seguiti in quantità minori dagli acidi sinapico, caffeico e siringico. Tuttavia, il contenuto specifico di questi composti varia a seconda del tipo di malto utilizzato e del processo produttivo adottato [23].

Un aspetto rilevante riguarda l'influenza del grado di tostatura del malto sul contenuto di polifenoli nella BSG. I malti chiari, sottoposti a tostatura moderata, tendono a mantenere concentrazioni più elevate di polifenoli rispetto ai malti scuri, che subiscono una tostatura più prolungata e ad alte temperature, causando una riduzione significativa di questi composti. Ad esempio, in uno studio [24], la quantità totale di FA e p-CA negli estratti di BSG chiari è risultata circa doppia rispetto a quella degli estratti scuri. Questa minore concentrazione nei malti scuri può essere attribuita a due fattori principali: la formazione di melanoidine, che intrappolano i polifenoli nella loro struttura, e la degradazione termica degli acidi idrossicinnamici a temperature più elevate.

Infine, è importante considerare che i fitocomposti presenti nella BSG sono legati covalentemente alla lignina attraverso legami estere. Questa caratteristica strutturale deve essere tenuta in considerazione nella progettazione di strategie di estrazione efficaci per il recupero dei polifenoli [23].

1.3.2 Applicazione dei polifenoli

Gli antimicrobici e antiossidanti sintetici sono stati associati ad una possibile tossicità, cancerogenicità e a problemi di salute. Di conseguenza, si è verificato un rapido spostamento dell'orientamento dei consumatori e dell'industria verso l'uso di antimicrobici e antiossidanti derivati da fonti naturali, come i polifenoli estratti da matrici vegetali [25].

Salute umana

I polifenoli sono ampiamente riconosciuti per i loro effetti benefici sulla salute umana grazie alle loro potenti proprietà antimicrobiche, immunomodulanti, antiipertensive, anticancro e antiinfiammatorie. I polifenoli grazie alle loro proprietà antiossidanti riescono a neutralizzare le specie reattive dell'ossigeno (ROS), che vengono prodotte durante i processi metabolici e che sono responsabili dello stress ossidativo, una condizione alla base di numerose malattie. La protezione del DNA è un altro importante effetto di questi composti, poiché riducono i danni ossidativi e le mutazioni, diminuendo il rischio di malattie come il cancro. [25] A tale proposito, lo studio di Crowley [26] ha evidenziato come gli estratti fenolici derivati dalla BSG offrano una protezione significativa contro lo stress ossidativo, dimostrando una forte capacità di preservare il DNA dai danni ossidativi indotti dal perossido di idrogeno sulle cellule, *in vitro*.

Oltre a queste proprietà antiossidanti, i polifenoli si distinguono per le loro capacità antimicrobiche. In risposta alla crescente resistenza agli antibiotici, essi offrono

un'alternativa naturale, contrastando non solo batteri, ma anche proteggendo contro i virus, come il SARS-CoV-2. I polifenoli si legano infatti ai recettori virali, impedendo l'ingresso del virus nell'ospite [25].

Industria cosmetica

Negli ultimi anni, i consumatori hanno manifestato una crescente preferenza per ingredienti naturali nella formulazione di prodotti, spingendo diverse industrie, tra cui quella cosmetica, a cercare alternative agli ingredienti sintetici o non sostenibili. In questo contesto, l'uso di composti fenolici estratti dalla BSG nei cosmetici ha dimostrato di possedere proprietà schiarenti per la pelle e un'efficace azione antiossidante *in vivo* [27]. Questi composti aiutano a proteggere la pelle dai danni causati dai radicali liberi, come quelli derivanti dai raggi UV, che accelerano l'invecchiamento cutaneo. Inoltre, i polifenoli possono inibire l'enzima tirosinasi, responsabile della produzione di melanina, il pigmento che colora la pelle, riducendo così la produzione di melanina e proteggendo la pelle dall'iperpigmentazione [27].

Uno studio [27], ha esaminato l'addizione di composti fenolici, ottenuti mediante estrazione in acqua della BSG, in prodotti per la cura della pelle, valutando sia l'inibizione della tirosinasi che l'attività antiossidante. I risultati hanno mostrato una correlazione positiva tra la concentrazione di composti fenolici e l'attività antiossidante; inoltre, all'aumentare della concentrazione di composti fenolici, aumentava anche la percentuale di inibizione della tirosinasi.

Industria alimentare

Nel campo alimentare, i polifenoli sono apprezzati principalmente per le loro capacità antiossidanti che aiutano a prevenire l'ossidazione dei lipidi nei cibi, come nel pesce e nei frutti di mare [25].

Inoltre, i polifenoli possono essere incorporati all'interno di imballaggi attivi, che rilasciano questi composti intenzionalmente nel cibo per preservare gli alimenti da numerose specie batteriche deterioranti. Per esempio, è stato creato un imballaggio bioattivo a base di amido e pectina di agrumi che è stato funzionalizzato con sottoprodotti di *Acca sellowiana* (ricchi di composti fenolici). L'imballaggio ha mostrato attività antimicrobica contro *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa* [28].

Il crescente interesse verso i composti antiossidanti, quindi, ha portato allo sviluppo di numerose tecnologie in grado di estrarre questi composti preservandone le loro proprietà biologiche e antiossidanti.

1.4 Estrazione dei polifenoli

L'estrazione dei composti fenolici dalla BSG avviene attraverso le seguenti fasi principali: pretrattamento, estrazione, isolamento e purificazione. Tra queste, le prime due risultano fondamentali, in quanto influenzano significativamente la resa del processo [23].

1.4.1 Pretrattamento

Il pretrattamento della BSG svolge un ruolo chiave nella degradazione della matrice lignocellulosica, rendendo il materiale più accessibile ai solventi grazie alla rottura del materiale cellulare, ottimizzando l'efficienza dell'estrazione [23]. Le fasi di pretrattamento possono prevedere processi meccanici come macerazione, macinazione e omogeneizzazione del materiale, fino ad ottenere una dimensione delle particelle ottimale

che migliori l'accessibilità dei solventi alle strutture della parete cellulare. [23] Anche l'essiccazione del materiale può essere utile per aumentare la resa di estrazione. [29]

1.4.2 Estrazione solido /liquido

Per quanto riguarda l'estrazione dei composti fenolici, esistono diverse tecniche, quella più comune è l'estrazione solido/liquido, un metodo chimico apprezzato per la sua semplicità di utilizzo e l'ampia applicabilità [30]. Numerosi fattori, quali la composizione del solvente, la temperatura di estrazione e il rapporto solvente/solido, influenzano notevolmente l'efficienza del processo, il contenuto fenolico e l'attività antiossidante [31]. Diversi studi hanno esaminato l'efficacia di vari solventi, come metanolo, etanolo, acetone, esano, acetato di etile, acqua, e le loro miscele con l'acqua. Tuttavia, gli acidi fenolici particolarmente polari, come l'acido benzoico e l'acido cinnamico, non possono essere completamente estratti con solventi organici puri, per cui si raccomanda di utilizzare miscele di solventi organici con acqua per ottimizzare l'estrazione [23]. Tra tutti i solventi l'etanolo è considerato meno tossico rispetto agli altri e consente di recuperare composti fenolici con buone caratteristiche qualitative [32].

1.4.3 Estrazione assistita da ultrasuoni

Recentemente, sono state sviluppate metodologie innovative, tra cui l'estrazione assistita da ultrasuoni (UAE), una tecnica fisica efficace e sostenibile per il recupero di composti fenolici da sottoprodotti agroalimentari. Questa tecnica sfrutta vibrazioni meccaniche generate da onde sonore con frequenze superiori a 20 kHz. Le onde sonore si propagano attraverso il mezzo e causano cicli di compressione e decompressione che generano bolle di cavitazione nel solvente. Quando queste bolle implodono sulla superficie dei solidi, si creano temperature, pressioni e forze di taglio intense che rompono le pareti cellulari, come mostrato in Figura 1.4, portando alla separazione della lignina dalla cellulosa e dall'emicellulosa. Inoltre, tale processo facilita la depolimerizzazione della lignina in frammenti più piccoli, facilitando l'ingresso del solvente all'interno delle cellule e migliorando il trasferimento di massa dei composti fenolici attraverso le pareti cellulari [33] [34].

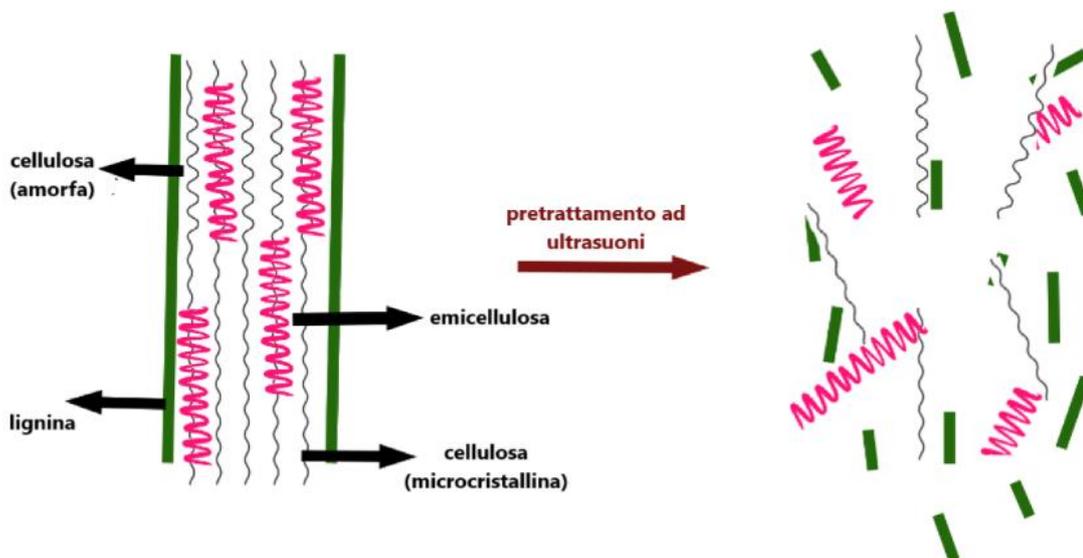


Figura 1.4 Meccanismo del pretrattamento ad ultrasuoni tratto da [34] con modifiche

L'efficienza dell'UAE può essere ulteriormente potenziata combinandola con metodi chimici, come l'estrazione con solvente, permettendo di ottimizzare la resa estrattiva e di ridurre il consumo di solventi [30]. L'UAE può essere eseguita in due configurazioni principali: bagno ad ultrasuoni e sonda ad ultrasuoni (US) come si vede in Figura 1.5 [34].

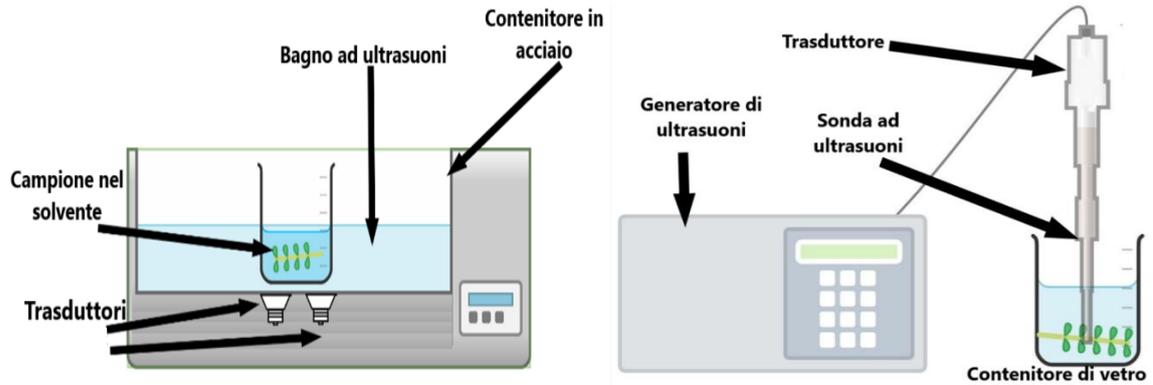


Figura 1.5 Rappresentazione del bagno ad ultrasuoni a) e della sonda ad ultrasuoni b) tratto da [34] con modifiche

Tuttavia, uno studio [35] ha riportato che, prima di procedere con l'estrazione con solvente, il pretrattamento della BSG triturrata con US ha permesso di ottenere un contenuto di polifenoli totali superiore del 31% rispetto a quello della BSG triturrata e pretrattata con bagno ad ultrasuoni, confermando la maggiore efficacia del pretrattamento con sonda.

Lo studio di Carchiochi et al. [31] ha dimostrato che l'impiego di una sonda ad ultrasuoni insieme all'estrazione con solvente accelera il processo, migliorando l'efficacia dell'estrazione e riducendone i tempi usando un rapporto liquido/solido di 30:1 mL/g, una temperatura di 80°C e una concentrazione di etanolo del 72%. Analogamente, Alonso et al. [36] hanno riportato un'elevata efficienza nell'estrazione dei polifenoli totali attraverso un trattamento UAE tramite sonda della durata di 30 minuti, utilizzando acqua come solvente e impulsi di 5 secondi a 20 kHz, ad una temperatura di 47°C.

1.4.4 Fermentazione allo stato solido

La fermentazione allo stato solido (SSF) si è dimostrata un processo eco-sostenibile ed efficace per il rilascio di composti bioattivi da matrici alimentari complesse, come i sottoprodotti dei cereali. Tra i vantaggi principali vi sono il basso consumo di energia, la ridotta produzione di acque reflue e l'impiego di scarti agroindustriali come substrati, contribuendo così alla riduzione dell'impatto ambientale [37].

Nel caso della BSG, la scomposizione di emicellulosa, cellulosa e lignina può essere necessaria per facilitare il rilascio di composti ad alto valore aggiunto, come i polifenoli legati alla lignina, migliorandone la resa di estrazione. Tuttavia, questo processo richiede l'azione di diversi enzimi extracellulari prodotti da microrganismi, che svolgono un ruolo chiave nella biotrasformazione della matrice solida. La BSG rappresenta quindi un potenziale substrato da utilizzare efficacemente nella SSF come supporto e come fonte di carbonio e nutrienti per microrganismi in grado di solubilizzarne i componenti, tra cui i polifenoli legati alla lignina [38]. Diversi microrganismi possono essere utilizzati, tra cui

lieviti e batteri, ma i funghi ligninolitici sono particolarmente adatti grazie alla somiglianza tra le caratteristiche della BSG e il loro habitat naturale [39]. Questi funghi, infatti, crescono naturalmente sulla corteccia degli alberi, dove degradano materiali lignocellulosici grazie alla loro capacità di produrre enzimi ligninolitici in grado di idrolizzare i principali componenti della parete cellulare delle piante, ovvero cellulosa, emicellulosa e lignina [40]. È importante notare che la maggior parte dei processi di fermentazione allo stato solido coinvolge organismi aerobi, pertanto, il termine “fermentazione” non implica necessariamente l’uso di percorsi metabolici fermentativi da parte del microrganismo [39].

Il pretrattamento della BSG, come già discusso nel paragrafo 1.4.1, è fondamentale non solo per ottimizzare l'estrazione dei composti bioattivi, ma anche per migliorare l'efficacia della fermentazione. La triturazione della BSG gioca un ruolo chiave, poiché particelle di dimensioni ridotte offrono una maggiore area superficiale per l’attacco fungino, favorendo così il processo. Tuttavia, particelle eccessivamente piccole possono ostacolare la crescita del fungo, limitando la diffusione dell’ossigeno all'interno del substrato, e quindi riducendo la disponibilità di ossigeno per il metabolismo del fungo. Per questo motivo, è preferibile impiegare substrati solidi con una distribuzione eterogenea delle dimensioni delle particelle, in modo da bilanciare accessibilità e aerazione [25].

In quest’ottica, diversi studi hanno evidenziato l'efficacia della SSF nel migliorare il rilascio di composti bioattivi dalla BSG. Per esempio, in un lavoro [38] cinque ceppi di funghi filamentosi sono stati usati su diversi tipi di BSG per valutare il rilascio di composti fenolici, evidenziando come il tipo di malto eserciti un’influenza sulla fermentazione causando un diverso profilo polifenolico. Tra tutti i ceppi *Aspergillus oryzae* è stato quello più efficiente con una produzione di 8.45 ± 0.66 mg GAE/g dopo soli 3 giorni di fermentazione.

In un altro studio Ibaburri et al. [41] hanno osservato che, dopo 196 ore di fermentazione con *Rhizopus* e utilizzando l'acqua come solvente di estrazione, il contenuto di polifenoli totali risultava 9 volte superiore rispetto alla BSG non fermentata, raggiungendo una concentrazione di 2043 ± 114 µg GAE/g DM. Inoltre, è stata registrata una capacità antiossidante, espressa come percentuale di riduzione del DPPH, pari al $52.0 \pm 4.7\%$.

Tisma et al. [42] hanno usato *Trametes versicolor* per la fermentazione allo stato solido della BSG per produrre laccasi e aumentare il contenuto di polifenoli estratti. La massima attività dell’enzima laccasi (560 U/L) è stata raggiunta dopo 7 giorni di fermentazione. Dopo 14 giorni, l'estrazione dei polifenoli è aumentata di 3.4 volte rispetto alla BSG non trattata.

Infine, *Fusarium oxysporum* è stato impiegato sulla BSG triturata per idrolizzare i legami tra la cellulosa, l’emicellulosa e i gruppi carbossilici degli acidi fenolici provocando il rilascio dei polifenoli legati incrementando la produzione di polifenoli totali nelle prime 48 ore di fermentazione [43].

1.4.5 *Phanerochaete chrysosporium*

Come si vede dalla Figura 1.6, il microrganismo utilizzato nel presente lavoro di tesi è *Phanerochaete chrysosporium*, un fungo del marciume bianco appartenente al phylum dei Basidiomiceti. I funghi del marciume bianco sono in grado di depolimerizzare la lignina e metabolizzarla trasformandola in CO₂ e H₂O. Questi funghi sono capaci di decomporre tutti i principali polimeri del legno: cellulosa, emicellulosa e lignina, grazie alla produzione di enzimi ossidativi extracellulari [40].

La degradazione della lignina avviene attraverso un processo ossidativo, reso possibile dall'azione di tre enzimi chiave: la laccasi, la lignina perossidasi (LiP) e la perossidasi manganese dipendente (MnP) [44].

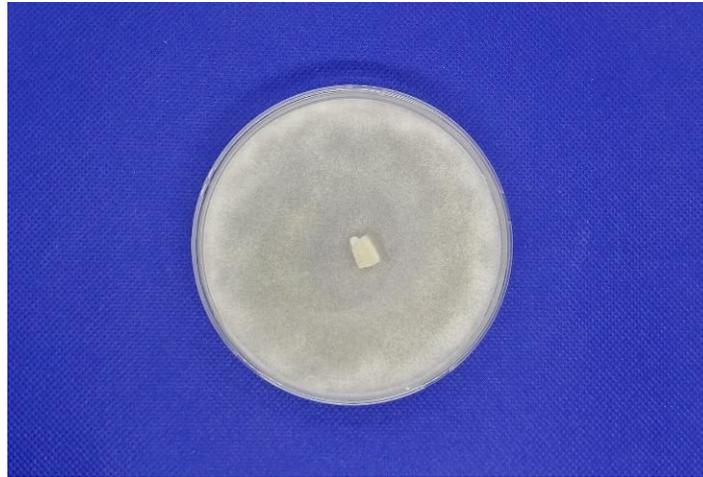


Figura 1.6 *P.chrysosporium* su piastra di Petri

1.5 Scopo della tesi

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è la valorizzazione della Brewers' Spent Grain (BSG), un sottoprodotto dell'industria della birra, nell'ottica dell'economia circolare. In particolare, si è studiata l'estrazione di composti polifenolici dalla BSG tritata attraverso una miscela di acqua/etanolo (50:50, v/v), adottando due tipologie di pretrattamenti volti al miglioramento della quantità di polifenoli totali estratti:

- Un pretrattamento biologico tramite fermentazione allo stato solido (SSF) con *P. chrysosporium*, che grazie agli enzimi da esso prodotti, degrada la lignina e rende i polifenoli più accessibili
- Un pretrattamento fisico con sonda ad ultrasuoni (US) che, grazie alle onde sonore ad alta frequenza, genera intense forze di taglio che inducono la disgregazione del materiale, facilitando così l'estrazione dei polifenoli

L'efficacia dei pretrattamenti, singoli o combinati, viene valutata estraendo i polifenoli totali (TP) con una miscela acqua/etanolo (50:50, v/v).

Nel presente lavoro di tesi, sono state eseguite due prove sperimentali, denominate rispettivamente Prova 1 e Prova 2, con l'obiettivo di valutare e ottimizzare la crescita della biomassa fungina sulla BSG. Entrambe le prove sono state condotte utilizzando due tipi di microcosmi: biotici (inoculati con conidi di *P. chrysosporium*) e abiotici (senza inoculo), all'interno di beute Erlenmeyer da 500 mL chiuse con tappo di vetro e contenenti 40 g di BSG tritata manualmente tramite mezzaluna.

Per cercare di ottimizzare il metabolismo fungino, nella Prova 1, sono stati aggiunti micronutrienti (Basal III medium) alla BSG, mentre nella Prova 2 è stata addizionata acqua distillata usando però un'aerazione più frequente (ogni 24 h ad eccezione del fine settimana).

Nel corso delle SSF, sono stati monitorati il contenuto di polifenoli totali (TPC), la loro capacità antiossidante (CA), la produzione di CO₂, l'umidità, le proteine totali, l'attività dell'enzima laccasi, il pH, i gradi Brix e la concentrazione di D-glucosio.

2 MATERIALI E METODI

2.1 *Origine e trattamento preliminare della BSG utilizzata*

La BSG utilizzata nel seguente lavoro di tesi è stata fornita da un produttore di birra locale nel Piemonte (Italia) derivante dalla produzione di una birra Pilsner (50 % malto Pilsner, 20% malto Cara Ruby ,15% malto Pale Ale, 15% Fiocchi d'avena). La BSG umida viene conservata a -20°C e al momento del suo utilizzo viene scongelata a temperatura ambiente. La BSG usata per allestire i microcosmi è tritata manualmente tramite mezzaluna per ottenere frammenti dalla dimensione di circa 5 mm e caratterizzata in termini di umidità, pH, gradi Brix, concentrazione di D-glucosio, proteine totali, quantitativo di polifenoli totali e capacità antiossidante come viene descritto nei paragrafi 2.4 e 2.5.

2.2 *Allestimento dei microcosmi biotici e abiotici*

Nel seguente lavoro di tesi sono state condotte due SSF indicate rispettivamente come prova 1 e prova 2. Come mostrato in Figura 2.1, in ciascuna prova si sono allestiti una serie di microcosmi biotici e abiotici (di controllo). Tutti i microcosmi sono costituiti da beute Erlenmeyer da 500 mL, chiuse con tappo di vetro e riempite con 40 g di BSG tritata tramite mezzaluna.

La BSG tritata (40 g) è stata sterilizzata, in autoclave a 121°C e 2 atm per 20 min, direttamente all'interno dei microcosmi, prima dell'allestimento delle prove sperimentali, avvenuto in condizioni di sterilità.

Sia nei microcosmi biotici che abiotici, per poter garantire l'umidità necessaria al fungo, viene appesa al collo della beuta una provetta contenente 4 mL di acqua distillata sterile. Viene anche inserita una seconda provetta con 8 mL di NaOH 3 M per la cattura della CO₂ come descritto nel paragrafo 2.3.

Nella prova 1, nei microcosmi sia abiotici che biotici, si sono aggiunti 2 mL di acqua o 2 mL di Basal III medium che ha la composizione riportata in Tabella 2.2, per un totale di quattro linee sperimentali, di cui due linee di controllo(una addizionata di acqua e una di Basal III medium) e altre due linee biotiche(una addizionata di acqua e una di Basal III medium).

I microcosmi biotici, inoltre, contengono 3 mL della soluzione di inoculo mentre quelli abiotici 3 mL di acqua. All'inizio di ciascuna prova (t₀) e durante la fermentazione (3, 6, 8, 10, 13, 15, 20 e 24gg) si procede ad aerare i microcosmi tramite il sistema in Figura 2.2 sotto cappa biohazard insufflando aria sterile e umida a 0.98 bar per 5 min.

La durata della prova 1 è di 29 giorni,

Nella prova 2 i microcosmi biotici e abiotici vengono addizionati con 2 mL di acqua distillata sterile, avendo così due linee sperimentali. Inoltre, come per la prova 1, i microcosmi biotici contengono 3 mL di sospensione di inoculo, sostituiti da 3 mL di acqua nei campioni abiotici. I microcosmi vengono aerati ogni 24 ore, ad eccezione dei fine settimana, durante i quali l'intervallo tra le aerazioni è stato di 72 ore.

Anche questa prova ha avuto una durata complessiva di 29 giorni.

Sia per la prova 1 che per la 2, tutti i microcosmi sono stati mantenuti alla temperatura controllata di 30°C.

Durante lo svolgimento delle prove vengono condotti dei sacrifici, prelevando, in giorni prestabiliti, la BSG fermentata dai microcosmi biotici e la BSG di controllo dai microcosmi abiotici per effettuare le analisi descritte nei paragrafi 2.4 e 2.5. Per la prima prova, i sacrifici sono stati effettuati al t0 e dopo 7, 10, 15, 21 e 29 giorni dall'inizio, mentre per la prova 2 al t0 e dopo 4, 7, 10, 15, 21 e 29 gg giorni dall'inizio. La Tabella 2.1 riassume le principali caratteristiche dei microcosmi allestiti per la prova 1 e la prova 2.



Figura 2.1 Allestimento microcosmi chiusi con tappo di vetro con BSG triturrata



Figura 2.2 Sistema per l'aerazione dei microcosmi

Tabella 2.1 Allestimento microcosmi prova 1 e prova 2

PROVA 1				
	Microcosmi abiotici		Microcosmi biotici	
	Controllo acqua	Controllo B _{III} M	Campione acqua	Campione B _{III} M
Beuta	Erlenmeyer 500mL			
BSG	40 g			
Acqua nella provetta	4 mL			
Soluzione NaOH nella provetta	NaOH 3 M (8 mL)			
Aggiunta di acqua o Basal III medium alla BSG	Acqua (2 mL)	B _{III} M (2mL)	Acqua (2 mL)	B _{III} M (2mL)
Inoculo	Acqua (3 mL)		Inoculo standardizzato (3mL)	
Temperatura	30°C			
Durata prova	29 gg			
Sacrificio	t0,7,10,15,21, e 29 gg dall'inizio della prova			
Aerazione	Al t0 e dopo 3, 6, 8, 10, 13, 15, 20, 24 gg dall'inizio della prova			
PROVA 2				
	Microcosmi abiotici		Microcosmi biotici	
Beuta	Erlenmeyer 500mL			
BSG	40 g			
Acqua nella provetta	4 mL			
Soluzione NaOH nella provetta	NaOH 3 M (8 mL)			
Aggiunta di acqua alla BSG	Acqua (2mL)			
Inoculo	Acqua (3mL)		Inoculo standardizzato (3mL)	
Temperatura	30°C			
Durata prova	29 gg			
Sacrificio	t0,4,7,10,15, 21 e 29 gg dall'inizio della prova			
Aerazione	Al t0 e dopo 1,2,3,4, 7,8,9,10,11,14,15,16,17,18,21,22,23,24,25,28 e 29 gg dall'inizio della prova			

Tabella 2.2 Composizione Basal III Medium e del Trace Elements

BASAL III MEDIUM (1000 mL)		TRACE ELEMENTS (1000 mL)	
Trace elements	100 mL	MgSO ₄ (7H ₂ O)	3.000 g
KH ₂ SO ₄ (7H ₂ O)	20.00 g	MnSO ₄ (H ₂ O)	0.560 g
MgSO ₄ (7H ₂ O)	10.24 g	NaCl	1.000 g
CaCl ₂	1 g	FeSO ₄ (7H ₂ O)	0.100 g
		CoCl ₂ (6H ₂ O)	0.100 g
		ZnSO ₄ (7H ₂ O)	0.100 g
		CuSO ₄ (5H ₂ O)	0.100 g
		AlK(SO ₄) ₂ (12H ₂ O)	0.010 g
		H ₃ BO ₃	0.010 g
		Na ₂ MoO ₄ (2H ₂ O)	0.010 g
		Ac.nitriloacetico NTA	1.500 g

2.2.1 Inoculo della BSG

Il fungo *P.chrysosporium* MUCL 19343 viene mantenuto a +4°C su piastre di Petri contenenti il terreno Malt Extract Agar (MEA), che ha la seguente composizione: D+ Glucosio 20 g/L, Estratto di malto 20 g/L, Peptone batteriologico 2 g/L, Agar 20 g/L. A partire da queste colonie si inoculano, tramite tondino di micelio (Ø =5 mm), nuove piastre MEA che verranno incubate a 39°C per 72 h prima del loro utilizzo.

Per la preparazione dell'inoculo, i conidi vengono portati in sospensione aggiungendo acqua distillata sterile e grattando delicatamente la superficie del micelio con un'ansa. La sospensione viene filtrata con garza. Questa procedura ha lo scopo di rimuovere eventuali residui di agar e la maggior parte delle ife, producendo un inoculo composto principalmente da conidi.

La standardizzazione della sospensione si ottiene valutando l'assorbanza a 600 nm tramite spettrofotometro e diluendo il campione in modo che l'OD_{600 nm} sia compreso tra 0.8 e 1. L'inoculo sulla BSG triturrata e sterilizzata nelle beute avviene dispensando, in maniera uniforme, 3 mL di sospensione standardizzata di conidi.

2.3 Monitoraggio dei microcosmi

Per valutare la crescita fungina nei microcosmi biotici, si esegue un'analisi per valutare la quantità di CO₂ prodotta dal metabolismo fungino. L'analisi è effettuata negli stessi giorni in cui si effettua l'aerazione (indicati in Tabella 2.1). La velocità di produzione della CO₂ viene utilizzata come indicatore dell'attività microbica, poiché il metabolismo fungino porta al rilascio di anidride carbonica. La determinazione della CO₂ si basa sul suo assorbimento nella soluzione alcalina di NaOH (3 M) e la successiva determinazione della sua concentrazione tramite la titolazione della soluzione alcalina che non ha reagito con l'anidride carbonica [45]. L'acqua usata per preparare la soluzione di NaOH deve andare incontro a decarbonatazione e perciò viene fatta bollire per 1 ora. Dopo il raffreddamento, a temperatura ambiente, viene aggiunta la soda in modo da avere una soluzione 3M e si procede quindi a dispensare 8 mL, usando una pipetta sierologica, all'interno di una provetta appesa al collo della beuta Erlenmeyer. La soluzione di NaOH è dispensata nella provetta immediatamente al termine dell'aerazione.

Per la titolazione, la soluzione di NaOH viene prelevata dal microcosmo e inserita in un becher da 50 mL andando ad aggiungere una soluzione satura di cloruro di bario (BaCl_2 400 g/L) e qualche goccia di fenolftaleina (indicatore). Si fa poi gocciolare la soluzione di HCl 1.5 M 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 CO_2 viene calcolata con l'equazione (2.1):

$$\text{CO}_2 (\text{mg}) = (V_0 - V) \times f \quad (2.1)$$

Dove V_0 è il volume di HCl (1.5 M) utilizzato per titolare i microcosmi di controllo, V è il volume usato per titolare i campioni e f è un fattore di correzione, pari a $22 \times M$, dove M è la molarità della soluzione di HCl impiegata (nel caso in esame $f=33$).

2.4 Estrazione dei polifenoli totali

Dopo essere stata caratterizzata, la BSG triturrata è stata utilizzata per il recupero dei polifenoli totali (TP). L'estrazione con solvente è stata eseguita direttamente sulla BSG triturrata, oppure è stata preceduta da diversi pretrattamenti: un pretrattamento biologico mediante SSF con *P.chrysosporium*, un pretrattamento fisico con US, o una combinazione di SSF e US. Tutte le procedure usate per il recupero dei TP vengono riassunte nella Figura 2.3.

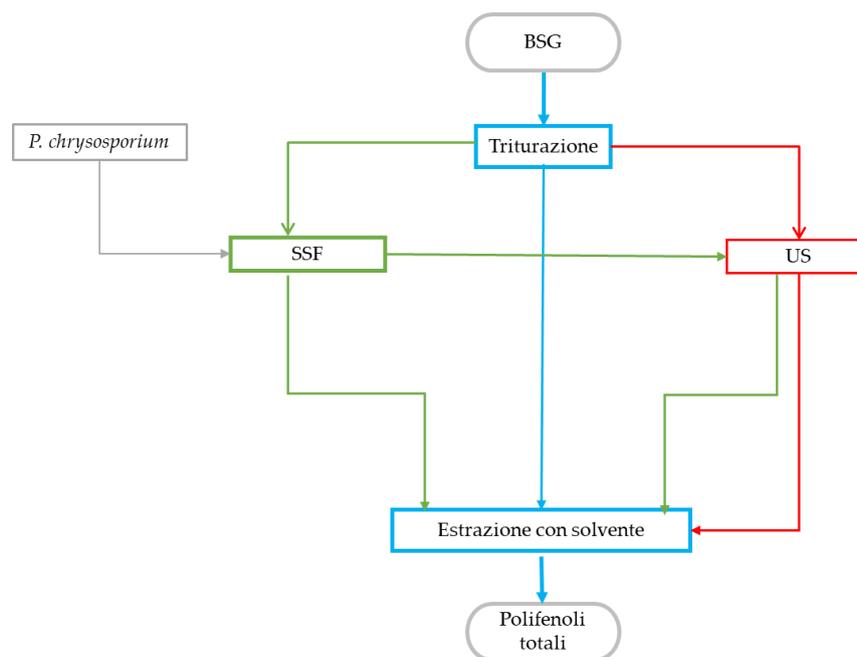


Figura 2.3 Diagramma che rappresenta le procedure di estrazione dei TP dalla BSG. La linea azzurra indica l'estrazione con solvente senza pretrattamenti; le linee verdi indicano il pretrattamento biologico (SSF); la linea rossa indica il pretrattamento fisico (US)

2.4.1 Estrazione con solvente

I TP vengono estratti dalla BSG triturrata prelevata da microcosmi abiotici e biotici usando una miscela di acqua ed etanolo 50:50, v:v [46]. La BSG, preventivamente essiccata a 80°C , viene miscelata con la soluzione in un rapporto solido/liquido 1:40. L'estrazione viene

effettuata mantenendo il campione in continua agitazione per 2 ore in un bagno termostatico a 80°C. Dopo l'estrazione, il campione viene filtrato con un filtro di carta Whatman N°1 di 90 mm di diametro.

2.4.2 Pretrattamento con sonda ad ultrasuoni

Prima di procedere con l'estrazione con solvente, è possibile effettuare un pretrattamento con sonda ad ultrasuoni (US) sulla BSG triturata derivante dai microcosmi abiotici e biotici. La sonda ad ultrasuoni ($\varnothing = 1/2''$) opera in modalità pulsata (5 sec on/ 5 sec off) ad una frequenza di 20 kHz, con un'ampiezza del 100% e ad una potenza di 250 W per 15 min (SFX250 Sonifier, Branson) [36]. Per tale pretrattamento, la BSG è miscelata con la porzione di acqua come descritto nel paragrafo 2.4.1 e prima di procedere con l'utilizzo della sonda tale miscela è pesata. Durante il pretrattamento la soluzione è mantenuta nel ghiaccio per controllarne la temperatura. Una volta terminato il pretrattamento, si aggiunge il volume di acqua evaporato (previa pesatura della miscela) e successivamente il volume di etanolo e si procede con l'estrazione come descritto nel paragrafo 2.4.1.

2.5 *Determinazioni analitiche*

2.5.1 Analisi della BSG

2.5.1.1 Umidità della BSG

La misura dell'umidità (%) viene effettuata tramite termobilancia (OHAUS MB 120). Per l'analisi, la BSG viene essiccata a 80°C, utilizzando una velocità di essiccazione di 1 mg/90s.

Lo strumento opera secondo il principio termogravimetrico. La termobilancia determina quindi l'umidità percentuale misurando il peso del campione prima e dopo l'essiccazione.

2.5.2 Analisi dell'estratto acquoso

Un campione di 20 g di BSG umida viene miscelato con acqua distillata in rapporto 2:5 (peso:volume) e messo in agitazione a 1000 rpm per 1 h su un agitatore magnetico (C-MAG HS 4, IKA). La sospensione viene successivamente centrifugata (centrifuga IEC CL30, Thermo SCIENTIFIC) a 4000 rpm per 12 minuti a 25°C ed il surnatante (estratto acquoso) utilizzato per le determinazioni analitiche.

2.5.2.1 pH

Il pH dell'estratto acquoso viene determinato in maniera automatica attraverso un pH-metro (inoLab® pH 730).

2.5.2.2 Gradi Brix

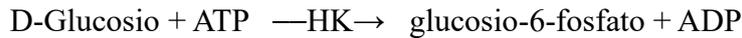
Il grado Brix ($^{\circ}\text{Bx}$) è un'unità di misura che rappresenta la concentrazione di zuccheri disciolti in una soluzione. In particolare, $1^{\circ}\text{Brix} = 1 \text{ g di zucchero}/100 \text{ g di soluzione}$.

La lettura dei gradi Brix sull'estratto si effettua in maniera automatica tramite un rifrattometro (PAL-1, Atago) che va a misurare l'angolo di deviazione della luce quando quest'ultima attraversa una soluzione.

2.5.2.3 Determinazione del D-glucosio

La concentrazione di D-glucosio (g/L) sull'estratto viene effettuata utilizzando il kit enzimatico commerciale (Enzytec™ Liquid D-Glucose, Art. No. E8140, R-biopharm). Il test enzimatico si basa sull'azione degli enzimi esochinasi (HK) e glucosio-6-fosfato-deidrogenasi (G6P-DH).

La reazione enzimatica è la seguente:



La quantità di nicotinammmina adenina dinucleotide (NADH) formato è proporzionale alla quantità di D-glucosio e la misura si effettua leggendo l'assorbanza a 340 nm tramite spettrofotometro UV-Vis.

2.5.2.4 Determinazione delle proteine totali

Sull'estratto viene effettuata la determinazione delle proteine totali. Viene effettuata una misura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 280 nm tramite spettrofotometro UV-Vis (LAMBDA 465 UV/Vis PerkinElmer). La lettura del bianco è effettuata usando acqua distillata. Per poter correlare il valore dell'assorbanza alla concentrazione proteica è necessario costruire preventivamente una retta di taratura, come mostrato in Figura 2.4, usando concentrazioni note (0.15, 0.25, 0.5, 1g/L) di soluzioni delle proteine del siero di latte (MILEI 90). I risultati sono espressi come g proteine per g di BSG secca (g proteine/g BSG_{secca}).

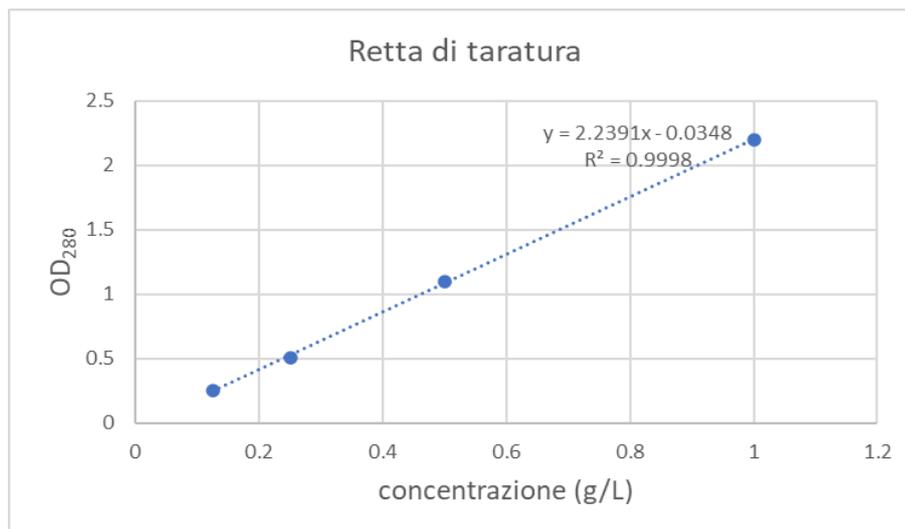


Figura 2.4 Retta di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazione nota di proteine del siero di latte

2.5.2.5 Attività dell'enzima laccasi

L'attività dell'enzima laccasi viene determinata monitorando l'ossidazione del 2,6-dimetilfenolo (2,6-DMP) alla lunghezza d'onda di 468 nm tramite spettrofotometro UV-Vis [47]. La miscela di reazione viene preparata in cuvette da 4500 µL miscelando 1000 µL di estratto, 1500 µL di tampone sodio tartrato 200 mM pH 5, 30 µL di una soluzione di MnSO₄ 10 mM, 300 µL di 2,6-DMP 1 mM e 170 µL di acqua distillata. La reazione inizia quando si aggiungono 24 µL di perossido di idrogeno 10 mM. Si calcola l'attività dell'enzima laccasi usando l'equazione (2.2)

$$\text{Attività' Laccasi (UI/L)} = \frac{\Delta\text{Abs} \times \text{Volume}_{\text{tot}} \times 60 \times 10^6}{\varepsilon \times \Delta t \times \text{Volume}_{\text{campione}}} \quad (2.2)$$

Dove:

ΔAbs : differenza di assorbanza nell'intervallo Δt

$\text{Volume}_{\text{tot}}$: volume totale della soluzione (3000 μL)

ε : coefficiente di estinzione molare pari a 23100 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Δt : intervallo di tempo (sec)

$\text{Volume}_{\text{campione}}$: 1000 μL

2.5.3 Valutazione del contenuto di polifenoli totali e della capacità antiossidante

2.5.3.1 Analisi del contenuto di polifenoli totali

La valutazione del contenuto di polifenoli totali (TPC) è effettuata tramite la reazione di Folin-Ciocalteu. A 0.5 mL di estratto (vedi paragrafo 2.4.1 e 2.4.2) vengono aggiunti 2.5 mL di reagente di Folin-Ciocalteu (diluito 1:10) e 2 mL di una soluzione di carbonato di sodio Na_2CO_3 al 7.5%. Allo stesso modo si prepara il campione "bianco" contenente acqua distillata al posto dell'estratto. Tutte le miscele sono mantenute al buio per 2 h a 25°C [48]. Si procede a leggere l'assorbanza a 765 nm tramite spettrofotometro UV-Vis. Come mostrato in Figura 2.5 viene costruita una retta di taratura a concentrazioni note di acido gallico (0.05, 0.15, 0.27 g/L). I risultati vengono espressi come mg equivalenti di acido gallico per g BSG secca, mg GAE/gBSG_{secca}.

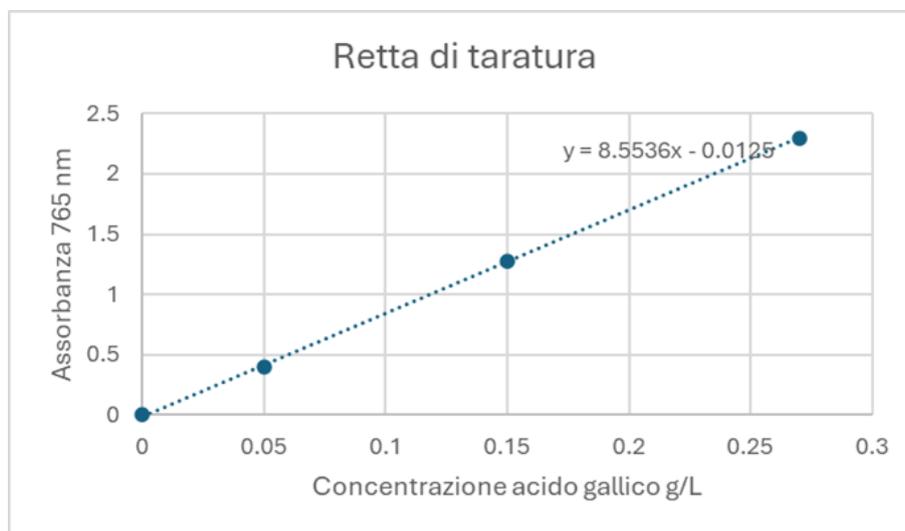


Figura 2.5 Retta di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazione nota di acido gallico

2.5.3.2 Valutazione della capacità antiossidante

Il saggio ABTS permette di valutare il potere antiossidante dell'estratto di polifenoli totali. Questo metodo si basa sulla capacità dei composti antiossidanti di trasferire un atomo di idrogeno o un elettrone al radicale cationico $\text{ABTS}^{\cdot+}$, provocando una decolorazione della

soluzione e una diminuzione del valore di assorbanza a 734 nm. La riduzione dell'assorbanza è direttamente proporzionale alla capacità antiossidante del campione.

Il radicale catione ABTS^{•+} viene generato dalla miscelazione di 4 mL di una soluzione 7 mM di ABTS e 1 mL di una soluzione 12.25 mM di persolfato di potassio (K₂S₂O₈). La miscela viene incubata al buio a temperatura ambiente per 16 h. Al momento dell'utilizzo si procede a diluire la soluzione di ABTS^{•+} con acqua distillata in modo da avere un'assorbanza a 734 nm di 0.700±0.200 [49].

I campioni sono preparati miscelando con vortex 975 µL di ABTS^{•+} con 25 µL di ciascun estratto. Come campione di controllo vengono usati 975 µL di ABTS^{•+} e 25 µL di acqua distillata. Dopo 10 minuti, si leggono i valori di assorbanza a 734 nm effettuando il bianco con 1.0 mL di acqua distillata. La capacità antiossidante nel campione viene determinata come percentuale di riduzione dell'intensità del colore (% di inibizione) rispetto al campione di controllo tramite l'equazione:

$$A(\%) = (1 - A_c / A_0) \times 100 \quad (2.3)$$

Dove:

A_c = assorbanza campione

A_0 = assorbanza radicale (campione di controllo)

2.6 *Analisi statistica dei dati*

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 utilizzando il Student t-test; tali differenze sono considerate significative quando hanno un valore di $p < 0.05$.

3 ANALISI E DISCUSSIONE DEI RISULTATI

3.1 Caratterizzazione della BSG

La BSG utilizzata in questo lavoro di tesi proviene da un produttore di birra locale in Piemonte e presenta una composizione tipica di una birra Pilsner. Prima dell'utilizzo, la BSG triturrata è stata caratterizzata in termini di umidità, pH, gradi Brix, concentrazione di D-glucosio, concentrazione proteica, quantità di polifenoli e attività antiossidante. I valori ottenuti sono riportati nella Tabella 3.1 e in generale risultano in accordo con i dati di letteratura.

Per quanto riguarda l'umidità, il valore ottenuto in questo lavoro (71.37%) è in linea con quello riportato nello studio di Da Costa Maia [50], che ha riscontrato un'umidità del 75%.

Anche il pH (5.6) risulta in accordo con quello trovato da [51] pari a 6.0.

Il contenuto di proteine ottenuto nel presente lavoro (0.013 g/g BSG secca) è più basso di quello riportato da Mussatto et al. [52], che ha misurato un contenuto proteico di 152.5 g/kgBSG_{secca} (0.152 g/gBSG_{secca}). Questa discrepanza può essere attribuita ai diversi metodi utilizzati per la misurazione delle proteine. Mussatto et al. hanno impiegato il metodo Kjeldahl, che prevede la digestione del campione con un acido forte per rilasciare l'azoto, successivamente quantificato mediante una tecnica di titolazione e convertito in proteine applicando un fattore di conversione (di solito 6.25). Tuttavia, questo metodo non misura le proteine vere e proprie e tende a sovrastimare il contenuto proteico, poiché il fattore di conversione 6.25 non è sempre adatto. Studi hanno dimostrato che questa sovrastima può variare dal 40% al 71%, anche utilizzando fattori di conversione specifici per diverse fonti alimentari [53].

Per quanto riguarda il TPC, ad esempio, nello studio di Da Costa Maia [26], la BSG derivante da una birra Pilsner mostra un contenuto di 1.21 mg GAE/g BSG_{secca}, un valore inferiore rispetto a quello ottenuto nel presente lavoro di tesi pari a 4.0 mg GAE/gBSG_{secca}. Questa differenza può essere spiegata dal fatto che il contenuto di polifenoli nella BSG varia in base al tipo di malto utilizzato e al processo produttivo adottato [54].

Tabella 3.1 Caratterizzazione della BSG

Caratterizzazione delle BSG	
Umidità (%)	71.37
pH	5.6
Gradi Brix (%)	0.31
D-glucosio(g/L)	2.08
Proteine totali (g proteine/gBSG_{secca})	0.013
Polifenoli totali (mg GAE/g BSG_{secca})	4.0
Capacità antiossidante (A%)	37

3.2 SSF con *P. chrysosporium*: Prova 1

Nella prova 1, sono allestiti microcosmi biotici e abiotici. Tutti i microcosmi sono costituiti da beute Erlenmeyer da 500 mL, chiuse con tappo di vetro e riempite con 40 g di BSG triturrata tramite mezzaluna. La BSG contenuta nei microcosmi biotici viene inoculata con 3 mL di sospensione standardizzata di conidi, mentre nei microcosmi abiotici sono aggiunti 3 mL di acqua distillata sterile al posto dell'inoculo.

In alcuni dei microcosmi biotici, sono stati aggiunti 2 mL di acqua sterile (campioni denominati “BSG biotica acqua”, bBSG-H₂O) e in altri vengono aggiunti 2 mL di basal III medium (campioni denominati “BSG biotica basal III medium”, bBSG-B_{III}M). La stessa addizione è avvenuta anche per i microcosmi abiotici, ottenendo così i campioni denominati rispettivamente “BSG abiotica acqua”, aBSG-H₂O e “BSG abiotica basal III medium”, aBSG-B_{III}M. I microcosmi sono stati incubati a 30°C, che risulta essere la temperatura ottimale per la produzione dell’enzima laccasi [40]. I microcosmi sono stati aerati periodicamente al tempo zero e dopo 3, 6, 8,10, 13, 15, 20 e 24gg dall’inizio della prova.

I sacrifici sono stati effettuati al tempo zero e nei giorni 7, 10, 15, 21 e 29 per raccogliere la BSG biotica e abiotica per le analisi.

I microcosmi biotici vengono sacrificati interamente al t₀ e a 7, 10 e 29 gg, dall’inizio della prova. A 15 gg viene sacrificata solo una parte di un microcosmo biotico (circa 16 g di BSG) e a 21 gg viene sacrificata la restante parte (circa 24 g di BSG).

I microcosmi abiotici sono stati sacrificati interamente al t₀ e a 7 gg. A 10 gg è sacrificata solo una parte di un microcosmo abiotico (circa 17 g di BSG) e a 15 gg è sacrificata la restante parte (23 g di BSG). La stessa procedura è stata fatta anche a 21 gg (16 g di BSG) e a 29 gg (24 g di BSG).

3.2.1 CO₂ media cumulata e velocità di produzione della CO₂

Come si vede dalla Figura 3.1, le due curve, relative alla CO₂ media cumulata, mostrano un andamento simile nei microcosmi con acqua e con Basal III medium. Tuttavia, a partire dall’8° giorno di incubazione e fino al 29°, nei microcosmi con Basal III medium (curva arancione) si osservano valori di CO₂ mediamente superiori di circa 100 mg rispetto a quelli dei microcosmi addizionati con sola acqua.

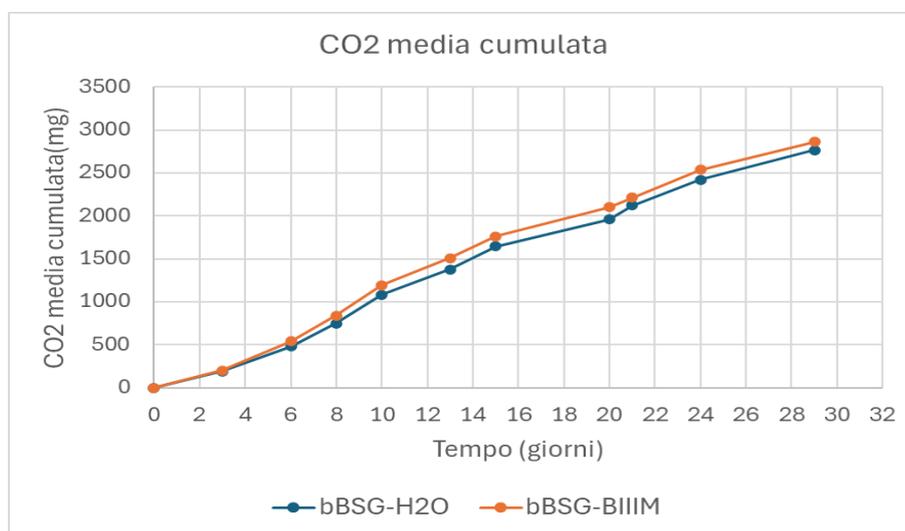


Figura 3.1 Andamento CO₂ media cumulata nel tempo per la bBSG-H₂O e la bBSG-B_{III}M

Come si vede dalla Tabella 3.2, la velocità di produzione della CO₂, presenta un picco massimo di 176 mg/giorno al 10° giorno in presenza di Basal III medium, che coincide con il momento di massima attività della laccasi pari a 1.4 UI/L (vedere paragrafo 3.2.5). Dalla Figura 3.2 si nota inoltre che la velocità di produzione della CO₂ subisce un calo quando l’intervallo tra le

aerazioni supera i tre giorni. Il valore minimo registrato è di 63 mg/giorno al 20° giorno in presenza di acqua. Infatti, al 20° giorno, l'aerazione è stata effettuata dopo un intervallo di cinque giorni dalla precedente aerazione. La stessa cosa è avvenuta anche per i microcosmi biotici addizionati di Basal III medium con un valore minimo di 68 mg/giorno. Questo dato suggerisce che l'aerazione gioca un ruolo cruciale nella crescita della biomassa fungina, influenzando significativamente la produzione di CO₂. Ciò è dovuto al fatto che *P. chrysosporium* è un microrganismo aerobico. Inoltre, una maggiore disponibilità di ossigeno porta a una produzione aumentata di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Questi, attivano specifici meccanismi, che inducono l'espressione del gene che codifica per la lignina perossidasi (LIP), l'enzima che degrada la lignina [55].

La LIP viene sintetizzata come meccanismo per ridurre lo stress ossidativo [56]. Infatti, questo enzima utilizza i ROS, tra cui H₂O₂, come substrato per avviare un meccanismo radicalico che porta alla degradazione della lignina, contribuendo così a regolare i livelli di ROS nella cellula e a ridurre gli effetti dannosi [56] [57].

Tabella 3.2 Andamento durante la SSF della CO₂ media cumulata e della velocità di produzione della CO₂ per la bBSG-H₂O e per la bBSG-B_{III}M

Tempo (giorni)	CO ₂ media cumulata (mg)		Velocità produzione della CO ₂ (mg/gg)	
	bBSG- H ₂ O	bBSG- B _{III} M	bBSG- H ₂ O	bBSG- B _{III} M
0	0	0	0	0
3	191.4	201.3	64	67
6	477.7	537.9	95	112
8	745.8	839.5	134	151
10	1080.2	1191.7	167	176
13	1378.9	1509.6	100	106
15	1642.9	1760.4	132	125
20	1959.7	2099.2	63	68
21	2121.4	2211.4	162	112
24	2421.7	2534.8	100	108
29	2764.9	2861.5	69	65

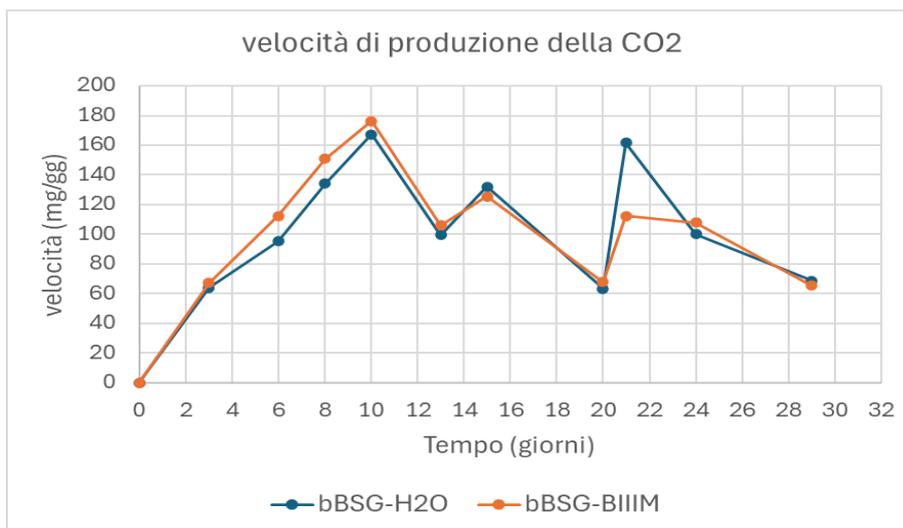


Figura 3.2 Andamento nel tempo della velocità di produzione della CO₂ per la bBSG-H₂O e per la bBSG-B_{III}M

3.2.2 Umidità

Dalla Tabella 3.3 si può notare un progressivo aumento dell'umidità nella BSG prelevata dai microcosmi biotici dovuto al metabolismo fungino con un incremento dal tempo zero al 29° giorno del 7.7% (passando da 76.40% a 82.31%) e del 7.9% (passando da 77.10 a 83.16%), rispettivamente per la BSG addizionata con acqua e con Basal III medium.

Per la BSG, presente nei microcosmi abiotici, l'umidità si mantiene circa costante e pari in media a $77.46 \pm 0.53\%$.

Tabella 3.3 Andamento durante la SSF dell'umidità (%) nei campioni bBSG-H₂O, aBSG-H₂O, bBSG-B_{III}M e aBSG-B_{III}M

Tempo(gg)	Umidità (%)			
	bBSG-H ₂ O	aBSG-H ₂ O	bBSG-B _{III} M	aBSG-B _{III} M
0	76.40	76.98	77.10	77.05
7	76.93	77.20	77.49	77.10
10	77.4	77.40	77.92	77.30
15	78.71	77.34	79.2	77.36
21	81.24	78.51	81.6	77.20
29	82.31	77.35	83.16	77.61

3.2.3 pH

Come si può notare dalla Tabella 3.4, nei campioni biotici il pH mostra variazioni nel tempo. Fino al 21° giorno, i valori di pH nei microcosmi biotici con acqua e Basal III medium risultano simili. In particolare, per entrambi i microcosmi, tra il tempo zero e il 7°gg il pH diminuisce di circa 1 unità (passando da 5.7 a 4.6 per i microcosmi addizionati con acqua e passando da 5.8 a 5 per quelli addizionati con Basal III medium). Tra il 7° e il 15° giorno,

il pH rimane pressoché stabile per entrambi i microcosmi con valore medio pari a 4.7. Successivamente, tra il 15° e il 21° giorno, si osserva un incremento di circa 1 unità. Dopo il 21° giorno, il comportamento del pH nei due campioni diverge: nei microcosmi con acqua continua ad aumentare leggermente fino a raggiungere un valore di 6.2, mentre nei microcosmi con Basal III medium si registra una diminuzione fino a 5.

Nei campioni abiotici, invece, il pH rimane costante nel tempo, con un valore medio di 5.78 \pm 0.08. Questa stabilità indica l'assenza di significative reazioni chimiche o biologiche che possano alterarne il valore.

Tabella 3.4 Andamento durante la SSF del pH nei campioni bBSG-H₂O, aBSG-H₂O, bBSG-B_{III}M e aBSG-B_{III}M

Tempo(gg)	pH			
	bBSG-H ₂ O	aBSG-H ₂ O	bBSG-B _{III} M	aBSG-B _{III} M
0	5.7	5.7	5.8	5.8
7	4.6	5.8	5.0	5.8
10	4.9	5.8	4.6	5.7
15	4.7	5.7	4.5	5.8
21	5.8	5.9	5.9	5.7
29	6.2	5.8	5.0	5.9

3.2.4 Gradi Brix e D-glucosio

Come si nota dalla Tabella 3.5 nei microcosmi biotici, si osserva una diminuzione dei °Bx sia in presenza di acqua che di Basal III medium, poiché il fungo consuma gli zuccheri in soluzione per il proprio metabolismo. In particolare, tra il tempo zero e il 29° giorno, i °Bx si riducono del 67% sia nei campioni con acqua che con Basal III medium passando da 0.31 a 0.10 °Bx. Questa riduzione tende a stabilizzarsi a partire dal 21° giorno con un valore di 0.10 °Bx nei campioni con acqua e dal 15° giorno intorno a 0.13 °Bx nei campioni con Basal III medium. Al contrario, nei campioni abiotici, il valore dei °Bx rimane pressoché costante, intorno a 0.30.

Dalla Tabella 3.5 si può notare che anche la concentrazione di D-glucosio segue un comportamento diverso tra campioni biotici e abiotici. Nei campioni biotici, il glucosio subisce un calo nel tempo a causa del consumo da parte del fungo. In particolare, nei campioni con acqua, la concentrazione passa da 2.00 g/L (t₀) a 0.49 g/L (29° giorno), con una riduzione di 1.51 g/L (-76%). Nei campioni con Basal III medium, scende da 2.1 g/L (t₀) a 0.61 g/L (29° giorno), con una riduzione di 1.49 g/L (-71%). Questa riduzione tende a stabilizzarsi intorno a 0.5 g/L dal 21° giorno nei campioni con acqua e intorno a 0.7 g/L già dal 15° giorno nei campioni con Basal III medium. Come si vede dalla Figura 3.3, questo andamento riflette la diminuzione dei °Bx, confermando che entrambi i parametri sono legati alla progressiva riduzione degli zuccheri in soluzione in risposta al metabolismo del fungo. I °Bx, in particolare, forniscono un'approssimazione più rapida della quantità totale di zuccheri disciolti in soluzione, rendendoli un indicatore utile per monitorare il consumo di zuccheri nel sistema.

Nei campioni abiotici, invece, la concentrazione di D-glucosio rimane stabile nel tempo, con un valore medio di 1.90 g/L sia in presenza di acqua che di Basal III medium, mostrando

solo piccole variazioni nel tempo. Questo conferma che le variazioni osservate nei campioni biotici sono attribuibili all'attività microbica.

Tabella 3.5 Andamento durante la SSF dei °Bx e del D-glucosio nei campioni bBSG-H₂O, aBSG-H₂O, bBSG-B_{III}M e aBSG-B_{III}M

Tempo (gg)	Gradi Brix (%)				D-glucosio (g/L)			
	bBSG-H ₂ O	aBSG-H ₂ O	bBSG-B _{III} M	aBSG-B _{III} M	bBSG-H ₂ O	aBSG-H ₂ O	bBSG-B _{III} M	aBSG-B _{III} M
0	0.31	0.31	0.30	0.30	2.00	2.00	2.10	2.10
7	0.24	0.30	0.31	0.30	1.97	1.92	1.39	1.94
10	0.27	0.29	0.27	0.30	1.15	1.88	1.01	1.87
15	0.20	0.30	0.13	0.29	1.00	1.96	0.73	1.96
21	0.10	0.30	0.13	0.29	0.54	1.78	0.63	1.76
29	0.10	0.30	0.10	0.29	0.49	1.84	0.61	1.78

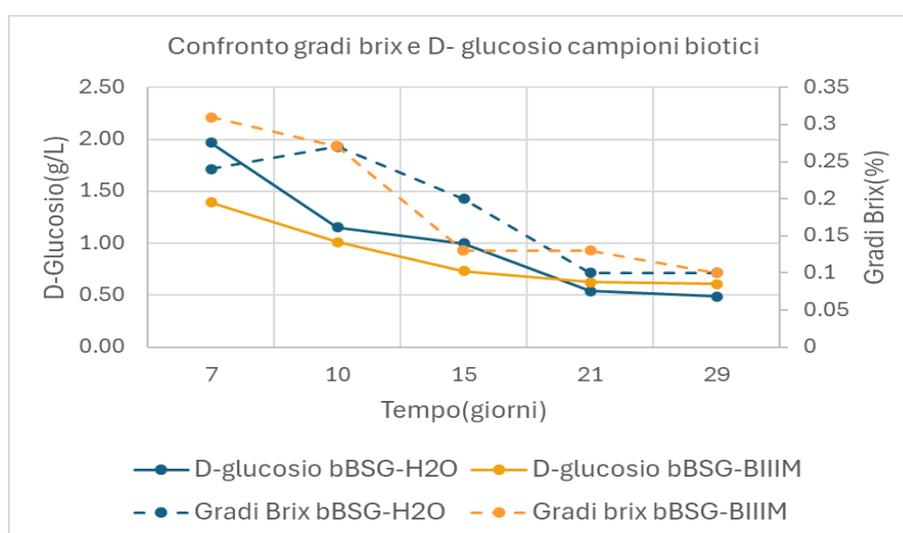


Figura 3.3 Confronto ° Bx e D-glucosio nei campioni bBSG-H₂O e bBSG-B_{III}M

3.2.5 Proteine totali e attività della laccasi

Come si può notare dalla Tabella 3.6, la crescita del fungo determina un aumento delle proteine totali nei microcosmi biotici sia in presenza di acqua che di Basal III medium, con un andamento simile per entrambi i campioni. In particolare, le proteine totali aumentano progressivamente fino al 15° giorno, senza differenze significative tra le due condizioni. Al 15° giorno, i valori raggiungono 0.033 g/gBSG_{secca} nei campioni con acqua e 0.034 g/gBSG_{secca} in quelli con Basal III medium. Dopo il 15° giorno si osserva una stabilizzazione con una lieve diminuzione. Infatti, nei microcosmi con Basal III medium, il valore scende da 0.034 a 0.029 g/gBSG_{secca}, mentre in quelli con acqua, il valore passa da 0.033 a 0.031 g/gBSG_{secca}. I valori della BSG prelevata dai microcosmi abiotici, invece, rimangono costanti intorno a 0.012 g/gBSG_{secca} per entrambi i tipi di microcosmi.

Nei campioni abiotici, l'attività della laccasi è assente e quindi non è riportata in Tabella 3.6. Nei microcosmi biotici, invece, l'attività enzimatica segue un andamento specifico, con un picco al 10° giorno, senza differenze significative tra i due campioni (1.32 UI/L con acqua e 1.40 UI/L con Basal III medium). Nello stesso giorno si osserva anche la massima velocità

di produzione di CO₂ (vedere paragrafo 3.2.1), mentre le proteine totali raggiungono il massimo al 15° giorno.

Tabella 3.6 Andamento durante la SSF delle proteine totali e dell'attività della laccasi nei campioni bBSG-H₂O, aBSG-H₂O, bBSG-B_{III}M e aBSG-B_{III}M

Tempo (giorni)	Proteine totali (g /g BSG _{secca})				Attività Laccasi (UI/L)	
	bBSG -H ₂ O	aBSG -H ₂ O	bBSG-B _{III} M	aBSG-B _{III} M	bBSG -H ₂ O	bBSG-B _{III} M
0	0.012	0.012	0.011	0.012	0	0
7	0.019	0.011	0.019	0.011	1.09	1.25
10	0.025	0.012	0.027	0.012	1.32	1.4
15	0.033	0.011	0.034	0.011	1.07	1.12
20	0.032	0.012	0.034	0.011	0.85	0.93
29	0.031	0.013	0.029	0.014	0.79	0.64

Come si nota dalla Tabella 3.7, l'attività specifica cresce progressivamente nei primi 7 gg di fermentazione con un massimo al 7° giorno nei campioni con Basal III medium (65.8 UI/g) e un valore leggermente inferiore nei campioni con acqua (57.4 UI/g). Al 10° giorno, in corrispondenza del picco di attività della laccasi, l'attività specifica diminuisce leggermente, raggiungendo 52.8 UI/g nei campioni con acqua e 51.9 UI/g nei campioni con Basal III medium. Dopo il 10° giorno, si osserva un calo più marcato, con valori che scendono progressivamente fino a 32.4 UI/g e 32.9 UI/g al 15° giorno, per poi ridursi ulteriormente a 25.5 UI/g e 22.1 UI/g al 29° giorno.

Il fatto che l'attività specifica cresca fino al 7° giorno indica che, fino a quel momento, l'enzima laccasi contribuisce a determinare il valore delle proteine totali. Successivamente, anche se le proteine totali continuano ad aumentare fino al 15° giorno, tale incremento non è attribuito esclusivamente all'enzima laccasi, ma è anche il risultato della sintesi di altre proteine.

Tabella 3.7 Andamento durante la SSF dell'attività specifica nei campioni bBSG-H₂O e bBSG-B_{III}M

Tempo (giorni)	Attività specifica (UI/g)	
	bBSG-H ₂ O	bBSG-B _{III} M
0	0.0	0.0
7	57.4	65.8
10	52.8	51.9
15	32.4	32.9
20	26.6	27.4
29	25.5	22.1

3.2.6 Valutazione dei polifenoli totali (TPC)

Per l'estrazione dei polifenoli da BSG triturrata, prelevata sia dai microcosmi abiotici che biotici, si è usata una miscela di etanolo/acqua (50:50 v/v).

L'estrazione dalla BSG derivante dai microcosmi abiotici è stata effettuata solo al tempo zero e al 29° giorno. La BSG, sia addizionata di acqua che quella addizionata di Basal III medium, è stata sottoposta a due condizioni: estrazione diretta con solvente (senza pretrattamento) o con pretrattamento US (540 W, 15 minuti, con cicli di 5 secondi on/5 secondi off), che ha preceduto l'estrazione con solvente.

Per la BSG derivante dai microcosmi biotici, invece, l'estrazione con solvente è stata effettuata per tutti i tempi di sacrificio, senza o con pretrattamento US, che anche in questo caso ha preceduto l'estrazione con solvente.

Per il pretrattamento US, la temperatura iniziale era di 20°C. Ogni 5 minuti, la temperatura saliva fino a circa 40°C. Quindi ogni 5 min il processo veniva interrotto con una pausa di 2 minuti per permettere il raffreddamento fino a 20°C, prima di riprendere il pretrattamento.

Dal grafico della Figura 3.4 si può osservare che i campioni di BSG prelevati dai microcosmi abiotici ed estratti con solvente mostrano un contenuto di polifenoli costante nel tempo. In particolare, nei campioni con aggiunta di acqua, il valore è pari a 3.7 mgGAE/gBSG_{secca} al tempo zero e a 3.9 mgGAE/gBSG_{secca} al 29° giorno. In presenza di Basal III medium, i valori al tempo zero e al 29° gg sono uguali e pari a 4 mgGAE/gBSG_{secca}. La media di tutti questi valori, 3.9 mgGAE/gBSG_{secca} è rappresentata nel grafico della Figura 3.4 con una linea rossa continua.

Dalla Figura 3.4, si nota che l'uso del pretrattamento US sulla BSG prelevata dai microcosmi abiotici ha migliorato l'estrazione dei polifenoli; tuttavia, anche in questo caso, i valori di TP sono rimasti costanti nel tempo e generalmente simili tra i campioni di BSG addizionati con acqua e con Basal III medium. La media di questi valori, 5.1 mgGAE/gBSG_{secca} è rappresentata dalla linea rossa tratteggiata in Figura 3.4.

I cambiamenti più significativi si riscontrano nella BSG sottoposta a SSF, come si può vedere dalla Figura 3.5. In questo caso, si nota un incremento del TPC nei 29 giorni di fermentazione, con un passaggio da 3.7 a 4.9 mgGAE/gBSG_{secca} nei campioni di BSG addizionata con acqua, e da 4 a 5 mgGAE/gBSG_{secca} nei campioni di BSG addizionati con Basal III medium.

Sempre dalla Figura 3.5 si osserva che, anche quando SSF e pretrattamento US vengono combinati, il TPC aumenta nel tempo. In particolare, al 29° giorno si raggiungono i valori massimi di TP pari a 6.5 mgGAE/gBSG_{secca} in presenza di acqua e pari a 6.8 mgGAE/gBSG_{secca} in presenza di Basal III medium.

Tuttavia, l'aggiunta di Basal III medium ha determinato un miglioramento trascurabile nella resa di estrazione. Ad ogni tempo di sacrificio, infatti, i campioni di BSG sottoposti ad entrambi i pretrattamenti (SSF e US) e arricchiti con Basal III medium hanno mostrato un contenuto di polifenoli superiore di circa il 3% rispetto agli equivalenti addizionati con acqua. Relativamente alla significatività statistica, il confronto tra i due gruppi di campioni ha mostrato un valore di p elevato, superiore a 0.05 (p=0.19), il che indica che la differenza osservata non è statisticamente significativa e non c'è evidenza sufficiente per concludere che il Basal III medium abbia un impatto sostanziale sulla resa di estrazione.

Al 29° giorno, il pretrattamento US ha aumentato l'estrazione dei TP del 28% in presenza di acqua, portando il valore a 5 mgGAE/gBSG_{secca}, e del 36% in presenza di Basal III

medium, portando il valore a 5.3 mgGAE/gBSG, rispetto alla media dei TP estratti dalla BSG tramite solvente pari a 3.9 mgGAE/gBSG (linea rossa continua in Figura 3.4). La sola SSF, al 29° gg, ha portato a risultati analoghi, con un aumento del 26% nella BSG addizionata di acqua (4.9 mgGAE/gBSG secca) e del 28% in quella con Basal III medium (5.0 mgGAE/gBSG), sempre rispetto alla stessa media dei TP. Tuttavia, sempre al 29° gg, la combinazione dei due pretrattamenti ha determinato un miglioramento ancora più marcato, con un incremento del 67% (6.5 mgGAE/gBSG secca) nella BSG addizionata di acqua e del 74% (6.8 mgGAE/gBSG secca) in quella con Basal III medium, rispetto alla media dei TP. Tali differenze sono caratterizzate da una significatività statistica pari, rispettivamente, a $p= 0.00035$ e $p= 0.00029$ per i campioni con acqua e Basal III medium.

I risultati ottenuti evidenziano l'efficacia della sinergia tra i due metodi nel potenziare l'estrazione dei polifenoli.

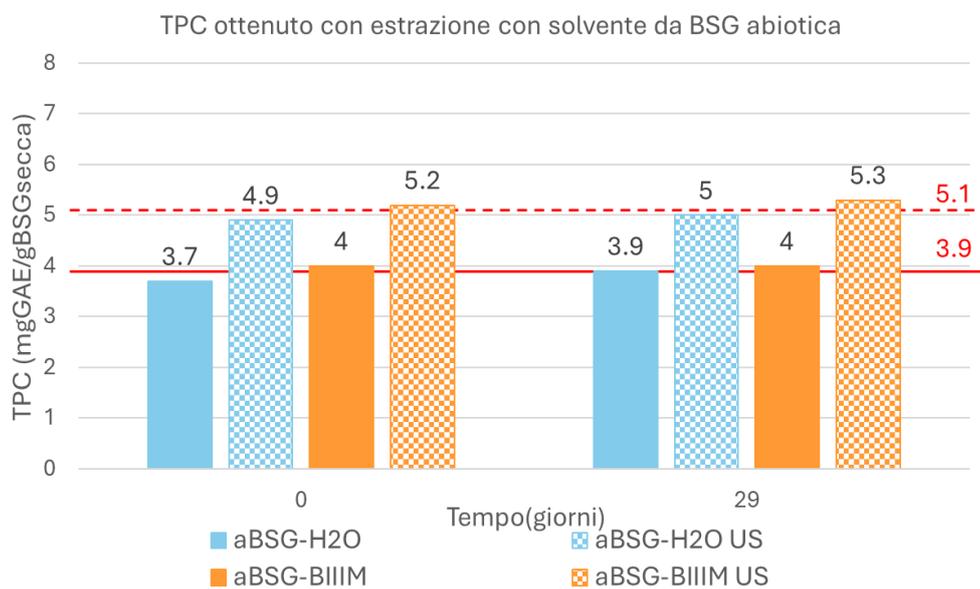


Figura 3.4 Andamento nel tempo del TPC ottenuto con estrazione con solvente da BSG abiotica addizionata con H₂O o con B_{III}M, senza o con pretrattamento US. Le linee indicano la media del TPC ottenuto con estrazione con solvente da BSG abiotica (linea continua) e da BSG abiotica pretrattata con US (linea tratteggiata).

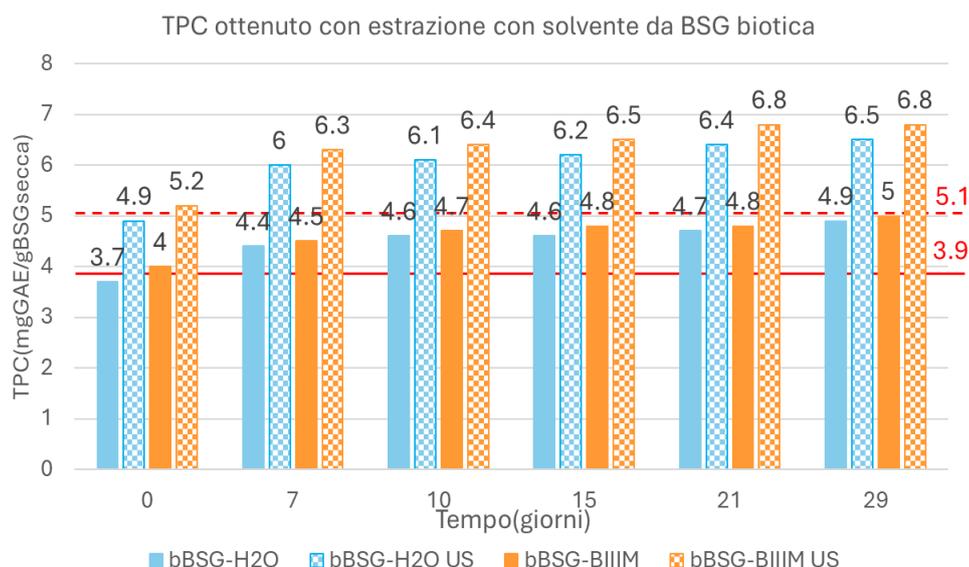


Figura 3.5 Andamento nel tempo del TPC ottenuto con estrazione con solvente da BSG biotica addizionata con H₂O o con B_{III}M, senza o con pretrattamento US. Le linee indicano la media del TPC ottenuto con estrazione con solvente da BSG abiotica (linea continua) e da BSG abiotica pretrattata con US (linea tratteggiata).

3.2.7 Capacità antiossidante

Sugli estratti, su cui sono stati valutati i polifenoli totali, è stata eseguita anche un'analisi della capacità antiossidante tramite saggio ABTS. I risultati sono espressi come percentuale di inibizione (A%), dove un valore più alto indica una maggiore capacità antiossidante dell'estratto. La capacità antiossidante fornisce un'indicazione del potenziale di questi composti nel contrastare i radicali liberi e lo stress ossidativo, aspetti rilevanti sia in ambito nutrizionale che in applicazioni farmaceutiche e cosmetiche. [23]

Dai dati riportati in Tabella 3.9 si osserva che, nei campioni di BSG prelevati da microcosmi biotici, l'aggiunta di Basal III medium non ha avuto un'influenza significativa sulla capacità antiossidante. In particolare, al 15° giorno, quando la capacità antiossidante ha raggiunto il valore massimo, i campioni di BSG sottoposti a SSF, con Basal III medium e con acqua, hanno mostrato un valore identico (52%). Allo stesso modo, i campioni di BSG sottoposti sia a SSF che a US, con Basal e con acqua, hanno registrato lo stesso valore (54%).

In generale, tutti i campioni sia abiotici che biotici (addizionati con acqua o con Basal III medium), sottoposti a pretrattamento US hanno mostrato un valore di A% leggermente superiore (circa il 2%) per tutti i tempi di sacrificio, rispetto ai corrispettivi campioni che non sono stati pretrattati con US; relativamente alla significatività statistica tra i due gruppi di campioni analizzati, è stato calcolato un valore di $p=0.038$. Questo indica che la differenza osservata è statisticamente significativa e c'è evidenza sufficiente per concludere che il pretrattamento con ultrasuoni (US) ha un effetto positivo sul miglioramento della capacità antiossidante.

La SSF ha portato a un miglioramento più significativo rispetto al pretrattamento con US. Infatti al 29° gg tutti i campioni di BSG abiotica pretrattati con US (addizionati con acqua o con Basal III medium) presentano un valore di A% pari in media a 38% ($p=0.00099$,

rispetti ai corrispettivi campioni estratti senza pretrattamento con US), mentre i campioni biotici (sottoposti a SSF) presentano un valore medio di 50% ($p=0.00085$, rispetto ai corrispettivi campioni estratti senza pretrattamento con SSF).

Tabella 3.8 Andamento nel tempo della capacità antiossidante (A%) per i campioni aBSG-H₂O, aBSG-H₂O US, aBSG-B_{III}M, aBSG-B_{III}M US

Capacita' antiossidante (A%) da BSG abiotica estratta con solvente				
Tempo (giorni)	aBSG-H₂O	aBSG-H₂O US	aBSG-B_{III}M	aBSG-B_{III}M US
0	37	39	37	39
29	36	38	36	37

Tabella 3.9 Andamento nel tempo della capacità antiossidante (A%) per i campioni bBSG-H₂O, bBSG-H₂O US, bBSG-B_{III}M, bBSG-B_{III}M US

Capacita' antiossidante (A%) da BSG biotica estratta con solvente				
Tempo (giorni)	bBSG-H₂O	bBSG-H₂O US	bBSG-B_{III}M	bBSG-B_{III}M US
0	37	39	38	39
7	41	43	42	44
10	51	53	48	52
15	52	54	52	54
21	48	50	50	52
29	49	51	49	50

Nel grafico della Figura 3.6 sono riportati i risultati del confronto tra la quantità totale di polifenoli estratti (TPC) e la capacità antiossidante nei campioni biotici addizionati con acqua (a) e con Basal III medium (b). Come si può osservare, nei campioni sia con acqua che con Basal III medium, dal tempo zero al 15° giorno si verifica un aumento sia della concentrazione di polifenoli che della capacità antiossidante. Tuttavia, nei campioni con acqua, dal 15° al 21° giorno si nota un lieve calo nella capacità antiossidante (da 52% a 49%), seguito da una leggera ripresa tra il 21° e il 29° giorno, sebbene la capacità antiossidante al 29° gg risulti ancora inferiore rispetto al 15° giorno. Nei campioni con Basal III medium, invece, la diminuzione della capacità antiossidante è progressiva, tra il 15° e il 29° giorno.

Per quanto riguarda i polifenoli, la loro concentrazione continua ad aumentare dal 7° al 29° giorno, sia nei campioni trattati con acqua che con Basal III medium.

La discrepanza osservata tra la concentrazione di polifenoli e la capacità antiossidante a partire dal 15° giorno potrebbe essere dovuta al fatto che vengono estratti diversi tipi di polifenoli. È ben noto che ogni classe di polifenoli possiede una struttura distinta, la quale determina una capacità antiossidante differente, come riportato da Lang et al. [21]

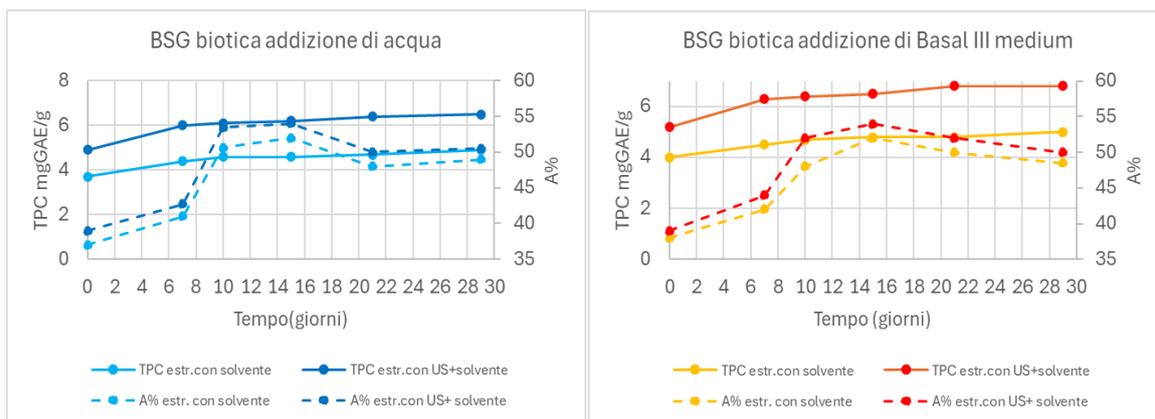


Figura 3.6 Confronto TPC e A% per la BSG biotica addizionata di acqua a) e Basal III medium b)

3.3 SSF con *P. chrysosporium*: Prova 2

Nella prova 2, sono stati allestiti microcosmi biotici (inoculati con il fungo tramite 3 mL di sospensione standardizzata di conidi) e abiotici (addizionati con 3 mL di acqua) con 40 g di BSG tritata in beute Erlenmeyer da 500 mL, chiuse con tappo di vetro. In tutti i microcosmi biotici e abiotici sono stati aggiunti 2 mL di acqua distillata, ottenendo i campioni denominati “BSG biotica” (bBSG -H₂O) e “BSG abiotica” (aBSG -H₂O). I microcosmi sono stati incubati a 30°C e aerati ogni 24 ore, ad eccezione dei fine settimana (ogni 72 h).

I sacrifici sono stati effettuati al tempo zero e nei giorni 4, 7, 10, 15, 21 e 29 per raccogliere la BSG biotica e abiotica per le analisi.

I microcosmi biotici vengono sacrificati interamente al t₀, 4 e 7 gg dall’inizio della prova. A 10 gg viene sacrificata una parte del microcosmo biotico (circa 19 g di BSG) e a 15 gg è sacrificata la restante parte (circa 21 g di BSG). Questo è stato fatto anche al 21° gg di sacrificio (circa 16 g BSG) e al 29° gg (circa 24 g di BSG). I microcosmi abiotici sono stati sacrificati interamente al t₀, 4 e 7 gg. A 10 gg viene sacrificata una parte del microcosmo abiotico (circa 17 g di BSG) e a 15 gg è sacrificata la restante parte (23 g di BSG). Questo è stato fatto anche al 21° gg di sacrificio (circa 16 g di BSG) e al 29° gg (circa 24 g di BSG).

3.3.1 CO₂ media cumulata e velocità di produzione della CO₂

La CO₂ media cumulata continua ad aumentare progressivamente nel tempo come si nota dalla Tabella 3.10 e dal grafico della Figura 3.7. In particolare, dal tempo iniziale (t₀) fino al 25° giorno, si osserva un incremento costante di circa 200 mg ogni giorno. Tuttavia, dal 25° al 29° giorno, l'aumento diventa meno pronunciato, con un incremento inferiore ai 100 mg. Questo suggerisce che, dopo il 25° giorno, la velocità di accumulo della CO₂ rallenta, indicando una possibile stabilizzazione del processo probabilmente a causa della mancanza di nutrienti come spiegato anche nello studio di Zacchi et al. [56]

Tabella 3.10 Andamento durante la SSF della CO₂ media cumulata e della velocità di produzione della CO₂ per il campione bBSG -H₂O. I valori in grassetto indicano i giorni del fine settimana.

Tempo (giorni)	CO ₂ media cumulata (mg)	Velocità produzione CO ₂ (mg/giorno)
0	0.0	0
1	14.9	15
2	145.2	130
3	304.4	159
4	495.8	191
7	792.2	99
8	986.0	194
9	1190.6	205
10	1368.8	178
11	1556.1	187
14	1818.5	87
15	2009.0	191
16	2100.0	91
17	2217.8	118
18	2404.2	186
21	2692.4	96
22	2853.0	161
23	3000.2	147
24	3130.0	130
25	3328.0	198
28	3400.0	24
29	3480.0	80

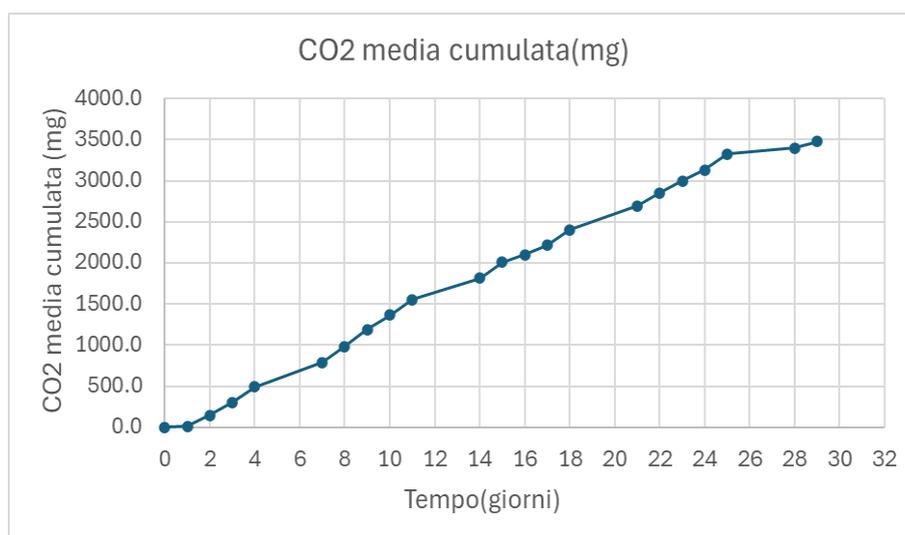


Figura 3.7 Andamento durante la SSF della CO₂ media cumulata per il campione bBSG -H₂O

Come si nota dalla Figura 3.8 e dalla Tabella 3.10 la velocità di produzione della CO₂ raggiunge un picco massimo di 200 mg/giorno al 9° giorno e successivamente si stabilizza attorno a questo valore. Tuttavia, dall'analisi dei dati emerge che, quando l'intervallo tra le aerazioni supera i tre giorni (come accade nel fine settimana), si osserva una diminuzione della velocità di produzione della CO₂. Questo suggerisce che una minore frequenza di aerazione, influenza negativamente la produzione di CO₂. In particolare, al 28° giorno si registra un calo drastico della velocità di produzione (24 mg/giorno). Questo può essere attribuito non solo all'intervallo di 3 gg tra le aerazioni, ma anche alla stabilizzazione della produzione di CO₂ dal 25° giorno, già evidente nel grafico precedente in Figura 3.7. Dal 28° al 29° giorno, si osserva una lieve ripresa, sebbene i valori rimangano comunque inferiori a quelli precedenti. Questo può essere di nuovo attribuito alla stabilizzazione nella produzione di CO₂, che indica molto probabilmente che il processo fermentativo sta raggiungendo una fase di equilibrio.

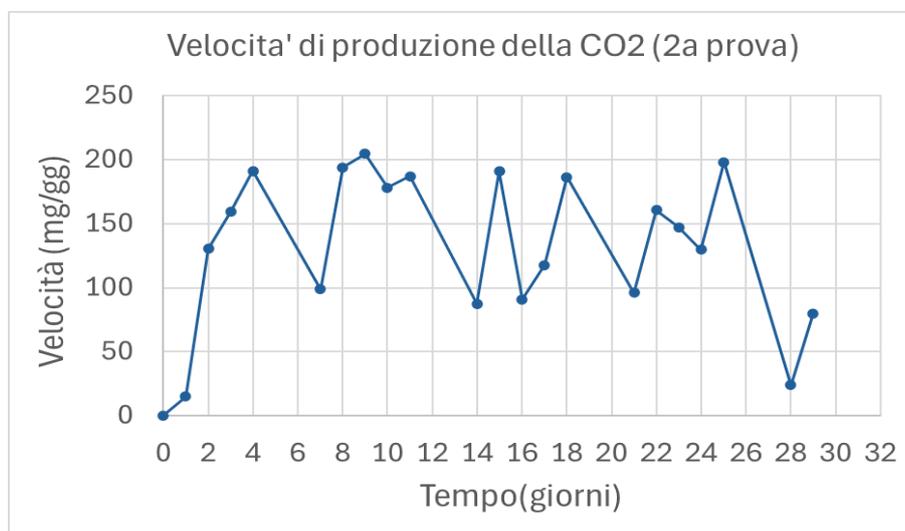


Figura 3.8 Andamento durante la SSF della velocità di produzione della CO₂ per il campione bBSG-H₂O

3.3.2 Umidità

Come emerge dalla Tabella 3.11, nella seconda prova si nota un aumento progressivo dell'umidità nel tempo dovuto al metabolismo fungino. Infatti, il campione abiotico presenta un'umidità praticamente costante e pari in media a $73 \pm 0.74\%$. Invece per il campione biotico si ha un aumento del 11% nei 29 gg di fermentazione raggiungendo un valore di umidità pari a 82.5%.

Tabella 3.11 Andamento durante la SSF dell'umidità per i campioni aBSG-H₂O e bBSG-H₂O

Tempo(giorni)	Umidità(%)	
	aBSG-H ₂ O	bBSG-H ₂ O
0	72.2	74.5
4	72.3	75.2
7	72.4	76.2
10	73.2	78.4
15	73.6	79.7
21	73.8	82.0
29	73.9	82.5

3.3.3 pH

Dalla Tabella 3.12 si nota che nei campioni abiotici il pH si mantiene relativamente stabile nel tempo, oscillando intorno a un valore medio di 5.7 ± 0.1 . Questa stabilità indica l'assenza di significative reazioni chimiche o biologiche che possano alterarne il valore. Nei campioni biotici, invece, si osserva un'evoluzione differente. In particolare, si registra una leggera e progressiva diminuzione dal tempo zero fino al 15° giorno, con un valore che passa da 5.6 a 5.2. Successivamente, il pH inizia ad aumentare, raggiungendo 6.4 al 29° giorno.

Tabella 3.12 Andamento durante la SSF dell'umidità per i campioni aBSG-H₂O e bBSG-H₂O

Tempo(gg)	pH	
	aBSG-H ₂ O	bBSG-H ₂ O
0	5.5	5.6
4	5.7	5.3
7	5.6	5.3
10	5.6	5.3
15	5.6	5.2
21	5.7	6.2
29	5.8	6.4

3.3.4 Gradi Brix e D-glucosio

Come si nota dalla Tabella 3.13 nel campione abiotico, i °Bx iniziali sono pari a 0.30 e subiscono solo una lieve diminuzione fino a raggiungere un valore pari a 0.26 al giorno 29.

Nel campione biotico, invece, si osserva una drastica diminuzione dei °Bx, che passano da 0.32 iniziali a 0.11 al termine del periodo di incubazione. Questo corrisponde a una riduzione del 65.6%. In particolare, il calo più evidente si verifica nei primi 15 giorni, con una perdita del 62.5%, suggerendo una maggior degradazione degli zuccheri nella fase iniziale. Successivamente dopo il 15°gg, il valore rimane stabile a 0.11. Questi risultati indicano che nel campione biotico gli zuccheri vengono consumati a causa del metabolismo fungino. Come si nota dalla Tabella 3.13, nei microcosmi abiotici, la concentrazione di D-glucosio rimane stabile intorno a 1.8-2 g/L per tutta la durata dell'esperimento. Al contrario, nei microcosmi biotici si osserva una progressiva riduzione della concentrazione di D-

glucosio, che passa da 2 g/L iniziali a 0.1 g/L dopo 29 giorni, con una diminuzione complessiva del 95%.

Tabella 3.13 Andamento durante la SSF dei °Bx e del D-glucosio per i campioni aBSG-H₂O e bBSG-H₂O

Tempo(gg)	Gradi Brix		D-glucosio (g/L)	
	aBSG-H ₂ O	bBSG-H ₂ O	aBSG-H ₂ O	bBSG-H ₂ O
0	0.30	0.32	2	2
4	0.32	0.31	1.9	1.8
7	0.28	0.26	1.9	1.2
10	0.30	0.20	1.8	0.87
15	0.30	0.12	1.9	0.53
21	0.28	0.11	1.8	0.18
29	0.26	0.11	1.9	0.1

3.3.5 Proteine totali e attività della laccasi

Dalla analisi della Tabella 3.14 si nota che l'andamento delle proteine totali nel campione abiotico e biotico mostra differenze significative nel tempo. Nel campione abiotico, le proteine totali rimangono stabili intorno a 0.012 g/g BSG_{secca}.

Nel campione biotico, il valore di proteine totali è pari a 0.015 g/g al tempo zero. Tuttavia, già al 7° giorno il valore aumenta a 0.030 g/g e continua a crescere fino a 0.035 g/g al 10° giorno. Il massimo di 0.035 g/g viene quindi raggiunto al 10° giorno, seguito da una stabilizzazione fino al 29° giorno.

L'attività dell'enzima laccasi (Tabella 3.14) aumenta nei primi 7 giorni di fermentazione, raggiungendo il suo massimo al 7° gg (1.41 UI/L). Tra il 7° e il 15° giorno, l'attività si mantiene stabile, con un valore medio di 1.38±0.025 UI/L. Dal 15° al 29° giorno, si osserva una graduale diminuzione, fino a raggiungere 0.85 UI/L al 29° giorno.

L'attività specifica (Tabella 3.14) cresce fino al 7° gg (47 UI/g). Tra il 7° e il 25° gg si nota una lieve diminuzione; infatti, i valori passano da 47 a 42 UI/g. successivamente si ha una diminuzione più marcata con un valore di 24 UI/g al 29°gg.

Il valore massimo di attività specifica si osserva al 7° giorno (47 UI/g), in corrispondenza del picco di attività della laccasi (1.41 UI/L). Sebbene la quantità totale di proteine continui ad aumentare fino al 10° giorno, sia l'attività della laccasi che l'attività specifica iniziano a diminuire a partire dal 7°gg. Questo indica che, fino al 7° gg, l'enzima laccasi contribuisce a determinare il valore delle proteine totali. Successivamente, anche se le proteine totali continuano ad aumentare fino al 10° giorno, tale incremento non è attribuito esclusivamente all'enzima laccasi, ma è anche il risultato della sintesi di altre proteine.

Tabella 3.14 Andamento durante la SSF delle proteine totali, dell'attività della laccasi e dell'attività specifica per i campioni aBSG-H₂O e bBSG-H₂O

Tempo(gg)	Proteine totali (g/gBSG _{secca})		Attività Laccasi (UI/L)	Attività specifica (UI/g)
	aBSG-H ₂ O	bBSG-H ₂ O	bBSG-H ₂ O	bBSG-H ₂ O
0	0.012	0.015	0	0
4	0.012	0.02	0.9	45
7	0.012	0.03	1.41	47
10	0.013	0.035	1.39	40
15	0.013	0.032	1.35	42
21	0.013	0.035	1.05	30
29	0.011	0.036	0.85	24

3.3.6 Valutazione dei polifenoli totali (TPC)

Sia la BSG prelevata dai microcosmi abiotici che quella prelevata dai microcosmi biotici, prima di essere sottoposta ad estrazione con solvente (etanolo/acqua 50:50 v/v), è stata trattata in due modi: senza pretrattamento o con pretrattamento US (540 W, 15 minuti, cicli di 5 secondi on/5 secondi off).

Come evidenziato dal grafico della Figura 3.9, nel corso del tempo, i campioni di BSG prelevati dai microcosmi abiotici ed estratti con solvente mostrano un contenuto di polifenoli costante, pari in media a 3.7 mgGAE/gBSG_{secca} (linea rossa continua in Figura 3.9). Anche i polifenoli estratti dalla BSG abiotica sottoposta a pretrattamento US rimangono stabili nel tempo, con valore medio pari a 4.8 mgGAE/gBSG_{secca} (linea rossa tratteggiata in Figura 3.9).

I cambiamenti maggiori si riscontrano nella BSG sottoposta a SSF. In questi casi, si osserva un incremento progressivo dei TP, passando da 3.8 a 6.5 mgGAE/gBSG_{secca} nei 29 giorni. Anche quando SSF e pretrattamento US vengono combinati, il contenuto di polifenoli aumenta nel tempo, raggiungendo dopo 29 giorni di fermentazione il valore più alto tra tutti, pari a 7.2 mgGAE/gBSG_{secca}.

Al 29° giorno, il pretrattamento US ha aumentato l'estrazione dei polifenoli del 30%, portando il valore a 4.8 mgGAE/gBSG_{secca} rispetto alla media dei TP estratti dalla BSG tramite solvente, pari a 3.7 mgGAE/gBSG_{secca} (linea rossa continua in Figura 3.9); il miglioramento ottenuto corrisponde ad una significatività statistica con un valore di $p=0.00064$. La sola SSF ha avuto un effetto ancora più marcato, con un incremento del 76% rispetto alla stessa media, portando il contenuto di polifenoli a 6.5 mgGAE/gBSG_{secca} al 29° giorno ($p=0.000096$). La combinazione dei due pretrattamenti ha prodotto un miglioramento ancora maggiore, con un incremento del 95% al 29° giorno ($p=0.000021$),

rispetto alla media dei TP. Questi risultati confermano l'efficacia della sinergia tra US e SSF nel potenziare l'estrazione dei polifenoli.

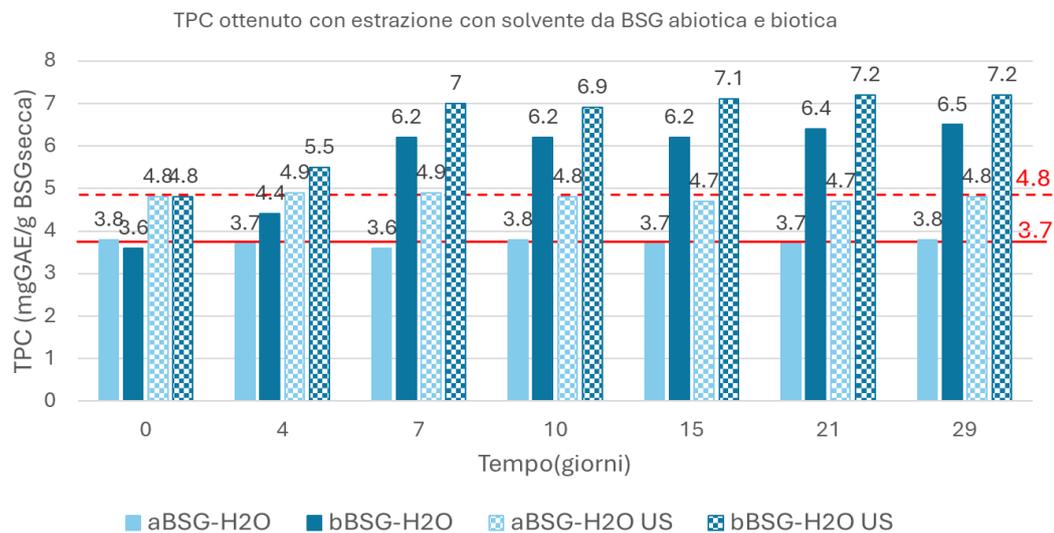


Figura 3.9 Andamento nel tempo del TPC ottenuto con estrazione con solvente da BSG, abiotica o biotica, addizionata con acqua, senza o con pretrattamento US. Le linee indicano la media del TPC ottenuto con estrazione con solvente da BSG abiotica (linea continua) e da BSG abiotica pretrattata con US (linea tratteggiata).

3.3.7 Capacità antiossidante

Come evidenziato nella Tabella 3.15, la capacità antiossidante per i campioni abiotici rimane pressoché costante e pari in media a circa $35.71 \pm 0.95\%$ per la BSG estratta solo con solvente e pari a $38.00 \pm 1.15\%$ per la BSG estratta con solvente e sottoposta a pretrattamento US. Anche in questa prova, la capacità antiossidante dei campioni estratti con il pretrattamento US è leggermente superiore (circa 2%) per tutti i tempi di sacrificio, rispetto a quelli estratti solo con solvente con un valore di $p = 0.019$. Questo indica che la differenza osservata è statisticamente significativa e c'è evidenza sufficiente per concludere che il pretrattamento US ha portato a miglioramenti nella capacità antiossidante.

Come si vede dalla Tabella 3.16, la capacità antiossidante per i campioni di BSG sottoposti a SSF aumenta nei primi 7 giorni passando da 36% a 49% e dal 40% al 55% nella BSG sottoposta a entrambi i pretrattamenti (SSF e US). Dal 7° gg al 15° gg il valore si è stabilizzato per entrambi i campioni. Invece dal 15° gg al 29° gg si è verificato un leggero calo nella capacità antiossidante per entrambi di 0.5% e di 4% rispettivamente per la BSG sottoposta a SSF e sottoposta ad entrambi i pretrattamenti.

Tabella 3.15 Andamento durante la SSF della capacità antiossidante(A%) per i campioni aBSG-H₂O e aBSG-H₂O US

Capacità antiossidante (A%) da BSG abiotica estratta con solvente		
Tempo(gg)	aBSG-H₂O	aBSG-H₂O US
0	37	39
4	36	39
7	36	39
10	35	38
15	36	38
21	36	37
29	34	36

Tabella 3.16 Andamento durante la SSF della capacità antiossidante(A%) per i campioni bBSG-H₂O e bBSG-H₂O US

Capacità antiossidante (A%) da BSG biotica estratta con solvente		
Tempo(gg)	bBSG-H₂O	bBSG-H₂O US
0	36	40
4	41	45
7	49	55
10	49.5	55
15	49.8	56
21	49.2	54
29	48.3	52

Come si nota dal grafico della Figura 3.10, il TPC e la capacità antiossidante aumentano entrambi dal tempo zero fino al 7° gg. Dopo di che i polifenoli continuano ad aumentare leggermente passando da 7 mgGAE/gBSG a 7.2 mgGAE/gBSG tra il 7° e il 29 °gg per la BSG estratta con US e solvente e da 6.2 mgGAE/gBSG a 6.5 mgGAE/gBSG nello stesso intervallo di tempo per la BSG estratta solo con solvente mentre la capacità antiossidante diminuisce leggermente a partire dal 15 °gg e fino al 29°gg. Questa differenza tra l'andamento del TPC e della capacità antiossidante potrebbero essere attribuite alla diversa tipologia di polifenoli estratti come già spiegato nel paragrafo 3.2.7.

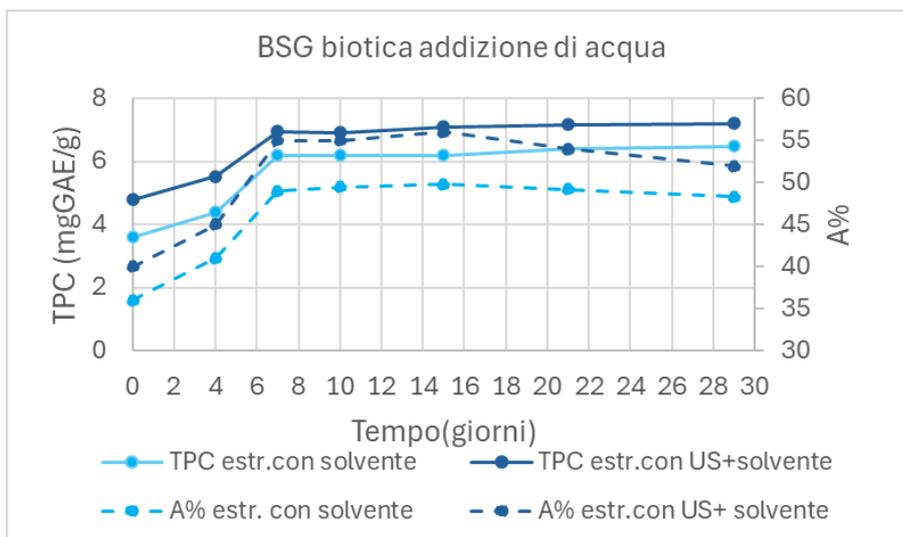


Figura 3.10 Confronto tra TPC e capacità antiossidante

3.4 Confronto dati prova 1 e prova 2

3.4.1 CO₂ media cumulata e velocità di produzione della CO₂

Come si nota dalla Figura 3.11, che riporta l'andamento della CO₂ media cumulata, a parità di tempo i valori di CO₂ prodotta nella seconda prova risultano superiori rispetto alla prima, in relazione alla maggiore frequenza di aerazione. In particolare, tra il tempo zero e il 10° giorno, i valori si discostano mediamente di circa 250 mg, per ogni punto sperimentale. Ad esempio, all'8° giorno i valori sono pari a 745.8 mg nella prima prova e a 986.0 mg nella seconda, con una differenza di 240.2 mg. Successivamente, a partire dal 10° giorno e fino al 29° giorno, la differenza diventa più marcata, aumentando progressivamente. Per esempio, al 21° giorno la differenza raggiunge i 571 mg, mentre al 29° giorno è di 715 mg.

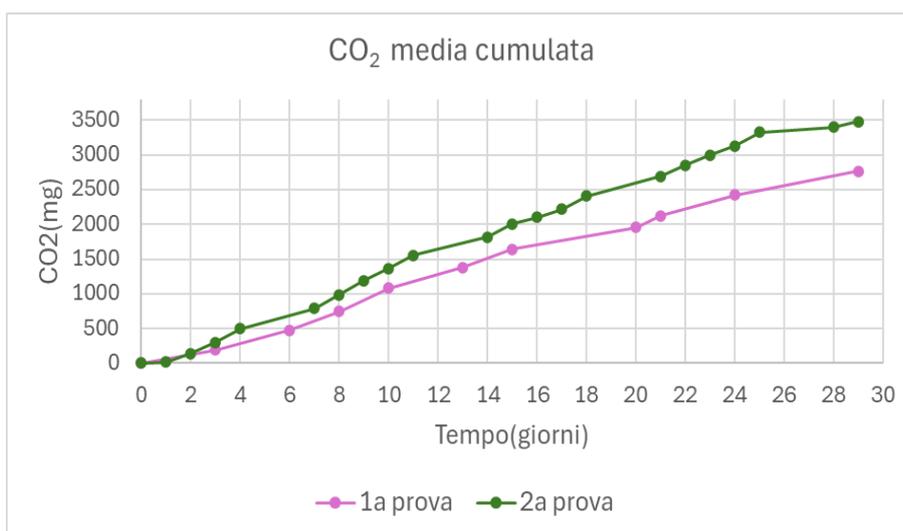


Figura 3.11 Confronto della CO₂ media cumulata per il campione bBSG-H₂O nella 1^a e nella 2^a prova

Per quanto riguarda la velocità di produzione della CO₂, come si nota dalla Figura 3.12 b), nella seconda prova a partire dal 4° gg si nota una stabilizzazione nella velocità intorno a 200 mg/giorno.

Nella prima prova (Figura 3.12 a) la stabilizzazione avviene dal 10° gg intorno a una velocità circa pari a 150 mg/giorno. In entrambe le prove, si osservano delle diminuzioni di velocità quando la frequenza di aerazione supera i 3 giorni.

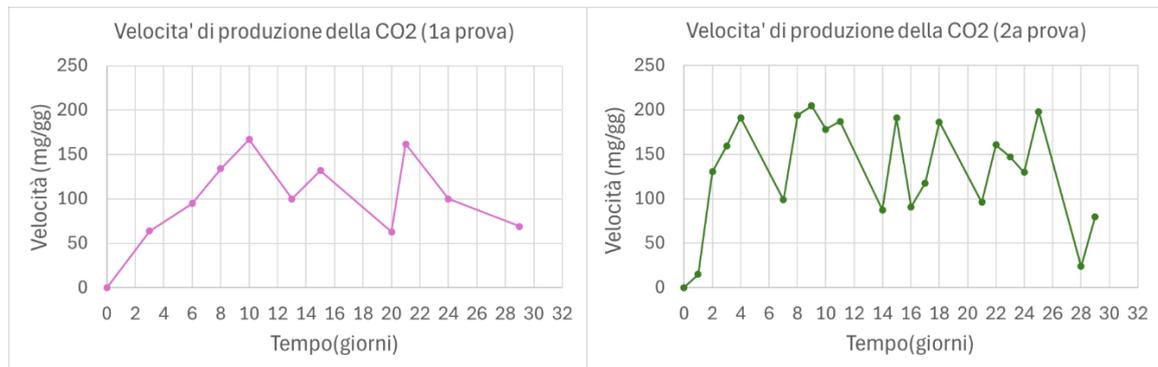


Figura 3.12 Confronto della velocità di produzione della CO₂ per il campione bBSG-H₂O nella 1^a a) e nella 2^a prova b)

3.4.2 D-glucosio

Nei campioni di BSG prelevati dai microcosmi biotici, la concentrazione di D-glucosio mostra una riduzione progressiva nel tempo, come riportato nella Tabella 3.17. Dal tempo zero fino al 29° giorno, sia nella prima che nella seconda prova, si osserva un calo significativo. In particolare, nella prima prova la riduzione complessiva è del 73%, mentre nella seconda prova è ancora più marcata, raggiungendo il 95%, probabilmente imputabile alla maggior frequenza di aerazione.

Anche nello studio di [41] si è mostrata una riduzione complessiva del glucosio pari a 88.1 % dopo 196 ore di fermentazione della BSG con una specie di *Rhizopus*.

Tabella 3.17 Confronto del D-glucosio per il campione bBSG-H₂O nella 1^a e nella 2^a prova

Tempo(giorni)	D-glucosio(g/L)	
	1 ^a prova bBSG-H ₂ O	2 ^a prova bBSG-H ₂ O
0	2.00	2.00
4	/	1.80
7	1.97	1.20
10	1.15	0.87
15	1.00	0.53
21	0.54	0.18
29	0.49	0.10

3.4.3 Proteine totali e attività della laccasi

I campioni di BSG prelevati dai microcosmi biotici mostrano un aumento progressivo delle proteine totali nel tempo, come evidenziato nella Tabella 3.18. Nella prima prova, il valore delle proteine totali aumenta progressivamente dal tempo zero, raggiungendo il massimo di 0.033 g/gBSG_{secca} al 15° giorno. Dopo il 15° giorno, i valori si stabilizzano intorno a 0.031 g/gBSG_{secca} fino al 29° giorno.

Nella seconda prova, il valore delle proteine totali parte da 0.015 g/g al tempo zero e cresce rapidamente raggiungendo 0.030 g/gBSG_{secca} già al 7° gg. Il massimo di 0.035 g/g viene quindi raggiunto al 10° giorno e rimane stabile fino al 29° giorno.

Un altro studio di Ibaburri et al. [41] ha mostrato che la BSG fermentata con una specie di *Rhizopus* presenta un contenuto proteico 6,5 volte maggiore rispetto a quello della BSG non fermentata. Il valore massimo di proteine solubili si ottiene dopo 192 ore di fermentazione, ovvero circa 8 giorni, con un contenuto pari a 29.5 ± 6.2 mg/g di materia secca (DM). Questo risultato è confrontabile con quello ottenuto nel presente lavoro di tesi nella seconda prova, dove il contenuto proteico della BSG secca è risultato essere di 35 mg/g al 10° gg.

L'attività dell'enzima laccasi (vedi Tabella 3.18) aumenta nel tempo, raggiungendo il valore massimo al 10° giorno nella 1^a prova (1.32 UI/L) e al 7° giorno nella 2^a prova (1.40 UI/L). Dopo il 15° giorno, entrambe le prove mostrano un calo dell'attività, con valori simili al 29° giorno (0.79 UI/L per la prima prova 0.85 UI/L per la seconda prova).

Fino al 7° giorno, l'attività della laccasi nella 2^a prova risulta in media circa il 25% più alta rispetto alla 1^a prova. Tuttavia, a partire da quel momento e fino al 29° giorno, la differenza tra le due prove si riduce, attestandosi su una media del 18%.

Tabella 3.18 Confronto delle proteine totali dell'attività della laccasi per il campione bBSG-H2O nella 1^a e nella 2^a prova

Tempo(giorni)	Proteine totali (g/g BSG _{secca})		Attività Laccasi (UI/L)	
	1 ^a prova	2 ^a prova	1 ^a prova	2 ^a prova
	bBSG-H2O	bBSG-H2O	bBSG-H2O	bBSG-H2O
0	0.012	0.015	0	0
4	/	0.02	/	0.9
7	0.019	0.03	1.09	1.41
10	0.025	0.035	1.32	1.39
15	0.033	0.032	1.07	1.35
20	0.032	0.035	0.85	1.05
29	0.031	0.036	0.79	0.85

3.4.4 Valutazione dei polifenoli totali (TPC)

In questo paragrafo, si analizza l'estrazione dei TP con solvente dalla BSG tritata e addizionata con acqua. Si confrontano i miglioramenti ottenuti nella prima e nella seconda prova grazie al pretrattamento SSF e alla combinazione di SSF e US che hanno preceduto l'estrazione con solvente.

Nella prima prova, durante l'estrazione dei polifenoli con solvente dalla BSG sottoposta a SSF, i TP sono aumentati nel tempo, registrando un incremento del 32% nei 29 giorni di

fermentazione. Nella seconda prova, invece, con un'aerazione più frequente, l'incremento è stato ancora più significativo, raggiungendo il 71% nello stesso intervallo di tempo.

Quando prima dell'estrazione con solvente si combinano i due tipi di pretrattamenti (SSF con US), il miglioramento rispetto alla sola estrazione con solvente è ancora più significativo. Infatti, nella prima prova si ha un miglioramento del 76% nei 29° gg di fermentazione, mentre nella seconda prova il miglioramento è stato ancora maggiore e pari al 89%, confermando ancora una volta l'effetto positivo della maggior frequenza di aerazione sul metabolismo fungino.

I risultati ottenuti nella seconda prova al 7°gg (6.2 mgGAE/gBSG_{secca}) sono superiori rispetto a quelli riportati da Ibaburri et al. [41], che hanno osservato che, dopo 196 ore (circa 8 gg) di fermentazione con *Rhizopus* e utilizzando l'acqua come solvente di estrazione, il TPC era 9 volte maggiore rispetto alla BSG non fermentata, raggiungendo una concentrazione di $2.043 \pm 0,114$ mg GAE/g BSG_{secca}. Questa differenza potrebbe essere dovuta al diverso ceppo fungino utilizzato, ma anche al fatto che nel loro studio è stata impiegata l'acqua come solvente per l'estrazione. Infatti, nello studio di [23] evidenzia che miscele di solventi organici con l'acqua sono più efficaci nell'estrazione dei composti fenolici.

I risultati ottenuti presentano alcune differenze rispetto a quelli riportati nel lavoro di tesi precedente [58]. In quel lavoro, la BSG è stata pretrattata tramite SSF con *P. chrysosporium* prima dell'estrazione con solvente, utilizzando una miscela acqua/etanolo (50:50, v:v). In quello studio, i microcosmi sono stati inizialmente incubati a 39°C, con uno shift di temperatura a 30°C dopo 2 giorni, e sottoposti ad aerazione ogni 24 ore, ad eccezione del fine settimana. Al 10° giorno di fermentazione, il valore di TPC era pari a 5.0 mg GAE/g di BSG_{secca}, un risultato inferiore rispetto a quello ottenuto nella seconda prova del presente lavoro, in cui al 10° giorno si è raggiunto un valore di 6.2 mg GAE/g di BSG_{secca}.

Anche Tisma et al. [42] hanno osservato un aumento progressivo del TPC grazie alla SSF della BSG con *Trametes versicolor*, con un incremento da 2.5 mg/g di materia secca (DM) a 8.7 mg/g DM nei 14 giorni di fermentazione. Questo valore risulta leggermente superiore rispetto a quello ottenuto nella seconda prova del presente lavoro di tesi, che ha registrato 6.2 mg GAE/g di BSG secca al 15° giorno di fermentazione. Tale differenza potrebbe essere attribuita principalmente al ceppo fungino utilizzato, che potrebbe avere una maggiore capacità di produrre enzimi in grado di degradare la lignina contenuta nella BSG, rendendo così i polifenoli più disponibili.

Nello studio di Da Costa Maia [38], dopo 3 giorni di fermentazione della BSG proveniente da una birra Pilsner, il miglior risultato è stato ottenuto con *Aspergillus oryzae* (8.45 ± 0.66 mg GAE/g BSG_{secca}). Anche in questo caso, il risultato è superiore rispetto ai 6.2 mg GAE/g BSG_{secca} ottenuti nella seconda prova al 7° gg a causa del differente ceppo fungino utilizzato e della differente procedura di estrazione dei TP adottata. Nel lavoro di Da Costa Maia,

infatti, sono stati impiegati Celite e una soluzione etanolica (80% v/v acqua), con una concentrazione diversa rispetto a quella utilizzata nel presente studio.

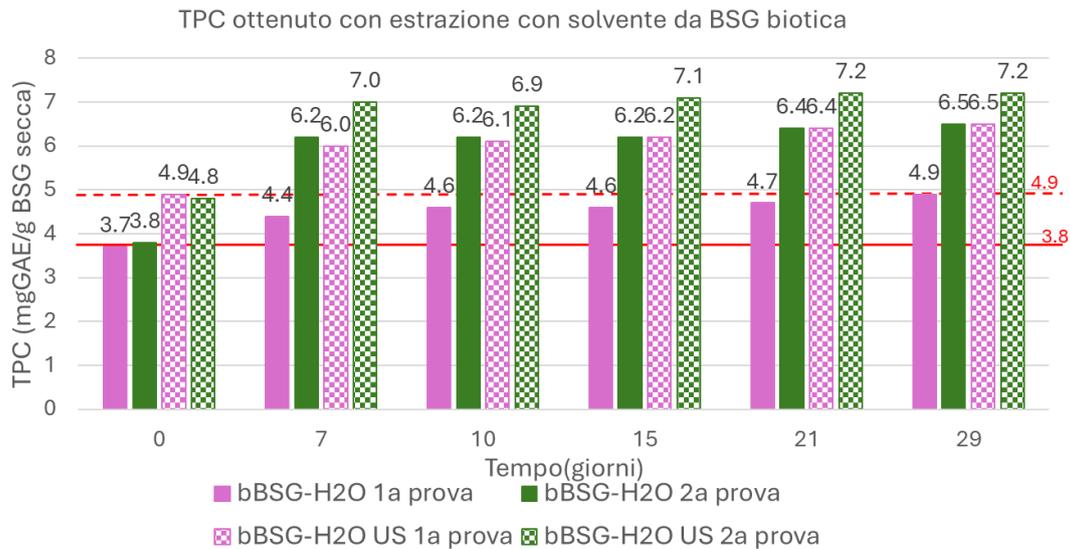


Figura 3.13 Andamento nel tempo del TPC ottenuto con estrazione con solvente da BSG biotica addizionata con acqua, senza o con pretrattamento US, nella 1^a prova e nella 2^a prova. Le linee rosse indicano la media del TPC ottenuto con estrazione con solvente nella 1^a e nella 2^a prova da BSG abiotica (linea continua) e da BSG abiotica pretrattata con US (linea tratteggiata).

3.4.5 Capacità antiossidante

Come evidenziato nella Tabella 3.19, nella prima prova la capacità antiossidante dei polifenoli estratti con solvente dalla BSG pretrattata tramite SSF è aumentata nei primi 10 giorni, passando dal 37% al 52%. Successivamente, fino al 29° giorno, i valori sono rimasti relativamente stabili, con una media del 50%.

Nella seconda prova, i valori ottenuti sono simili alla prima. Infatti, si osserva un incremento nei primi 7 giorni, con un aumento dal 36% al 49%, seguito da un assestamento attorno a un valore medio di 49.2%.

L'estrazione con solvente dalla BSG sottoposta sia a SSF che a US ha mostrato, in entrambe le prove, valori di capacità antiossidante più elevati rispetto a quelle dei polifenoli estratti dalla BSG pretrattata solo con SSF, con risultati simili tra la prima e la seconda prova. Nella prima prova, i valori sono aumentati nei primi 7 giorni, passando dal 36% al 49%, mentre nella seconda prova l'incremento è stato da 40% a 55.2% nello stesso intervallo di tempo. In entrambe le prove, a partire dal 7° giorno, i valori si sono stabilizzati attorno al 49.5% nella prima prova e a valori leggermente superiori (54%) nella seconda

Tabella 3.19 Confronto della capacità antiossidante per i campioni bBSG-H2O e bBSG-H2O US nella 1^a e nella 2^a prova

Capacità antiossidante (A%) da BSG biotica estratta con solvente				
Tempo (giorni)	1 ^a prova	2 ^a prova	1 ^a prova	2 ^a prova
	bBSG- H2O	bBSG-H2O	bBSG- H2O US	bBSG- H2O US
0	37	36.0	39	40.0
4	/	41.0	/	45.1
7	41	49.0	43	55.2
10	51	49.5	53	55.3
15	52	49.8	54	56.1
21	48	49.2	50	54.2
29	49	48.3	51	52.0

4 CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

In questo lavoro di tesi è stata studiata la valorizzazione della BSG per l'estrazione di composti polifenolici attraverso due tipologie di pretrattamenti sulla BSG triturrata: pretrattamento biologico tramite SSF con *P. chrysosporium* e pretrattamento fisico tramite US. L'obiettivo è stato valutare l'efficacia di ciascun pretrattamento, singolarmente e in combinazione, nell'estrazione dei polifenoli totali mediante una miscela acqua/etanolo.

Per questo scopo, sono state condotte due prove di SSF in microcosmi chiusi, utilizzando beute Erlenmeyer contenenti 40 g di BSG triturrata manualmente tramite mezzaluna. Le due prove hanno adottato condizioni diverse per cercare di ottimizzare il metabolismo fungino: nella prima prova sono stati aggiunti micronutrienti (Basal III medium) alla BSG, mentre nella seconda è stata usata un'aerazione più frequente.

Le analisi effettuate durante la fermentazione hanno confermato che *P. chrysosporium* è in grado di crescere sulla BSG, come evidenziato dall'aumento nel tempo della CO₂, dell'umidità e delle proteine totali, accompagnato dalla diminuzione dei °Bx e del D-glucosio. Inoltre, il fungo ha prodotto l'enzima laccasi durante la SSF, determinando un incremento progressivo nel contenuto di polifenoli totali estratti e della loro capacità antiossidante.

Il pretrattamento US ha migliorato l'estrazione dei polifenoli rispetto alla semplice estrazione con solvente dalla BSG triturrata, ma il TPC nei campioni pretrattati con US si è mantenuto stabile nel tempo con risultati analoghi nella prima e nella seconda prova. Al contrario, la SSF ha prodotto un aumento progressivo dei polifenoli totali estratti, raggiungendo il massimo al 29° giorno in entrambe le prove. Questo dimostra che la SSF è particolarmente vantaggiosa, poiché il rilascio di polifenoli continua a crescere nel tempo e può essere ulteriormente migliorato ottimizzando le condizioni di fermentazione, tra cui la frequenza di aerazione. Infatti, al 29° giorno, il TPC ha raggiunto 6.5 mgGAE/g BSG nella Prova 2, con un'aerazione più frequente (+76% rispetto alla media dei TPC estratti con solvente), evidenziando l'influenza positiva della maggior frequenza di aerazione sulla crescita del fungo e conseguentemente sul rilascio di polifenoli. Al contrario i risultati della prova 1 hanno dimostrato che non è necessaria l'addizione di micronutrienti.

Infine, la combinazione dei due pretrattamenti (SSF e US) ha determinato un incremento notevole nell'estrazione dei polifenoli, con un aumento al 29° giorno di fermentazione del 67% nella Prova 1 e dell'95% nella Prova 2 rispetto alla media dei TPC estratti da BSG triturrata sottoposta ad estrazione con solvente. Questo conferma che l'integrazione di SSF e US rappresenta una strategia efficace per massimizzare l'estrazione dei polifenoli dalla BSG triturrata.

Una possibile prospettiva di studio riguarda l'ottimizzazione del rapporto carbonio/azoto (C/N) nel processo di fermentazione della BSG, poiché un bilanciamento adeguato tra questi due elementi è cruciale per il metabolismo fungino e per la produzione di enzimi ligninolitici. Questi enzimi, infatti, idrolizzando i legami della lignina, rendono i polifenoli più facilmente estraibili. In quest'ottica quindi l'ottimizzazione futura del rapporto C/N potrebbe essere vantaggiosa per ottenere una produzione maggiore di enzimi.

P. chrysosporium è un fungo che dipende fortemente dalla presenza di ossigeno per la sua crescita e per la produzione enzimatica. Infatti, nel contesto del presente lavoro di tesi, è stato dimostrato che aumentando la frequenza dell'aerazione, i TP erano più elevati. Inoltre, in uno studio [55], è stato osservato che colture di *P. chrysosporium* esposte ad un'atmosfera di ossigeno puro presentano attività enzimatiche significativamente superiori rispetto a quelle esposte all'aria atmosferica.

Per questo motivo, potrebbe essere vantaggioso esplorare altre specie fungine, come quelle del genere *Rhizopus*, che sono meno esigenti dal punto di vista dell'ossigeno.

5 ABBREVIAZIONI

BSG: Brewer's spent grain

B_{III}M: Basal III medium

°Bx: gradi Brix

CA: capacità antiossidante

2,6-DMP: 2,6- dimetilfenolo

G6P-DH: glucosio-fosfato-deidrogenasi

G6P: glucosio-6-fosfato deidrogenasi

HK: esochinasi

LIP: lignina perossidasi

MEA: Malt extract agar

NADH: nicotinammia adenina dinucleotide

MnP: perossidasi manganese dipendente

ROS: specie reattive dell'ossigeno

SSF: fermentazione allo stato solido

TPC: contenuto di polifenoli totali

TP: polifenoli totali

UAE: estrazione assistita da ultrasuoni

US: sonda ad ultrasuoni

bBSG-H₂O: BSG prelevata da microcosmo biotico addizionata di acqua

bBSG-B_{III}M: BSG prelevata da microcosmo biotico e addizionata di Basal III medium

aBSG-H₂O: BSG prelevata da microcosmo abiotico e addizionata di acqua

aBSG-B_{III}M: BSG prelevata da microcosmo abiotico e addizionata di Basal III medium

bBSG: BSG prelevata da microcosmo biotico

aBSG: BSG prelevata da microcosmo abiotico

aBSG-H₂O US: BSG prelevata da microcosmo abiotico, addizionata con acqua e pretrattata con sonda ad ultrasuoni

aBSG-B_{III}M US: BSG prelevata da microcosmo abiotico, addizionata con Basal III medium e pretrattata con sonda ad ultrasuoni

bBSG-H₂O US: BSG prelevata da microcosmo biotico, addizionata con acqua e pretrattata con sonda ad ultrasuoni

bBSG-B_{III}M US: BSG prelevata da microcosmo biotico, addizionata con Basal III medium e pretrattata con sonda ad ultrasuoni

6 BIBLIOGRAFIA

- [1] M. Paula, L. Juliana e M. Vilásia, «Potential valorization opportunities for Brewer's spent grain,» *European Food Research and Technology*, vol. 249, n. 10, pp. 1-13, 2023.
- [2] S. Mussatto, G. Dragone e I. Roberto, «Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications,» *Journal of Cereal Science*, vol. 43, pp. 1-14, 2004.
- [3] H. M. Eßlinger, *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*, Weinheim: WILEY-VCH, 2009.
- [4] D. E. Briggs, C. A. Boulton, P. A. Brookes e R. Stevens, *Brewing science and practice*, Abington Cambridge CB1 6AH, England: Woodhead Publishing Limited, 2004.
- [5] K. M. Lynch, E. J. Steffen e E. K. Arendt, «Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health,» *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 122, n. 4, 2016.
- [6] G. P. Fox e H. M. Bettenhausen, «Variation in quality of grains used in malting and brewing,» *Front Plant Sci.*, vol. 14, 2023.
- [7] S. A. Socaci, A. C. Farcas, Z. M. Diaconeasa, D. C. Vodnar, B. Rusu e M. Tofana, «Influence of the extraction solvent on phenolic content, antioxidant, antimicrobial and antimutagenic activities of brewers' spent grain,» *Journal of Cereal Science*, vol. 80, pp. 180-187, 2018.
- [8] R. Macias-Garbett, S. O. Serna-Hernández, J. E. Sosa-Hernández e R. Parra-Saldívar, «Phenolic Compounds From Brewer's Spent Grains: Toward Green Recovery Methods and Applications in the Cosmetic Industry,» *Frontiers in Sustainable Food Systems*, vol. 5, 2021.
- [9] S. Mitri, S.-J. Salameh, A. Khelifa, E. Leonard, R. Maroun, N. Louka e M. Koubaa, «Valorization of Brewers' Spent Grains: Pretreatments and Fermentation, a Review,» *Fermentation*, vol. 8, n. 50, 2022.
- [10] Mariane de Paula, Juliana Machado Latorres e Vilásia Guimarães Martins, «Potential valorization opportunities for Brewer's spent grain,» *European Food Research and Technology*, vol. 249, p. 2471–2483, 2023.
- [11] M. Jackowski, zwiecki, K. Jagiełło, O. U. ' e A. Trusek, «Brewer's Spent Grains—Valuable Beer Industry By-Product,» *biomolecules*, vol. 10, n. 12, p. 1669, 2020.
- [12] R. Vitanza, A. Cortesi, V. Gallo e I. Colussi, «Biovalorization of Brewery Waste by Applying Anaerobic Digestion,» *Chem. Biochem. Eng.*, vol. 30, n. 3, p. 351–357, 2016.
- [13] F. C. Ezeonu e A. N. C. Okaka, «Process Kinetics and Digestion Efficiency of Anaerobic Batch Fermentation of Brewer's Spent Grains (BSG),» *Process Biochemistry*, vol. 31, n. 1, pp. 7- 12, 1996.

- [14] M. Cater, L. Fanedl, Š. Malovrh e R. M. Logar, «Biogas production from brewery spent grain enhanced,» *Bioresource Technology*, vol. 186, p. 261–269, 2015.
- [15] K. VI e S. P.K, « Incorporation of brewery waste in supplementary feed and its impact on growth in some carps.,» *Bioresour Technol*, vol. 91, n. 1, pp. 101-104, 2004.
- [16] J. Nazzaro, D. S. M. A.M, Perez-Vendrellc, L. Padrell, B. Iñarrab, M. Oriveb e A. Estévez, «Apparent digestibility coefficients of brewer's by-products used in feeds for,» *Aquaculture*, vol. 530, 2021.
- [17] N. Belibasakis e D.Tsirgogianni, «Effects of wet brewers grains on milk yield, milk composition and blood components of dairy cows in hot weather,» *Animal Feed Science and Technology*, vol. 57, n. 3, pp. 175-181, 1996.
- [18] B. Gebremedhn, M. Niguse, B. Hagos, T. Tesfamariam e T. Kidane, «Effects of Dietary Brewery Spent Grain Inclusion on Egg Laying Performance and Quality Parameters of Bovans Brown Chickens,» *Brazilian Journal of Poultry Science*, vol. 21, n. 2, pp. 1-10, 2019.
- [19] F. Nocente, F. Taddei, E. Galassi e L. Gazza, «Upcycling of brewers' spent grain by production of dry pasta with higher,» *LWT*, vol. 114, 2019.
- [20] N. C. Steinmacher, F. A. Honna, A. V. Gasparetto, D. Anibal e M. V. Grossmann, «Bioconversion of brewer's spent grains by reactive extrusion and their application in bread-making,» *Food Science and Technology*, vol. 46, n. 2, pp. 542-547, 2012.
- [21] Y. Lang, N. Gao, Z. Zang, X. Meng, Y. Lin, S. Yang, Y. Yang, Z. Jin e B. Li, «Classification and antioxidant assays of polyphenols: a review,» *Journal of Future Foods*, vol. 4, n. 3, pp. 193-204, 2024.
- [22] E. M. M. B. M. Z. L. D. L. M. E. H. M. M. S. E. Céline Leitao, «Fate of polyphenols and antioxidant activity of barley throughout malting and brewing,» *Journal of Cereal Science*, vol. 55, n. 3, pp. 318-322, 2012.
- [23] R. Macias-Garbett, S. O. Serna-Hernández, J. E. Sosa-Hernández e R. Parra-Saldívar, «Phenolic Compounds From Brewer's Spent Grains: Toward Green Recovery Methods and Applications in the Cosmetic Industry,» *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2021.
- [24] S. M. D. O. C. A. A. B. C. D.-M. L. F. G. Manuela M. Moreira, «Brewer's spent grain from different types of malt: Evaluation of the antioxidant activity and identification of the major phenolic compounds,» *Food Research International*, vol. 54, n. 1, pp. 382-388, 2013.
- [25] R. C. R. P. Nikheel Bhojraj Rathod M. Sc., S. B. PhD, S.-K. K. PhD, A. U. P. PhD, S. P. PhD e F. O. PhD, «Rathod NB, Recent developments of natural antimicrobials and antioxidants on fish and fishery food products,» *Compr Rev Food Sci Food Saf.*, vol. 20, p. 4182–4210., 2021.
- [26] D. Crowley, Y. O'Callaghan, A. L. McCarthy, A. Connolly, R. J. Fitzgerald e N. M. O'Brien, «Aqueous and enzyme-extracted phenolic compounds from brewers'

- spent grain (BSG): Assessment of their antioxidant potential,» *Food Biochemistry*, 2017.
- [27] M. Almendinger, S. Rohn e D. Pleissner, «Malt and beer-related by-products as potential antioxidant skin-lightening agents for cosmetics,» *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, vol. 17, 2020.
- [28] F. F. d. Araújo, D. d. P. Farias, I. A. Neri-Numa e G. M. Pastore, «Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential,» *Food Chemistry*, vol. 338, 2021.
- [29] W. Routray e V. Orsat, «Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review,» *Food Bioprocess Technol.*, vol. 5, pp. 409-424, 2011.
- [30] L. F. Guido e &. M. M. Moreira, «Techniques for Extraction of Brewer's Spent Grain,» *Critical reviews in food science & nutrition.*, 2020.
- [31] R. A. Carciochi, C. A. Sologubik, M. B. Fernández, G. D. Manrique e L. G. D'Alessandro, «Extraction of Antioxidant Phenolic Compounds from Brewer's Spent Grain: Optimization and Kinetics Modeling,» *antioxidants*, 2018.
- [32] A. B. Das, V. V. Goud e C. Das, «Extraction of phenolic compounds and anthocyanin from black and purple rice bran (*Oryza sativa* L.) using ultrasound: A comparative analysis and phytochemical profiling,» *Industrial Crops and Products*, vol. 95, p. 332–341, 2017.
- [33] R. Iadecola, R. Ciccoritti, B. Ceccantoni, A. Bellincontro e T. Amoriello, «Optimization of Phenolic Compound Extraction from Brewers' Spent Grain Using Ultrasound Technologies Coupled with Response Surface Methodology,» *sustainability*, vol. 14, 2022.
- [34] R. Cabrera, P. Andrea, A. S. L. Pérez e C. A. G. Fajardo, «Innovative Design of a Continuous Ultrasound Bath for Effective Lignocellulosic Biomass Pretreatment Based on a Theoretical Method,» *Inventions*, vol. 9, n. 5, 2024.
- [35] C. Mollea e F. Bosco, «Solid-State Fermentation of Brewery Spent Grains to Enhance Biomolecule Extraction,» *Separations*, vol. 12, n. 58, 2025.
- [36] P. Alonso-Riaño, M. T. S. Diez, B. Blanco, S. Beltrán, E. Trigueros e O. Benito-Román, «Water Ultrasound-Assisted Extraction of Polyphenol Compounds from Brewer's Spent Grain: Kinetic Study, Extract Characterization, and Concentration,» *Antioxidants*, vol. 9, n. 3, p. 265, 2020.
- [37] M. Sankar, R. M. Mathew, A. Puthiyamadham, A. Sreeja-Raju, M. Christopher, D. V. Gokhale e R. K. Sukumaran, «Comparison of the solid-state and submerged fermentation derived secretomes of hyper-cellulolytic *Penicillium janthinellum* NCIM 1366 reveals the changes responsible for differences in hydrolytic performance,» *Bioresource Technology*, vol. 371, 2023.
- [38] C. T. d. S. D. D. M. G. F. E. d. C. C. L. C. C. J. F. D. M. S. L. F. Ingrid da Costa Maia, «Effect of solid-state fermentation over the release of phenolic compounds from brewer's spent grain revealed by UPLC-MSE,» *LWT*, vol. 133, 2020.

- [39] R. J. S. d. Castro e H. H. Sato, «Enzyme Production by Solid State Fermentation: General Aspects and an Analysis of the Physicochemical Characteristics of Substrates for Agro-industrial Wastes Valorization,» *Waste and Biomass Valorization*, vol. 6, p. 1085–1093, 2015.
- [40] J. J. J. M. R. P. A. D. E. J. M. U. D. N. A. T. S. Herman Suryadi, «Biodelignification of lignocellulose using ligninolytic enzymes from white-rot fungi,» *Helyon*, vol. 8, n. 2, 2022.
- [41] Jone Ibaruri, Marta Cebrián e Igor Hernández, «Solid State Fermentation of Brewer's Spent Grain Using *Rhizopus* sp. to Enhance Nutritional Value,» *Waste and Biomass Valorization*, vol. 10, p. 3687–3700, 2019.
- [42] M. Tišma, A. Jurić, A. Bucić-Kojić e M. Panjičko, «Biovalorization of brewers' spent grain for the production of laccase and polyphenols,» *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 124, n. 2, 2018.
- [43] J. Cervantes-Ramirez, F. Vasquez-Lara, A. Sanchez-Estrada, R. Troncoso-Rojas, E. Heredia-Olea e A. Islas-Rubio, «Arabinoxylans Release from Brewers' Spent Grain Using Extrusion and Solid-State Fermentation with *Fusarium oxysporum* and the Antioxidant Capacity of the Extracts,» *Foods*, vol. 11, n. 10, p. 1415, 2022.
- [44] D. Singh e S. Chen, «The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes,» *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 81, p. 399–417, 2008.
- [45] G. Doran e A. Zander, «An Improved Method for Measuring Soil Microbial Activity by Gas Phase Flow Injection Analysis,» *Revista Brasileira De Ciência Do Solo*, vol. 36, 2012.
- [46] A. Bucić-Kojić, G. Šelo, B. Zelić, M. Planinić e M. Tišma, «Recovery of Phenolic Acid and Enzyme Production from Corn Silage Biologically Treated by *Trametes versicolor*,» *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 181, p. 948–960, 2017.
- [47] M. J. Martinez, L. Caramelo e A. Martinez, «A Search for Ligninolytic Peroxidases in the Fungus *Pleurotus eryngii* Involving α -Keto- γ -Thiomethylbutyric Acid and Lignin Model Dimers,» *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, n. 3, p. 916–922, 1999.
- [48] S. Vijayalaxmi, S. K. Jayalakshmi e K. Sreeramulu, «Polyphenols from different agricultural residues: extraction, identification and their antioxidant properties,» *J Food Sci Technol*, vol. 52, n. 5, p. 2761–2769, 2015.
- [49] K. V. KONAN, C. L. Tien e M. A. MATEESCU, «Electrolysis induced fast activation of the ABTS reagent for antioxidant capacity assay,» *Analytical Methods*, vol. 8, 2016.
- [50] I. d. C. Maia, C. T. d. S. D'Almeida, D. M. G. Freire, E. d. C. Cavalcanti, L. C. Cameron, J. F. Dias e M. S. L. Ferreira, «Effect of solid-state fermentation over the release of phenolic compounds from brewer's spent grain revealed by UPLC-MSE,» *LWT*, vol. 133, 2020.

- [51] B. Argyro, B. Yiannis, B. Ibrahim e K. Maria, «Upgrading Brewer's Spent Grains by Treatment With *Aspergillus* Species,» *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, vol. 13, 2007.
- [52] S. I. Mussatto e I. C. Roberto, «Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain,» *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 81, pp. 268-274, 2006.
- [53] M. Hayes, «Measuring Protein Content in Food: An Overview,» *Foods*, vol. 9, n. 10, 2020.
- [54] R. I. Birsan, P. Wilde, K. W. Waldron e D. K. Rai, «Recovery of Polyphenols from Brewer's Spent Grains,» *antioxidants*, vol. 8, n. 9, 2019.
- [55] B. P.A, F. N, L. S, G. S e D. CG, «Reactive oxygen species and induction of lignin peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*,» *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, n. 11, p. 6500–6506, 2003.
- [56] L. Zacchi, J. M. Palmer e P. J. Harvey, «Respiratory pathways and oxygen toxicity in *Phanerochaete chrysosporium*,» *FEMS Microbiology Letters*, vol. 183, n. 1, pp. 153-157, 2000.
- [57] M. Breitenbach, M. Weber, M. Rinnerthaler, T. Karl e L. Breitenbach-Koller, «Oxidative Stress in Fungi: Its Function in Signal Transduction, Interaction with Plant Hosts, and Lignocellulose Degradation,» *biomolecules*, vol. 5, n. 2, pp. 318-342, 2015.
- [58] V. d. Biasi e F. Bosco, «Valorizzazione di scarti da birrificazione per produzione di enzimi ligninolitici e polifenoli,» Torino, 2024.