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

Produzione di carotenoidi attraverso fermentazione di *Rhodotorula mucilaginosa* con sciroppo di Brewer's Spent Grain

Relatore

prof.ssa Francesca Bosco

Candidato

Lorenzo Billotti

Settembre 2026

Un sentito ringraziamento all'Ing. Davide Forna
per aver fornito la BSG necessaria
al seguente lavoro di tesi.

Indice

1. Introduzione 1
1.1 Processo di produzione della birra 1
1.1.1 Utilizzi attuali della BSG 3
1.2 Carotenoidi 5
1.2.1 Produzione di carotenoidi 6
1.2.2 Processi di produzione microbiologici di carotenoidi presenti in letteratura 7
1.3 Rhodotorula mucilaginosa 10
2. Materiali e metodi 12
2.1 Brewery Spent Grain (BSG) 12
2.2 Preparazione dello sciroppo di BSG 12
2.3 Microrganismo 12
2.4 Fermentazioni in beuta 13
2.4.1 Prove in beuta in modalità fed-batch 14
2.5 Fermentazioni in bioreattore 15
2.5.1 Condizioni di fermentazione in reattore con sciroppo di BSG in modalità batch 17
2.6 Estrazione dei carotenoidi. 17
2.6.1 Preparazione della biomassa per l'estrazione 17
2.6.2 Pretrattamento della biomassa 17
2.6.2 Estrazione 18
2.7 Valutazioni analitiche 19
2.7.1 Valutazione del pH della BSG 19
2.7.2 Determinazione del peso secco della BSG 19
2.7.3 Determinazione del peso secco della biomassa 19
2.7.4 Misurazione del pH 19
2.7.5 Determinazione della concentrazione di glucosio 19
2.7.6 Determinazione delle proteine totali 20
2.7.7 Determinazione della quantità di carotenoidi totali estratti 21
2.8 Analisi dei risultati 21
3. Risultati e discussione 22
3.1 Preparazione e caratterizzazione della BSG 22
3.2 Preparazione dello sciroppo e caratterizzazione 22
3.3 Fermentazioni in beuta con terreno YM 23
3.4 Ottimizzazione del protocollo di estrazione dei carotenoidi 26
3.4.1 Pretrattamento di Freeze and Thaw 27

3.4.2 Riduzione del numero di cicli di estrazione con DMSO (Metodo 2) 28
3.4.3 Riduzione del volume di acetone utilizzato (Metodo 3) 31
3.5.4 Confronto tra le prove di estrazione 33
3.5 Fermentazione in beuta con sciroppo di BSG 35
3.5.1 Fermentazione in beuta con sciroppo di BSG in modalità batch 35
3.5.2 Fermentazione in beuta con sciroppo di BSG in modalità fed-batch 38
3.5.2.1 Fermentazione in beuta con sciroppo di BSG a fed-batch singolo effettuato a 24 ore (FB24) 39
3.5.2.2 Fermentazione in beuta con sciroppo di BSG a fed-batch singolo effettuato a 48 ore (FB48) 41
3.5.2.3 Fermentazione in beuta con sciroppo di BSG a doppio fed-batch: FB24-24 44
3.5.2.4 Fermentazione in beuta con sciroppo di BSG FB48-24 46
3.5.3 Confronto tra le prove in beuta 48
3.6 Fermentazioni in bioreattore in modalità batch 56
3.6.1 Prova 1 in modalità batch in bioreattore 57
3.6.2 Prova 2 in modalità batch in bioreattore 59
3.6.3 Confronto tra le prove in bioreattore 61
4. Conclusioni e sviluppi futuri 66
5. Bibliografia 68

1. Introduzione

Il cambiamento climatico, l'inquinamento e il progressivo sovraccarico delle discariche obbligano oggi il mondo industriale a reinventarsi. In quest'ottica, ciò che un tempo era considerato un rifiuto da smaltire si propone oggi come una nuova materia prima per processi innovativi. La necessità di orientare il sistema industriale verso modelli di produzione sempre più sostenibili, valorizzando al massimo il potenziale degli scarti generati, rappresenta oggi una delle principali sfide per le istituzioni e per la ricerca. Materiali che in passato rappresentavano solo un costo di smaltimento ora possono rappresentare sottoprodotti utili a processi di reimpiego e valorizzazione.

Le biotecnologie rappresentano uno strumento promettente per l'implementazione di processi sostenibili volti alla valorizzazione dei sottoprodotti generati da altre filiere produttive, in particolare da quella agro-alimentare. Il principio alla base di tali tecnologie risiede nella capacità dei microrganismi di convertire substrati di coltura in metaboliti di interesse industriale, quali i carotenoidi. In quest'ottica, l'utilizzo della Brewer's Spent Grain (BSG) come fonte di nutrienti costituisce una valida strategia di valorizzazione di un importante sottoprodotto dell'industria birraria, finalizzata alla produzione di carotenoidi, costituenti un prodotto ad alto valore aggiunto.

1.1 Processo di produzione della birra

Secondo il report Assobirra (Confindustria, 2026) nel 2025 la produzione di birra in Italia ha toccato i 16.8 milioni di ettolitri, rendendo questa antica bevanda alcolica una delle più prodotte e consumate nel nostro paese. La produzione della birra comporta l'ottenimento di svariati sottoprodotti, tra cui la BSG. Le materie prime principali utilizzate sono: malto, acqua, lievito e luppolo alle quali, al variare della ricetta, possono essere aggiunti altri aromi.

Il processo di produzione inizia con il conferimento dei cereali richiesti per la ricetta. Storicamente i più utilizzati sono orzo, grano e mais. Essi vengono sottoposti al processo di maltazione che consiste nella germinazione dei cereali stessi per produrre sostanze richieste nelle operazioni successive. La maltazione consiste nell'immergere i cereali in acqua fredda (12-15°C) per un tempo compreso tra 2 e 3 giorni (Goyal et al. 2024) procedendo ad areare la miscela per apportare l'ossigeno necessario ai cereali (Schwarz and Li, 2011). Successivamente l'acqua è rimossa e i cereali vanno incontro alla germinazione, ottenuta in 4-6 giorni tenendo la percentuale di umidità ad un valore nell'intorno del 45%. Questa fase promuove la produzione degli enzimi necessari nelle successive fasi di produzione (Goyal et al. 2024). Al termine i cereali divenuti malto sono essiccati o eventualmente tostati per rimuovere l'umidità (Parker, 2012; Gomaa, 2018). Il passaggio successivo è l'ammostamento, esso consiste nel miscelare due terzi di malto e un terzo di acqua ad una temperatura compresa tra 57 e 77 °C (Gomaa, 2018). Vi sono diverse modalità di ammostamento divisibili in due famiglie; ammostamento ad infusione ed a decozione (Willaert, 2007), la cui descrizione esula dagli scopi di questa tesi. Al termine dell'ammostamento la parte solida e la parte liquida della miscela di malto e acqua vengono separate in un processo denominato *Lautering* dal nome dell'apparecchiatura storicamente utilizzata, il tino "*Lauter*" (Callejo et al., 2019). Nei processi più moderni si utilizzano filtropresse con una maggior efficienza di filtrazione verso i

componenti più fini. È in questa fase che si ricava la BSG. Il liquido ottenuto denominato mosto passa alle fasi successive. Prima della fase di fermentazione, il mosto viene bollito e addizionato con il luppolo, erba aromatica che dona alla birra il caratteristico gusto amaro. La bollitura ha lo scopo di facilitare l'estrazione delle sostanze presenti nel luppolo e di denaturare gli enzimi rilasciati dal malto (Goyal et al. 2024). Il mosto è quindi sottoposto alla fase di *Whirpooling* che consiste nell'agitare il mosto manualmente o con l'ausilio di pompe formando un vortice in modo da convogliare al centro tutte le sostanze che sono coagulate durante il processo di bollitura per rimuoverle (Schisler et al., 1982). A questo punto, il mosto dopo essere stato raffreddato è pronto per essere inoculato. Il microrganismo inoculato dipende generalmente del tipo di birra che si va a produrre. Le due specie di lievito utilizzate maggiormente sono *Saccharomyces cerevisae* e *Saccharomyces calbergensis* (Goyal et al. 2024). La fermentazione ha una durata differente in base alla birra prodotta (Kaneda et al., 1992; Siebert, 2001). Al termine della fermentazione la birra è trasferita in tini di maturazione in cui resta a partire da pochi giorni fino a settimane ad una temperatura tra 0 e 3 °C (Goyal et al. 2024). Dopo la maturazione vi sono il finissaggio e l'imbottigliamento. In base al tipo di birra prodotta l'anidride carbonica presente nella bottiglia può essere aggiunta artificialmente o prodotta in bottiglia dal lievito ancora presente (metodo *Krausen*) (Lewis and Young, 2001), questo dipende dalla ricetta del produttore. Nella figura 1.1 è brevemente schematizzato il processo di produzione della birra.

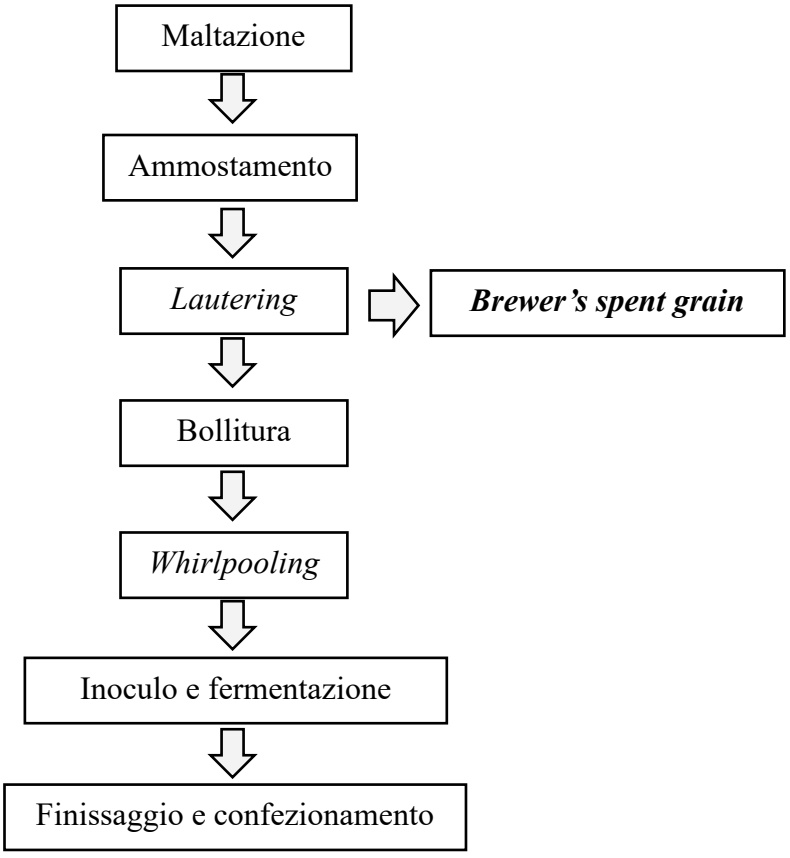


Figura 1.1 Schema di produzione della birra.

1.2 Brewer's Spent Grain

La BSG rappresenta circa l'85% dei sottoprodotti solidi generati dall'industria birraia. Essa è costituita generalmente dalle glumelle e dagli strati esterni dei cereali che costituiscono il malto che vengono separate durante la fase di lauterizzazione dal mosto fermentescibile. La produzione mondiale di birra è stata 186 GL nel 2021. Le stime indicano una produzione di BSG di 20 kg ogni 100 litri di birra prodotta. A livello mondiale si può quindi stimare una produzione di circa 37 milioni di tonnellate annue, rendendo la BSG uno dei sottoprodotti agroindustriali più diffusi e più abbondanti (Dancker et al., 2025). Trattandosi di una matrice lignocellulosica molto umida, essa ha una percentuale di acqua che varia dal 70% all'80%. Il rimanente è principalmente composto da fibre alimentari presenti in percentuali variabili dal 35% al 60%, proteine dal 15% al 30% e in percentuali inferiori, lipidi, minerali e numerosi composti bioattivi, come gli acidi fenolici. Tuttavia, la composizione finale della BSG, siccome dipende dalla ricetta della birra prodotta, è variabile. Nondimeno, indipendentemente dalla provenienza, la BSG ha un elevato valore nutrizionale. Proprio alla luce di questo aspetto, questo sottoprodotto è utilizzato in applicazioni alimentari, nutraceutiche e biotecnologiche (Ikram et al., 2017). La principale difficoltà nell'utilizzare la BSG è la sua conservabilità. La soluzione storicamente utilizzata per prolungarne la conservazione è l'essiccamento; tuttavia, questa opzione è energeticamente dispendiosa e aumenta i costi associati al recupero e utilizzo del sottoprodotto che di per sé ha un basso valore economico. Una soluzione alternativa a questo problema è ridurre il contenuto di umidità con la pressatura. Questo metodo, seppur non efficiente come l'essiccamento, porta il contenuto di umidità a circa il 10% prolungando il tempo di conservabilità a fronte di costi più contenuti. Un altro metodo di stoccaggio è l'insilamento: esso consiste nel conservare la BSG in silos in condizioni anaerobiche. Questo metodo di conservazione è reso possibile grazie a due meccanismi, la bassa capacità tamponante della BSG dovuta al basso contenuto di ammoniaca e la presenza naturale di batteri lattici che contribuiscono, durante il processo di insilamento, alla rapida riduzione del pH. Inoltre, degradano il materiale lignocellulosico in composti più fermentescibili. Per questa pratica possono anche essere utilizzati sacchetti ermetici in plastica, in cui la BSG è direttamente confezionata in birreria, prevenendo eventuali contaminazioni. I metodi di conservazione posso essere superflui nel caso in cui la BSG venga regolarmente conferita ai siti degli eventuali processi di valorizzazione (Dancker et al., 2025).

1.1.1 Utilizzi attuali della BSG

Vi sono numerose vie per valorizzare la BSG. Questo sottoprodotto ha caratteristiche che possono essere utili in varie filiere tra cui: il recupero energetico per combustione o l'utilizzo nella digestione anaerobica per la produzione di biogas, l'utilizzo per l'alimentazione umana e animale, la produzione di compost, l'utilizzo come fonte di nutrienti per colture microbiche.

- Vi sono due metodi per utilizzare la BSG a scopi energetici:
    - Il più semplice è la sua combustione per ottenere energia termica. Questa pratica presenta tuttavia un inconveniente. La BSG tal quale ha un contenuto di umidità troppo alto per la combustione diretta, questo fa sì che prima dell'utilizzo l'acqua presente vada ridotta. L'essiccamento è troppo costoso per essere sostenibile, per questo si opta per la pressatura. La BSG pressata per l'utilizzo

termico ha un peso secco del 40% sufficiente per la combustione diretta. In queste condizioni essa è assimilabile al legno da ardere. La criticità principale di questa pratica è il controllo delle emissioni. La combustione della BSG porta alla produzione di composti soggetti a controllo legislativo in quantità superiori alla normativa vigente in numerosi paesi. Questo rende necessario il trattamento dei gas di scarico che aumenta molto i costi di trattamento (Dancker et al., 2025).

  - Il secondo metodo è invece l'utilizzo della BSG come materia prima per il processo di digestione anaerobica (DA). La DA è un processo biotecnologico che sfrutta un consorzio di microrganismi in condizioni anaerobie per la produzione di biogas che è costituito da una miscela di gas prodotti dal metabolismo dei microrganismi coinvolti, comprende generalmente metano, idrogeno e anidride carbonica. I primi due gas vengono solitamente utilizzati per scopi energetici, l'anidride carbonica invece, nel contesto birrario può essere utilizzata per la carbonatazione della birra stessa (Dancker et al., 2025).

- Grazie al suo alto contenuto in fibre e proteine, la BSG costituisce un'ottima fonte di nutrienti. Tuttavia, l'utilizzo come fonte di alimentazione, sia umana che animale, è fortemente soggetto a regolamentazione. Questo prevede quindi che il sottoprodotto in questione debba necessariamente superare i controlli disposti dalla legge. Inoltre, come già menzionato, le difficoltà nella conservazione della BSG nel caso del suo utilizzo come *fed-batch*, costituiscono un ulteriore ostacolo. Nonostante queste controindicazioni, la BSG viene utilizzata come mangime e come ingrediente, per esempio, nei cosiddetti cibi funzionali (Dancker et al., 2025), in prodotti da forno, yogurt e burger di soia (Xie et al. 2024).

- L'utilizzo della BSG per la produzione di compost può avvenire in due modalità. La prima è utilizzando BSG tal quale, la seconda è utilizzare il digestato ottenuto dalla BSG per digestione anaerobica. In entrambi i casi, comunque, a causa del basso valore del rapporto carbonio azoto (C/N) la BSG o il digestato devono essere addizionati con altra biomassa ad alto rapporto C/N come cippato di legno o sfalci di potatura (Dancker et al., 2025).

- Sono state esplorate numerose applicazioni della BSG come fonte di nutrienti per colture biotecnologiche. I prodotti principalmente ricavati da fermentazioni condotte con BSG sono enzimi, come per esempio la xilanasi, utilizzato in processi industriali come la decolorazione enzimatica della polpa di legno, la chiarificazione di succhi di frutta e birra o l'estrazione di oli vegetali. Questo enzima è stato prodotto utilizzando diverse specie di funghi filamentosi dei generi *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizopus* o batteri del genere *Bacillus.* Anche altri enzimi sono stati prodotti, tra cui proteasi, laccasi e cellulasi (Xie et al. 2024). Altri composti prodotti sono gli acidi organici come l'acido lattico prodotto principalmente con l'utilizzo di batteri lattici, appartenenti al genere *Lactobacillus.* Esso viene utilizzato per la produzione di biopolimeri come il polilattato o come additivo alimentare e nell'industria farmaceutica e cosmetica (Castillo Martinez et al. 2013). La BSG è utilizzata anche per la produzione di biocarburanti di seconda generazione come l'etanolo, il butanolo e il butandiolo. Per questa produzione vengono utilizzati diversi microrganismi, tra cui, a titolo di esempio, lieviti del genere

Saccharomyces (Xie et al. 2024). Un altro prodotto che sta riscontrando un interesse sempre più ampio sono i poliidrossialcanoati (PHA). I PHA sono dei polimeri che vengono prodotti da più di 300 specie di microrganismi. Essi offrono una valida alternativa ai polimeri derivanti dal petrolio (Xie et al. 2024). Altri composti prodotti comprendono prebiotici come gli arabino-olisaccaridi oppure zuccheri come lo xilitolo, antibiotici e pigmenti, tra cui i carotenoidi. (Xie et al. 2024)

1.2 Carotenoidi

I carotenoidi sono la classe di pigmenti isoprenoidi più diffusa. Essi sono prodotti da piante, alghe, e vari microrganismi sia fotosintetici che non fotosintetici. Essi costituiscono dei metaboliti secondari con proprietà antiossidanti, antinfiammatorie, antitumorali e coloranti. I carotenoidi identificati sono più di 600 molecole differenti. Questi composti si dividono generalmente in due gruppi; le Xantofille o Filloxantine, caratterizzate dalla presenza di un ossigeno come gruppo funzionale, i rappresentati più comuni di questa classe sono l'astaxantina, la luteina e la zeaxantina. L'altro gruppo sono i Caroteni, che invece contengono solo gruppi funzionali idrocarburici, tra cui possiamo annoverare il β-carotene e il licopene (Saini et al. 2018).

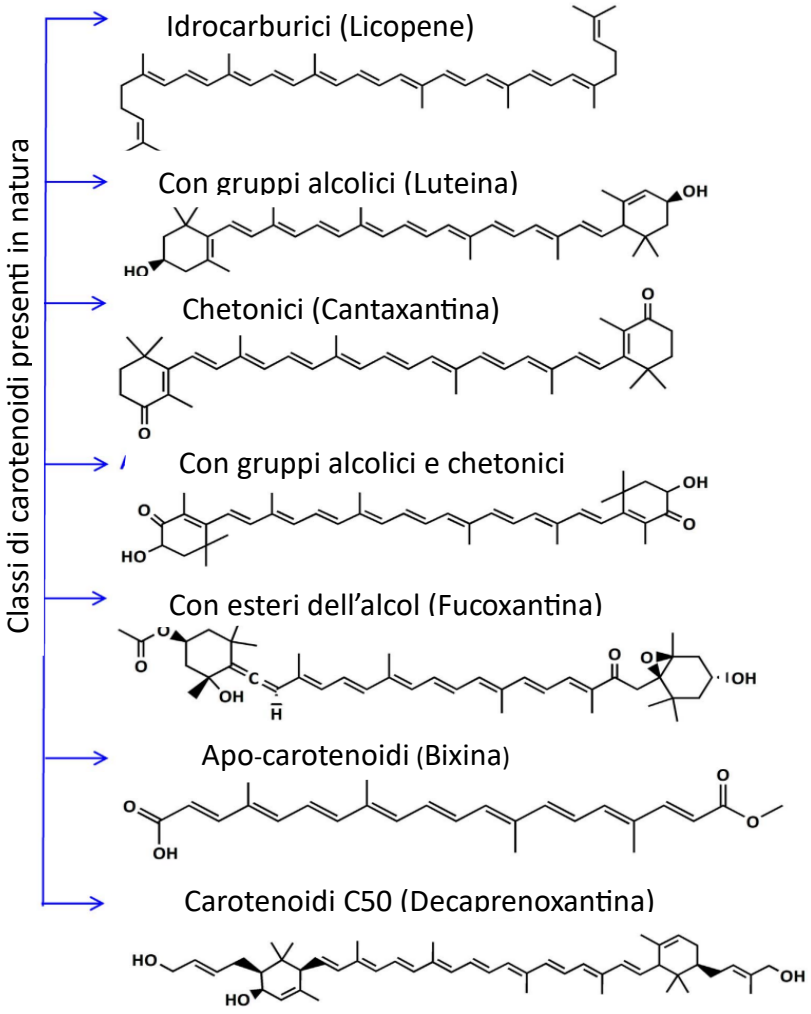


Figura 1.2 Classi di carotenoidi presenti in natura (Saini et al.2018) modificata.

1.2.1 Produzione di carotenoidi

I carotenoidi riscontrano una grande domanda nei settori alimentari, nutraceutici, farmaceutici, cosmetici, tessili e mangimistici. Attualmente il mercato globale è dominato dalla produzione per sintesi chimica. Tuttavia, vista la richiesta sempre maggiore di questa classe di composti dal mondo industriale, la ricerca e sviluppo di nuovi metodi di produzione sta crescendo notevolmente (Saubenova et al. 2024). La figura 1.3 mostra i principali metodi per ottenere i carotenoidi.

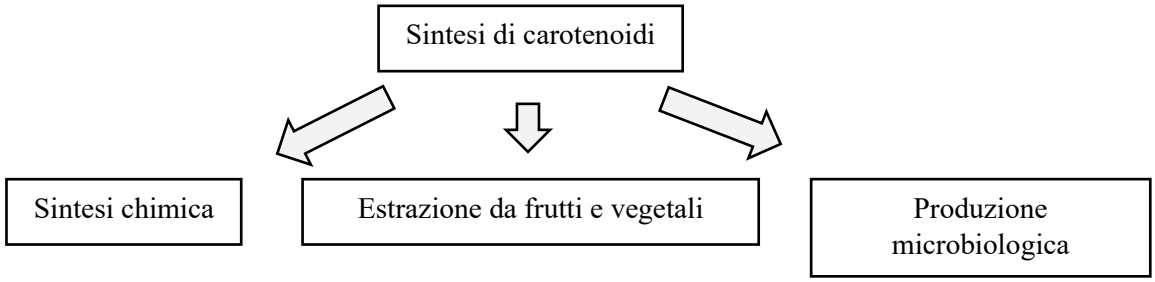


Figura 1.3 Schema opzioni di produzione dei carotenoidi.

La ricerca si sta sempre più orientando verso la produzione microbiologica dei carotenoidi. Questo perché, a discapito della sintesi chimica che utilizza reagenti costosi, la sintesi microbiologica può sfruttare terreni di coltura ricavati da materiali di scarto o sottoprodotti di altre filiere e inoltre, rispetto all'estrazione da frutti e vegetali, non risente della stagionalità delle materie prime (Saubenova et al. 2024).

La sintesi chimica offre la possibilità di ottenere singole specie di carotenoidi, come nel caso del beta-carotene. Questo carotenoide in particolare viene prodotto sin dal 1954 da Roche e dal 1960 da BASF. Queste due aziende hanno sviluppato due processi differenti a partire dallo stesso precursore il beta-ionone, storicamente estratto da fonti naturali, ora prodotto a partire da acetone o butadiene. (Ribeiro et al. 2011). Da un punto di vista ambientale e di sostenibilità l'utilizzo dei reagenti appena menzionati, derivanti principalmente dall'industria petrolchimica, rende il processo non rinnovabile. Inoltre, i carotenoidi prodotti in maniera naturale, non solo rappresentano un'opportunità dal punto di vista dell'economia circolare ma anche da un punto di vista di mercato. Infatti, i carotenoidi naturali offrono una migliore attrattiva commerciale, soprattutto nell'ambito farmaceutico e nutraceutico (Raita et al. 2023).

L'estrazione da fonti vegetali vede l'utilizzo di differenti tecniche di estrazione a partire da matrici vegetali ricche di carotenoidi. La scelta del metodo di estrazione, così come i parametri, dipendono dalla matrice. Le tecniche di estrazione utilizzate per matrici vegetali vengono divise in cinque categorie (Saini et al. 2018):

- Estrazione con solvente liquido a pressione atmosferica con estrattore Soxhlet, utilizzando pretrattamenti come macerazione, microonde o ultrasuoni;
- Estrazione accelerata con solventi in pressione;
- Estrazione assistita con campi elettrici pulsati;
- Estrazione con fluidi supercritici come la CO2 e talvolta con cosolventi organici;

- Estrazione assistita con enzimi.

L'inconveniente principale come precedentemente citato è la stagionalità delle materie prime impiegate. Questo aspetto, insieme con la crescente richiesta di carotenoidi, rende più difficile l'utilizzo di queste materie prime.

Le tecniche di estrazione dei carotenoidi utilizzate per le matrici vegetali sono utili anche per l'estrazione da biomassa prodotta con processi microbiologici, in particolare per quanto riguarda i solventi utilizzati (Papapostolou et al. 2023).

L'utilizzo di microrganismi sta offrendo nuove soluzioni per la produzione di carotenoidi. Vi sono numerose specie di microrganismi (batteri, microalghe, lieviti e funghi filamentosi) in grado di sintetizzare questa classe di composti (Raita et al. 2023). Dal punto di vista della quantità totale di carotenoidi prodotti le microalghe sono generalmente le più performanti. Gli esempi più comuni sono appartenenti ai generi *Dunaliella, Haematococcus, Chlorella* e *Spirulina* (Al-Monofy et al. 2025). Tuttavia, batteri e lieviti offrono una valida alternativa, grazie ad una velocità di crescita maggiore e la possibilità di variare maggiormente le condizioni di coltura in termini di terreno di coltura, pH, temperatura e ossigeno disciolto. I batteri più diffusi sono appartenenti ai generi *Paracoccus* e *Dietzia*. Invece per quanto riguarda i lieviti, tra i generi più utilizzati troviamo *Rhodosporidium, Phaffia, Xanthophyllomyces* e *Rhodotorula*. Infine, vi è anche l'utilizzo di funghi filamentosi, come *Blakeslea trispora* e *Mucor circinelloides*. Tuttavia, quest'ultimi creano particolare difficoltà nel processo di downstream a causa della produzione di micotossine da parte di questi microrganismi (Raita et al. 2023).

1.2.2 Processi di produzione microbiologici di carotenoidi presenti in letteratura

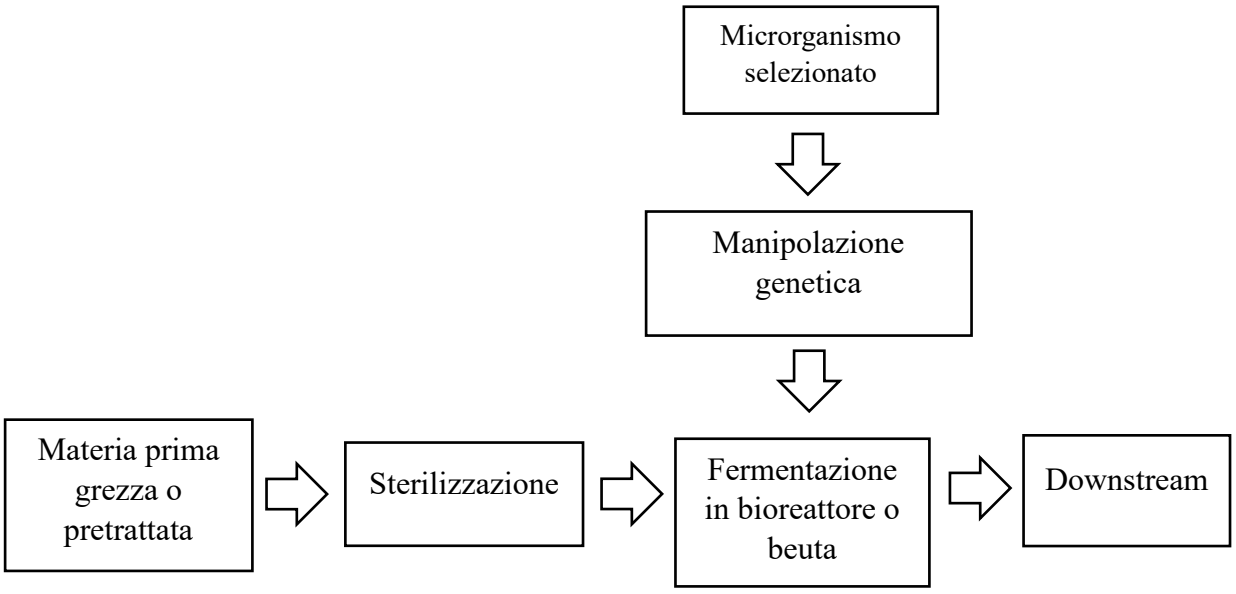


Figura 1.4 Schema di produzione generale dei carotenoidi per coltura microbiologica.

I principali scarti o sottoprodotti industriali utilizzati in letteratura sono melassa, siero di latte, glicerolo grezzo, reflui oleari, acque di lavorazione delle patate, e più recentemente; idrolizzati lignocellulosici, (Frengova & Beshkova, 2009; Kot et al., 2018).

Le specie microbiche maggiormente investigate appartengono ai lieviti carotenogenici del genere *Rhodotorula* e al lievito *Xanthophyllomyces dendrorhous* (anamorfo *Phaffia rhodozyma*), capace di sintetizzare astaxantina (Rodríguez-Sáiz et al., 2010). Sotto il profilo ingegneristico, l'accumulo di questi metaboliti è governato da un principio comune: la carotenogenesi è un processo tipicamente non associato alla crescita, indotto da condizioni di limitazione dell'azoto e da un elevato rapporto carbonio/azoto. Ne consegue che le strategie operative più efficaci prevedono la dissociazione temporale tra fase di crescita e fase di produzione: colture in *batch* con limitazione nutrizionale programmata, processi *fed-batch* a somministrazione controllata del substrato, e regimi bifasici in cui la seconda fase è stressante. A ciò si aggiunge la modulazione di parametri fisici quali il tasso di aerazione che aumenta la percentuale di ossigeno disponibile per i microrganismi, stimolando il ruolo dei carotenoidi come inibitori di specie reattive dell'ossigeno e quindi anche la loro produzione. Altri parametri variabili sono l'irraggiamento luminoso, il pH e la temperatura (Aksu & Eren, 2007; Saenge et al., 2011).

Per quanto concerne i residui saccariferi, An et al. (2001) hanno impiegato melassa di barbabietola in coltura *fed-batch* su scala pilota da 100 L con il mutante iperproduttore 2A2N di *X. dendrorhous*, previa integrazione con urea (30 g per litro di melassa) e NaH_2PO_4 (5 g per litro di melassa), resasi necessaria poiché sodio e fosforo sono stati identificati come nutrienti limitanti, ottenendo una concentrazione massima di biomassa pari a 36 g/L, associata a una resa volumetrica di carotenoidi di 40 mg/L e a una produttività di 0,18 g L^{-1} h^{-1}. Il rapporto tra i due parametri, corrispondente a circa 1,1 mg di carotenoidi per grammo di biomassa secca. Rodrigues et al. (2019) hanno impiegato melassa di canna da zucchero in insieme a *corn steep liquor* quale fonte azotata di scarto per la coltivazione di *Rhodotorula mucilaginosa*. In regime *batch* (70 g/L di melassa, 3,4 g/L di *corn steep liquor*, 25 °C, 180 rpm, 168 h) sono stati ottenuti 7,9 g/L di biomassa e 1 248,5 µg/L (1,25 mg/L) di carotenoidi totali, mentre l'adozione di un regime *fed-batch* con alimentazione a 30 g/L di melassa e 6,5 g/L di *corn steep liquor* ha portato la biomassa a 16 g/L e il titolo carotenoide a 3 726 µg/L (3,73 mg/L), con un incremento di circa il 400% rispetto al processo in *batch*. Su melassa, Aksu ed Eren (2007) hanno ottenuto con *Rhodotorula glutinis* la resa volumetrica in carotenoidi più elevata del proprio studio, pari a 125,0 mg/L, impiegando 20 g/L di saccarosio da melassa a pH 6 e 30 °C, con un incremento significativo della produzione all'aumentare del tasso di aerazione fino a 2,4 vvm. Il medesimo lavoro documenta il comportamento del siero di latte, il lattosio del siero (13,2 g/L) ha determinato la più elevata resa specifica, cioè la massa di carotenoidi estratti per unità di biomassa sottoposta ad estrazione, pari a 35,5 mg di carotenoidi totali per grammo di cellule secche, ma con una biomassa prodotta pari solo a 2.4 g/L.

Il glicerolo grezzo, co-prodotto della transesterificazione per la produzione di biodiesel, unisce due filiere di produzione biotecnologica sostenibile. Sriphuttha et al. (2023) hanno condotto la coltivazione di *Rhodotorula paludigena* in fermentatore da 500 L, con una concentrazione di 40 g/L di glicerolo grezzo, confrontando regimi *batch* e *fed-batch*. Quest'ultimo ha fornito i valori massimi, con una concentrazione di biomassa pari a 46,32 g/L, una produzione di carotenoidi di 713,80 mg/L, corrispondente a una resa specifica di circa 15,4 mg per grammo di biomassa secca. Il dato è di particolare rilievo poiché ottenuto in condizioni di scala pilota,

ossia in un contesto in cui i limiti di trasferimento di ossigeno e lo stress idrodinamico sono realistici, e non su beuta agitata. Analogamente, Saenge et al. (2011), operando con *R. glutinis* in bioreattore *stirred tank* con pH controllato a 6,0 e aerazione a 2 vvm, e ottimizzando concentrazione di glicerolo (9,5%) e rapporto C/N (85), hanno conseguito in regime *fed-batch* una resa volumetrica di 135,25 mg/L. Su glicerolo, Lee et al. (2014) hanno rilevato in *Rhodosporidium toruloides* 28,5 mg/L in resa volumetrica di carotenoidi. Le acque reflue dell'industria olearia presentano un profilo affatto peculiare, in cui il potenziale valorizzativo è controbilanciato dalla tossicità dei composti fenolici. Ghilardi et al. (2020) hanno impiegato la frazione liquida dell'«alperujo» (sansa umida da estrazione a due fasi) come substrato per *Rhodotorula mucilaginosa*, in un mezzo caratterizzato da 7,6 g/L di zuccheri totali e 2,9 g/L di polifenoli, conseguendo una resa volumetrica massima di 7,3 mg/L e una resa specifica in carotenoidi di 0,78 mg/g di biomassa.

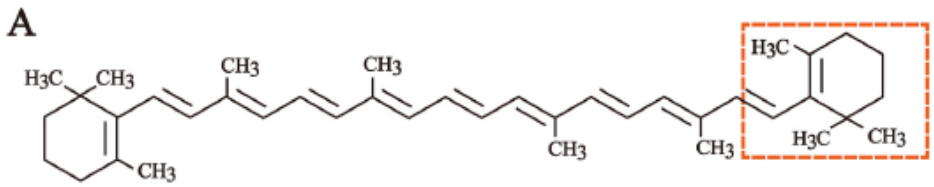
Substrato di Scarto	***Microrganismo***	***Modalità***	***Biomassa (g/L)***	***Resa Vol. (mg/L)***	***Resa Spec. (mg/g)***	***Fonte***
Melassa di barbabietola	*X. dendrorhous* (mutante 2A2N)	*Fed-batch* Pilota (100 L)	36.0	40.0	-	An et al. (2001)
Melassa di canna da zucchero	*R. mucilaginosa*	*Batch* Beuta	7.9	1.25	0.16	Rodrigues et al. (2019)
Melassa di canna da zucchero	*R. mucilaginosa*	*Fed-batch* Beuta	16.0	3.73	0.23	Rodrigues et al. (2019)
Melassa di zucchero	*R. glutinis*	*Batch* Beuta	-	125.0	-	Aksu & Eren (2007)
Siero di latte	*R. glutinis*	*Batch* Beuta	2.4	-	35.5	Aksu & Eren (2007)
Glicerolo grezzo	*R.paludigena*	*Fed-batch* Pilota (500 L)	46.32	713.8	-	Sriphutthaa et al. (2023)
Glicerolo grezzo	*R. glutinis*	*Fed-batch* Bioreattore	-	135.3	-	Saenge et al. (2011)

Glicerolo grezzo	*R. toruloides*	*Batch/Fed-batch* Bioreattore	-	28.5	-	Lee et al. (2014)
Alperujo	*R. mucilaginosa*	*Batch* Beuta	-	7.3	0.78	Ghilardi et al. (2020)

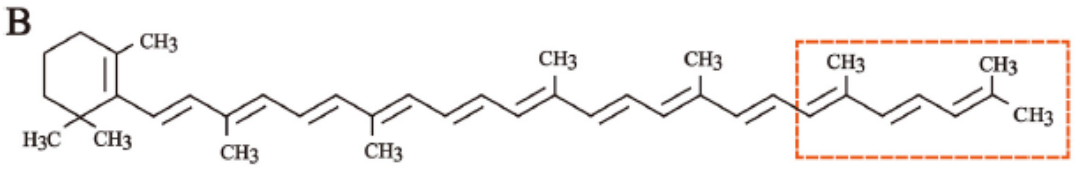
Tabella 1.1 Tabella riassuntiva delle condizioni di coltura e dei risultati ottenuti dagli studi citati nel paragrafo 1.2.2

1.3 Rhodotorula mucilaginosa

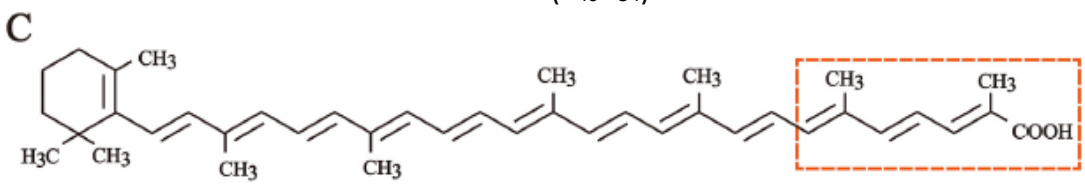
Rhodotorula mucilaginosa è un lievito, isolato per la prima volta negli anni 30' da Francis Charles Harrison in un formaggio. Il genere *Rhodotorula* a cui appartiene prende il nome dal latino, il significato è lievito di colore rosso. Il termine *mucilaginosa* è invece legato alla viscosità delle colture liquide del microrganismo in questione. Le colonie di *R. mucilaginosa* si presentano con un colore arancione deviante al rosso, con una superficie liscia e traslucente. Il colore è legato alla produzione di carotenoidi da parte del lievito. Ultimamente, questo microrganismo è stato sempre più utilizzato per colture biotecnologiche. Oltre alla capacità di produrre carotenoidi, esso è anche utilizzato per la produzione di lipidi ed enzimi (Saenge et al. 2011). Per quanto riguarda i carotenoidi, *Rhodotorula mucilaginosa* sintetizza principalmente tre composti; il beta-carotene, il torulene e la torularodina. Il primo è uno dei carotenoidi più comuni e utilizzati, gli altri due sono come il beta-carotene dei carotenoidi a 40 atomi di carbonio. Il torulene appartiene alla stessa classe del beta-carotene, infatti è un carotenoide idrocarburico, cioè composto solo da atomi di carbonio e idrogeno. La torularodina invece, presenta un gruppo funzionale con ossigeno e fa parte del gruppo delle Xantofille (Li et al. 2022). I carotenoidi sintetizzati da Rhodotorula mucilaginosa sono molecole fortemente idrofobiche che si accumulano prevalentemente all'interno di gocce lipidiche citoplasmatiche (*lipid droplets/lipid bodies*) e nelle membrane della cellula (Li et al., 2022; Libkind et al., 2025). La presenza di una rigida parete cellulare e la stasi dei pigmenti disciolti nella matrice lipidica intrappolata costituiscono la principale barriera al recupero dei carotenoidi.



Beta-carotene ($C_{40}H_{56}$)



Torulene ($C_{40}H_{54}$)



Torularodina ($C_{40}H_{54}O_2$)

Figura 1.5 Carotenoidi prodotti da R.mucilaginosa (Li et al. 2022 modificata).

1.4 Scopo del lavoro

L'obiettivo di questa tesi è esplorare le modalità di fermentazione per la produzione di carotenoidi mediante l'impiego del lievito *Rhodotorula mucilaginosa* con sciroppo di BSG.

L'indagine si è svolta attraverso prove in beuta mettendo a confronto la modalità di conduzione *batch* con quella *fed-batch* con aggiunta di terreno in un solo momento e in due momenti differenti. Quest'ultima rappresenta una valida alternativa ai processi *batch* classici, consentendo di massimizzare la resa in tempi paragonabili. Per valutare l'efficacia dei diversi metodi di coltura, i parametri principali presi in esame sono stati la concentrazione di biomassa prodotta e le rese in carotenoidi, sia volumetriche che specifiche. In particolare, la sperimentazione in beuta ha mirato a determinare l'influenza della modalità di alimentazione sulle prestazioni del sistema, valutando l'effetto della variazione dell'intervallo di tempo tra le addizioni di terreno di coltura.

Inoltre, nelle fermentazioni condotte in bioreattore è stata analizzata la variazione delle prestazioni della coltura confrontando due diverse durate di processo: 48 e 72 ore. Si è inoltre proceduto all'ottimizzazione del protocollo di estrazione dei carotenoidi, integrando un pretrattamento di congelamento e scongelamento (*freeze and thaw*) per incrementare la resa estrattiva e riducendo la quantità di solventi utilizzati.

2. Materiali e metodi

2.1 Brewery Spent Grain (BSG)

La BSG utilizzata è composta da malto Chateau Wheat Blanc, 25%, e malto Chateau Pilsener, 75%. La BSG è stata conservata a -20°C, prima del suo utilizzo è stata scongelata per una notte a +4°C ed è stata poi portata a temperatura ambiente, a circa 25°C.

Prima della sua applicazione per la preparazione dello sciroppo si sono valutati il pH e il peso secco (paragrafi 2.7.1, 2.7.2 e 2.7.4).

2.2 Preparazione dello sciroppo di BSG

Lo sciroppo di BSG è stato prodotto utilizzando acqua distillata come solvente, mantenendo una proporzione tra il volume di acqua (mL) e il peso secco di BSG (g) pari a 5.7. L'estrazione è stata condotta in autoclave (FVG3, Fedegari Autoklaven AG) alla temperatura di 121°C e alla pressione di 2 atmosfere per 20 minuti. Si sono utilizzate beute Erlenmeyer da 1L ponendo in ciascuna 200 g di BSG umida addizionata del volume di acqua distillata necessaria a mantenere il rapporto indicato.

Tutte le operazioni successive all'estrazione in autoclave sono state eseguite in condizioni di sterilità, sotto cappa a flusso laminare (SCANLAF MARS, Labogene) utilizzando materiale sterile.

Al termine del trattamento in autoclave, per separare grossolanamente la fase solida dalla fase liquida è stata effettuata una filtrazione con uno strato di garza. È quindi avvenuta una seconda separazione per centrifugazione a 12000 rpm per 15 min a 4°C, suddividendo l'estratto in provette Falcon da 50 mL. Lo sciroppo, separato dal precipitato, è stato quindi miscelato in un unico contenitore sterile ed è stato mantenuto a +4°C fino al momento del suo utilizzo per la fermentazione.

Prima di ogni fermentazione si sono valutati il pH, la concentrazione del glucosio e la concentrazione delle proteine totali (come descritto rispettivamente nei paragrafi 2.7.4, 2.7.5 e 2.7.6).

Vista la sterilità dello sciroppo prodotto, non è stata necessaria una ulteriore sterilizzazione in autoclave prima delle fermentazioni sia in beuta che in reattore.

2.3 Microrganismo

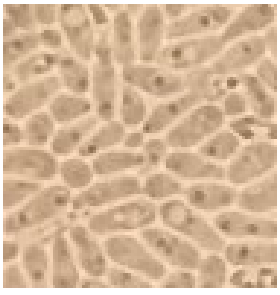


Figura 2.1 Immagine al microscopio ottico (Olympus BH2) di Rhodotorula mucilaginosa ingrandimento 40x.

Il microrganismo utilizzato è il lievito carotenogenico *Rhodotorula mucilaginosa* (ceppo CBS316) mantenuto su terreno Yeast Malt Agar (YMA) a 4°C. Il terreno YMA è composto come segue:

- Glucosio 10 g/L
- Estratto di malto 5 g/L;
- Estratto di lievito 3 g/L;
- Peptone 3 g/L;
- Agar 20 g/L.

L'inoculo su terreno solido in capsule di Petri è effettuato per striscio con ansa sterile a partire dal campione di *R. mucilaginosa* conservato a 4°C. La coltura viene quindi posta nell'incubatore (BD115; Binder) a 25°C per 72 ore prima della preparazione dell'inoculo per le precolture in beuta, sia in terreno Yest Malt che in sciroppo.

2.4 Fermentazioni in beuta

I terreni di coltura utilizzati per le fermentazioni *batch* effettuate in beuta sono stati:

- Yeast Malt (YM) con composizione analoga al terreno YMA descritto nel paragrafo 2.3 ad eccezione dell'agar che non è presente.
- Sciroppo di BSG.

Le fermentazioni in beuta sono state condotte in beute Erlenmeyer da 500 mL provviste di frangiflutti per garantire una adeguata miscelazione e chiuse con tappo di cotone. Il volume di coltura utilizzato è stato di 200 mL. Si è effettuato un inoculo standardizzato: esso consiste nell'utilizzare come volume di inoculo il 10% del volume di coltura. Inoltre, l'assorbanza dell'inoculo a 600 nm (OD_{600}) deve essere compresa tra 0.8 e 1. Nel caso dell'inoculo di una beuta per la precoltura il microrganismo è stato prelevato da una coltura su terreno YMA cresciuta per 72 ore (tale terreno solido è stato utilizzato sia per le precolture in YM che in sciroppo). Il prelievo per preparare l'inoculo è stato effettuato versando del terreno di coltura liquido, YM o sciroppo, direttamente nella capsula di Petri. Successivamente con un'ansa sterile parte della colonia di *R. mucilaginosa* è stata risospesa nel terreno liquido. Nel caso di una fermentazione in beuta, la biomassa necessaria per l'inoculo è stata prelevata da una beuta di precoltura in fase esponenziale. In entrambi i casi la sospensione è quindi analizzata allo spettrofotometro e opportunamente diluita, con terreno YM o con sciroppo, per ottenere le condizioni di assorbanza a 600 nm necessarie. Una volta effettuato l'inoculo in condizioni di sterilità, la beuta è posta in incubatore (Innova 42, New Brunwick) a 25°C con una agitazione di 150 rpm.

Al momento dell'inoculo e successivamente nel corso della fermentazione si sono effettuati dei prelievi per valutare l'assorbanza a 600 nm e 490 nm (OD_{490}), per valutare rispettivamente la biomassa e la presenza di carotenoidi, il pH e la concentrazione di glucosio (paragrafi 2.7.4, 2.7.5). Inoltre, si è valutato il peso secco della biomassa per poi determinarne la concentrazione

e (paragrafo 2.7.3). Al termine delle fermentazioni la biomassa è stata separata come descritto al paragrafo 2.6.1 per effettuare l'estrazione dei carotenoidi.

2.4.1 Prove in beuta in modalità fed-batch

Le beute Erlenmeyer da 500 mL sono state utilizzate anche per condurre le fermentazioni con sciroppo di BSG in modalità *fed-batch*. Le fermentazioni sono state allestite e inizialmente condotte secondo quanto descritto nel paragrafo 2.4, successivamente, dopo 6 ore dall'inizio della fermentazione è stato addizionato, in condizioni di sterilità, l'antischiuma SE-15, in proporzione 0.02% in volume. Successivamente, 24 o 48 ore dall'inizio della fermentazione, si è realizzato il primo *fed-batch*. In una serie di prove sperimentali, si è realizzato anche un secondo *fed-batch* sempre a distanza di 24 ore dal primo, effettuato a 24 o a 48 ore. La modalità operativa seguita ha previsto la rimozione di metà del volume di coltura, 100 mL in questo caso, e l'addizione di un pari volume di sciroppo sterile. Tutte le prove sperimentali condotte con modalità *fed-batch* sono riassunte nella tabella 2.1.

Denominazione fermentazione	**N° *fed-batch***	**Effettuazione 1° *fed-batch***	**Effettuazione 2° *fed-batch***	**Durata fermentazione**
FB24	1	24 ore	-	72 ore
FB48	1	48 ore	-	96 ore
FB24-24	2	24 ore	24 ore	72 ore
FB48-24	2	48 ore	24 ore	96 ore

Tabella 2.1 Fermentazioni fed-batch realizzate in beuta Erlenmeyer con lo sciroppo di BSG.

Come precedentemente descritto per le fermentazioni batch anche quelle *fed-batch* sono state monitorate valutando l'assorbanza a 600 nm e 490 nm, il pH, la concentrazione di glucosio e il peso secco della biomassa (paragrafi 2.7.4, 2.7.5 e 2.7.3).

Dal momento del primo *fed-batch* sino al termine della fermentazione, la valutazione dell'assorbanza a 600 e 490 nm è stata effettuata previa diluizione (1:40). Questa operazione si è resa necessaria dato che il valore misurato senza diluizione si trovava al di fuori dall'intervallo di linearità.

Anche in questo caso si è effettuata la separazione della biomassa ogni 24 ore per l'estrazione dei carotenoidi (paragrafo 2.6.1). I dati di biomassa rilevato prima e dopo l'effettuazione del *fed-batch* sono stati ottenuti misurando la biomassa presente nella coltura prima del *fed-batch* e calcolando la biomassa successiva al *fed-batch* considerando l'effetto dell'aggiunta del terreno di coltura come una diluizione 1:2.

2.5 Fermentazioni in bioreattore



Figura 2.2 Immagine del bioreattore Bioengineering® (RALF Advanced Microbial).

Le fermentazioni sono state condotte nel bioreattore RALF Advanced Microbial, Bioengineering®). Il vessel del reattore, in vetro borosilicato, ha un volume nominale di 3.7 litri e presenta una camicia esterna per il mantenimento della temperatura. Il coperchio è costruito con acciaio inossidabile e presenta accessi per:

- Le sonde di misurazione di pH (EasyFerm Plus PHI Arc 325, Hamilton);
- Ossigeno disciolto (DO) (VisiFerm DO Arc 325 H0, Hamilton);
- Il sensore per la temperatura (Pt100);
- Il rotore per l'agitazione;
- Il supporto per il motore;
- L'allaccio alla linea dell'aria;
- L'accesso per l'inoculo;
- Il punto di prelievo campioni;

- La linea di uscita dei gas collegata ad un condensatore con raffreddamento ad acqua.

Nella colonna costituente l'unità di controllo sono presenti resistenze per il riscaldamento dell'acqua di termostatazione, la pompa di circolazione dell'acqua di raffreddamento e le valvole di regolazione dell'aria, oltre che al collegamento elettrico e al computer su cui è installato il software di gestione del bioreattore.

L'agitazione è fornita da due rotori radiali Rushton (diametro di 4.8 cm) con sei pale montati su un singolo albero. La girante posizionata in basso si trova ad una distanza di 2 cm dal fondo del bioreattore, mentre la seconda è montata più in alto ad una distanza pari al diametro delle giranti. All'interno del bioreattore, sul fondo, è presente uno sparger circolare collegato alla linea dell'aria compressa introdotta al suo interno previa filtrazione (con filtro da 0.22 μm) per garantire la sterilità. Il reattore dispone inoltre di tre pompe peristaltiche, una a portata variabile e due a portata fissa. La pompa a portata variabile è stata utilizzata per effettuare l'inoculo, per l'aggiunta dell'antischiuma e come pompa di servizio per lo svuotamento e riempimento del reattore.

Gli strumenti di misura utilizzati nel corso della fermentazione sono:

- la sonda temperatura;
- la sonda di pH;
- la sonda per l'ossigeno disciolto.

Il bioreattore è collegato ad un computer dedicato con un software di supporto. L'interfaccia principale è un diagramma sinottico digitale denominato bioSCADA. Su questa pagina sono presentati i dati misurati in tempo reale. Sull'interfaccia è possibile inserire i parametri della fermentazione che vengono mantenuti costanti da un sistema di controllo con logica di tipo proporzionale integrale derivativo (PID). I controllori utilizzati sono stati: temperatura, ossigeno disciolto e agitazione. Il pH invece è stato monitorato ma non controllato in tutte le prove. Tutte le variabili rilevate dagli strumenti in campo sono diagrammate su una interfaccia denominata "analyzer" presente nel software di gestione del reattore. È inoltre è possibile esportare i dati registrati in un file di tipo ".csv".

La preparazione del reattore è analoga in tutte le prove effettuate. Siccome lo sciroppo di BSG utilizzato in tutte le prove si trova già in condizioni di sterilità, il reattore viene sterilizzato con un volume d'acqua pari al volume di coltura (2 L). Prima di inserire il bioreattore nell'autoclave bisogna installare negli appositi alloggiamenti le sonde di ossigeno disciolto e di pH. Quest'ultima è precedentemente calibrata utilizzando due soluzioni a pH 4 e 7. La calibrazione della sonda per pH si effettua esternamente al reattore. Innanzitutto, bisogna selezionare la modalità di calibrazione sul programma bioScada. Successivamente si inserisce la sonda, mantenuta in posizione verticale, nella prima nella soluzione a pH 4 e poi nella soluzione a pH 7. In entrambi i casi si aspetta che il valore indicato sia stabile per poi dare conferma della calibrazione. Una volta effettuata la sterilizzazione in autoclave (121°C, 2 atm, 20 minuti), avviene lo svuotamento dell'acqua e il caricamento dello sciroppo. Queste operazioni sono effettuate sotto cappa a flusso laminare per mantenere la sterilità. È importante che tutti punti di accesso tranne quello adibito al carico del terreno di coltura siano chiusi. Il reattore è quindi collegato alla stazione di controllo dove vengono collegati gli strumenti di misura (sonda del pH, sonda di concentrazione dell'ossigeno e sonda di temperatura), il motore e l'acqua di raffreddamento della camicia. Una volta avviato il sistema di controllo di temperatura e

raggiunta la temperatura desiderata, si può procedere alla calibrazione della sonda di concentrazione dell'ossigeno. Dato che l'indicazione della concentrazione è in termini di percentuale, la calibrazione avviene indicando gli estremi di concentrazione, 0 e 100% di saturazione. Per raggiungere l'assenza di ossigeno disciolto nel terreno di coltura, si insuffla azoto (sterilizzato tramite filtrazione, 0.22 μm) attraverso lo sparger. Si attende quindi che il valore indicato si stabilizzi per impostare lo zero. Per la saturazione al 100% si procede in maniera analoga, ma insufflando aria. Una volta terminata la calibrazione, il reattore è pronto per l'inoculo. Questo è effettuato a partire da una coltura di *R. mucilaginosa* in sciroppo effettuata in beuta, della durata di 12 ore. Al momento dell'inoculo, come descritto per le fermentazioni in beuta, la coltura è opportunamente diluita con sciroppo per la standardizzazione. L'inoculo, preparato all'interno di una beuta da 500 mL con collo normalizzato, in condizioni di sterilità è immesso nel reattore utilizzando la pompa peristaltica a portata variabile.

2.5.1 Condizioni di fermentazione in reattore con sciroppo di BSG in modalità batch

Le condizioni colturali applicate per le fermentazioni batch condotte in reattore sono state:

- Temperatura: 25°C;
- Velocità di agitazione: 150 rpm;
- Durata 72 ore;
- Ossigeno disciolto: 60%;
- pH monitorato non controllato;
- Aggiunta di antischiuma SE-15, 0.02% in volume, a 5 ore dall'inizio della fermentazione.

Come per le prove in beuta, si sono effettuati periodici prelievi al fine di valutare l'assorbanza a 600 e 490 nm, il pH, la concentrazione di glucosio e il peso secco della biomassa (paragrafi 2.7.4, 2.7.5 e 2.7.3). Inoltre, nel corso della fermentazione ed al termine di essa si sono effettuati prelievi per recuperare la biomassa da cui estrarre i carotenoidi (paragrafo 2.6.1).

2.6 Estrazione dei carotenoidi.

2.6.1 Preparazione della biomassa per l'estrazione

La biomassa di *R. mucilaginosa*, prodotta a seguito delle fermentazioni in beuta o in reattore, è stata separata dal terreno di coltura mediante centrifugazione a 4.100 rpm per 10 minuti a 4°C. La biomassa è stata quindi lavata 3 volte con tampone PBS, pH 7.4, e centrifugata sempre a 4.100 rpm per 10 minuti a 4°C.

2.6.2 Pretrattamento della biomassa

I carotenoidi presenti nella biomassa costituiscono un metabolita intracellulare, questo significa che trovandosi all'interno delle cellule di *R. mucilaginosa*, per favorire l'estrazione dei composti di interesse, si possa ricorrere ad un meccanismo di rottura cellulare (Pagels et al. 2011). Nel presente lavoro di Tesi, il metodo applicato è stato il Freeze and Thaw (FT). Esso consiste nel sottoporre la biomassa, preparata come riportato nel paragrafo 2.6.1, a

congelamento a -20°C, per minimo 24 ore e scongelamento di 2 ore a temperatura ambiente per un numero prefissato di cicli. In questo caso sono state esplorate due opzioni; un ciclo di FT (1FT) e tre cicli di FT (3FT). Con lo scopo di confrontare l'efficacia del pretrattamento di FT la biomassa è stata sottoposta all'estrazione dei carotenoidi anche senza pretrattamento. In questo caso essa è stata utilizzata dopo la separazione dal terreno di coltura (denominata biomassa non sottoposta a pretrattamenti, NSP) senza essere sottoposta al congelamento.

Prima dell'inizio dell'estrazione è stato determinato il peso secco della biomassa, sia non sottoposta a pretrattamenti sia di quella scongelata (paragrafo 2.7.3). Ciò si è reso necessario al fine di calcolare il volume di solventi necessari all'estrazione, dimetilsolfossido e acetone, come descritto nel paragrafo 2.6.2.

2.6.2 Estrazione

Il metodo di estrazione (metodo 1) basato sui metodi di estrazione descritti da Lopes et al (2017) prevede:

- **Ciclo di estrazione con Dimetilsolfossido (DMSO):** si aggiungono alla biomassa 2 mL di DMSO per ogni 0.1 g di biomassa secca.
- Si miscela con l'ausilio del vortex (VELP ZX3) per 30 secondi.
- La provetta è quindi incubata in bagno termostatico (Julabo Corio C) per 15 minuti a 55°C, avendo cura di miscelare con il vortex per 30 secondi ogni 5 minuti.
- Si procede alla centrifugazione a 4100 rpm e a 25°C per 10 minuti.
- Si recupera il surnatante e si utilizza la biomassa per il successivo ciclo di estrazione.

Il ciclo di estrazione con DMSO è ripetuto per 4 volte per un totale di 4 cicli.

- **Ciclo di estrazione con Acetone:** dopo il 4° ciclo di estrazione con DMSO, si aggiunge alla biomassa l'acetone con proporzione di 5 mL ogni 0.1 g di biomassa secca.
- Si miscela con l'ausilio del vortex per 30 secondi.
- La provetta è incubata nel bagno ad ultrasuoni per 10 minuti a 25°C e ad una frequenza di 60 kHz miscelando con il vortex per 30 secondi ogni 5 minuti.
- Si procede alla centrifugazione a 4100 rpm per 10 minuti a 25°C;

Il solvente, separato per centrifugazione al termine di ciascun ciclo di estrazione, è quindi utilizzato per la valutazione spettrofotometrica dei carotenoidi totali come indicato nel paragrafo 2.7.7.

La procedura di estrazione dei carotenoidi è stata così modificata:

1) riducendo il numero dei cicli di estrazione con DMSO da quattro a tre (successivamente denominato metodo 2)
2) dimezzando il volume di acetone utilizzato da 5 mL a 2.5 mL ogni 0,1 g di biomassa secca (poi denominato metodo 3).

2.7 Valutazioni analitiche

2.7.1 Valutazione del pH della BSG

Per valutare il pH della BSG si sono preparate tre sospensioni: in acqua distillata, in una soluzione di NaCl 0,1 M e in una soluzione di $CaCl_2$ 0.01 M. In tutti i casi si è utilizzato un rapporto "solvente (mL): BSG secca (g)" pari a 3.6 (ad esempio sono stati utilizzati 50 mL di solvente e 20 g di BSG umida corrispondenti a 14 g di BSG secca). Le sospensioni sono state mantenute in agitazione per 2 ore a temperatura ambiente a 1000 rpm mediante un agitatore magnetico. Al termine, le sospensioni ottenute sono state lasciate sedimentare per 1 ora e si è quindi misurato il pH (paragrafo 2.7.4).

2.7.2 Determinazione del peso secco della BSG

La determinazione del peso secco della BSG è stata effettuata utilizzando una termobilancia (OHAUS MB120) impostata ad una temperatura di 80°C con una velocità di essiccazione di 1 mg/90s, al conferimento in laboratorio e dopo ogni scongelamento.

2.7.3 Determinazione del peso secco della biomassa

Nel corso delle fermentazioni ed al termine di esse la biomassa di *R. mucilaginosa* è stata separata dal terreno di coltura tramite centrifugazione a 4100 rpm per 10 minuti a 4°C centrifuga Eppendorf Centrifuge (5810 R) e successivamente lavata 3 volte con tampone PBS a pH 7.4 utilizzando la stessa modalità operativa. Il peso secco della biomassa così separata è stato valutato utilizzando la termobilancia impostata ad una temperatura di 105°C con una velocità di essiccazione di 1 mg/90s. Noto il peso secco è stato possibile calcolare la concentrazione della biomassa riferito al corrispondente volume colturale (mL).

2.7.4 Misurazione del pH

La determinazione del pH di tutte le soluzioni utilizzate nel corso della sperimentazione, dello sciroppo e dei prelievi effettuati dalle colture nel corso delle fermentazioni è stata eseguita con il pHmetro InoLab (pH 730).

2.7.5 Determinazione della concentrazione di glucosio

La determinazione della concentrazione di glucosio è stata effettuata sullo sciroppo di BSG nella fase di caratterizzazione e durante le fermentazioni sui campionamenti effettuati (in questo caso il terreno di coltura è stato sottoposto a centrifugazione a 4100 rpm per 10 min per separare la biomassa prima della determinazione). La valutazione è stata condotta utilizzando il kit enzimatico Enzytec® Liquid D-glucose della R-Biopharm. Il metodo prevede la valutazione spettrofotometrica dei campioni che reagiscono con le soluzioni enzimatiche ed i buffer forniti con il kit. È importante notare che l'intervallo di validità dei risultati è per una concentrazione di D-glucosio compresa tra 0,004 e 2 g/L, per questo motivo in determinati casi si è reso necessario diluire i campioni prima di effettuare la determinazione enzimatica per rientrare nell'intervallo di concentrazione.

2.7.6 Determinazione delle proteine totali

La determinazione della concentrazione delle proteine totali presenti nello sciroppo di BSG è stata effettuata utilizzando il metodo spettrofotometrico diretto. L'assorbanza misurata alla lunghezza d'onda di 280 nm spettrofotometro PerkinElmer (Lambda465) è stata correlata alla concentrazione delle proteine grazie due rette di taratura ottenute rispettivamente con soluzioni delle proteine del siero del latte (Whey Protein Isolate; WPI, Milei 90) e soluzioni di siero albumina bovina (Bovine Serum Albumin; BSA) (Sigma) mostrate nelle figure 2.2 e 2.3. In entrambe i casi si sono preparate soluzioni a concentrazione decrescente compresa tra 1 e 0.125 g/L di proteina.

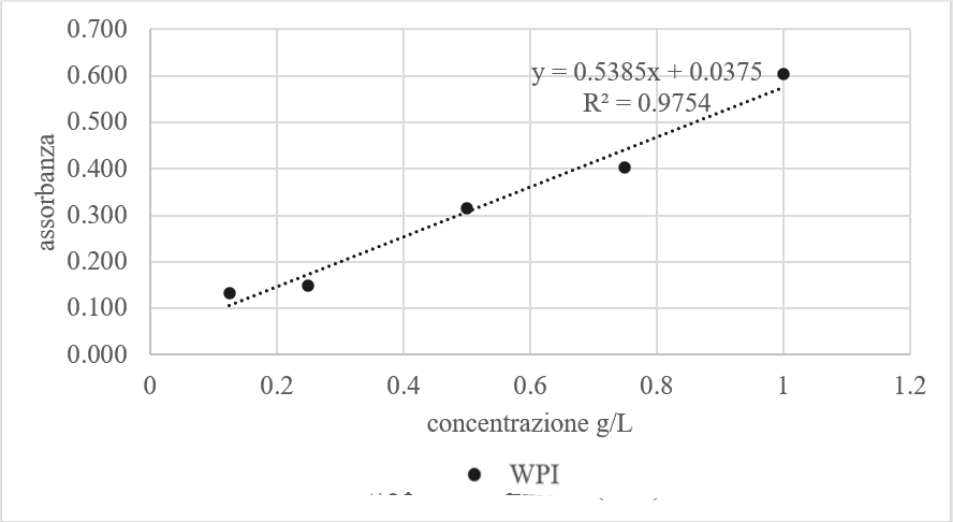


Figura 2.2 Retta di taratura realizzata con soluzioni di WPI.

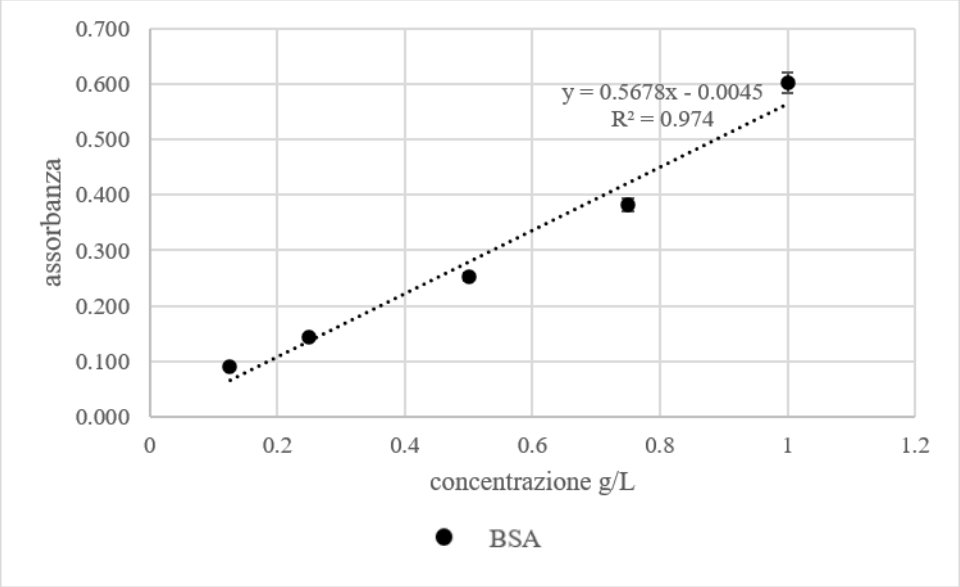


Figura 2.3 Retta di taratura realizzata con soluzioni di BSA.

2.7.7 Determinazione della quantità di carotenoidi totali estratti

La quantificazione dei carotenoidi totali estratti è stata condotta mediante la seguente equazione (Cheng & Yang, 2016);

$$Carotenoidi\ totali\ [\mu g/g\ ] = A \cdot D \cdot V\ /\ (E \cdot W) \qquad (2.1)$$

Dove A è l'assorbanza misurata allo spettrofotometro (PerkinElmer Lambda465) ad una lunghezza d'onda di 490 nm, D è il fattore di diluizione, V è il volume del solvente (mL), E è il coefficiente di estinzione molare relativo dei carotenoidi (0,16) e W è il peso secco della biomassa estratta (g).

La valutazione spettrofotometrica è stata effettuata al termine di ogni ciclo di estrazione: nel effettuando il bianco con il solvente utilizzato nel ciclo. Quindi, DMSO per i primi cicli e acetone per l'ultimo.

La resa volumetrica è stata calcolata moltiplicando il quantitativo di carotenoidi estratti misurati in µg/g per la biomassa ottenuta in g/L, ottenendo una resa volumetrica espressa in µg/L.

2.8 Analisi dei risultati

I dati sperimentali mostrati nel capitolo dei risultati sono il valore medio di 3 misure con la relativa deviazione standard. Inoltre, dove necessario, la significatività statistica tra due gruppi di dati è stata calcolata con il Student t-test, le differenze considerate significative hanno un valore di $p<0.05$.

3. Risultati e discussione

3.1 Preparazione e caratterizzazione della BSG

La BSG conferita al laboratorio è stata analizzata come indicato nel paragrafo 2.1. Il peso secco è stato valutato su campioni differenti tratti dallo stesso lotto; in questo modo è stato possibile ottenere un valore medio, più rappresentativo. Così facendo, si è ottenuto un valore di umidità pari a 69.7 ± 1.0 %. Questo valore risulta in linea con la letteratura, dove viene riportato un valore di umidità della BSG compreso nell' intervallo tra il 70% e l'80% (Dancker e al. 2024). Di seguito, è stato valutato il pH della BSG utilizzando tre differenti soluzioni, i cui valori sono riportati nella tabella 3.1.

	pH
$CaCl_2$	5.65±0.01
KCl	5.90±0.01
H2O	6.18±0.01

Tabella 3.1 pH misurato con le soluzioni di $CaCl_2$, KCl e acqua distillata.

La tabella 3.1 evidenzia come il pH delle soluzioni miscelate con la BSG abbia portato ad un valore di pH debolmente acido.

3.2 Preparazione dello sciroppo e caratterizzazione

Lo sciroppo è stato preparato come descritto nel paragrafo 2.1. Il rapporto tra acqua distillata e BSG umida utilizzato è stato pari a 5.7. In ogni beuta Erlenmeyer, con volume da 1L, sono stati aggiunti 200 g di BSG e secondo la formula (2.1) è stata calcolata la quantità di acqua distillata da aggiungere. Successivamente alla sterilizzazione in autoclave, lo sciroppo ottenuto è stato filtrato con uno strato di garza sterile e successivamente centrifugato come descritto nel paragrafo 2.1. Il prodotto finale è stato caratterizzato misurando pH, concentrazione di glucosio e di proteine totali. Quest'ultime sono state determinate come descritto nel paragrafo 2.7.3 utilizzando due differenti rette di taratura ottenute con proteine del siero del latte (WPI) e albumina sierica bovina (BSA).

Come si può notare dai dati mostrati nella tabella 3.2, il pH dello sciroppo di BSG è acido, 5.79. Questo dato è coerente con il risultato della caratterizzazione della BSG umida. I valori di concentrazione proteica determinati mediante misurazione spettrofotometrica a 280 nm e interpolati attraverso le rette di taratura costruite con WPI e BSA sono risultati pari a 22.42±2.17 g/L e 21.45±2.21 g/L, rispettivamente. Tenendo conto delle relative deviazioni standard, le due concentrazioni risultano del tutto sovrapponibili, dimostrando come l'impiego di WPI o BSA quali standard di calibrazione fornisca risultati sostanzialmente intercambiabili per la matrice analizzata. Il contenuto di glucosio (3,72 g/L) risulta essere più basso rispetto a quello del terreno YM (10 g/L) utilizzato per le prime colture in beuta.

pH	5.79±0.02
Concentrazione di glucosio (g/L)	3.75±0.2
Proteine totali BSA (g/L)	22.42±2.17
Proteine totali WPI (g/L)	21.45±2.21

Tabella 3.2 Risultati dei parametri misurati nella caratterizzazione dello sciroppo di BSG.

3.3 Fermentazioni in beuta con terreno YM

Le fermentazioni in beuta con terreno di coltura YM sono state effettuate con lo scopo di produrre biomassa per le prove di estrazione dei carotenoidi e la loro ottimizzazione. Sono state condotte due fermentazioni, denominate “coltura 1” e “coltura 2” in beute Erlenmeyer da 200 mL provviste di frangiflutti.

Nelle figure 3.1 e 3.2 sono rappresentate le curve di OD600, indice della crescita microbica, OD490, indice della produzione di carotenoidi, e pH. Si può notare come in entrambe le colture la fase di latenza abbia avuto una durata di 2 ore, e la fase stazionaria è stata raggiunta nelle prime 24 ore. In particolare, si nota come sia la coltura 1 che la coltura 2 arrivino ad un valore di OD600 superiore a 3 nelle prime 24 ore di fermentazione. I valori dell’OD490 hanno un andamento molto simile all’OD600. Il pH ha un andamento simile in entrambe le colture, costante durante le prime 10 ore per poi scendere ad un valore di 4.95 per la coltura 1 e 4.58 per la coltura 2, entrambi misurati a 24 ore dall’inoculo. Successivamente il pH torna a salire, in entrambi i casi, fino ad un valore superiore a 6 al termine della fermentazione. La biomassa ottenuta dopo 24 ore, mostrata nella tabella 3.3, risulta essere risulta essere differente nelle due colture, rispettivamente 4.90 g/L nella coltura 1 e 6.73 g/L nella coltura 2. Nonostante questa differenza ottenuta nelle prime 24 ore di fermentazione, al termine della prova, cioè a 48 ore, si nota come le colture abbiano prodotto una quantità di biomassa confrontabile, rispettivamente 8.35 g/L per la coltura 1 e 7.93 g/L per la coltura 2.

Tempo (ore)	Biomassa COLTURA 1 (g/L)	Biomassa COLTURA 2 (g/L)
24	4.90±0.15	6.73±0.20
48	8.35±0.26	7.93±0.22

Tabella 3.3 Biomassa ottenuta dalle colture 1 e 2 in terreno di coltura YM.

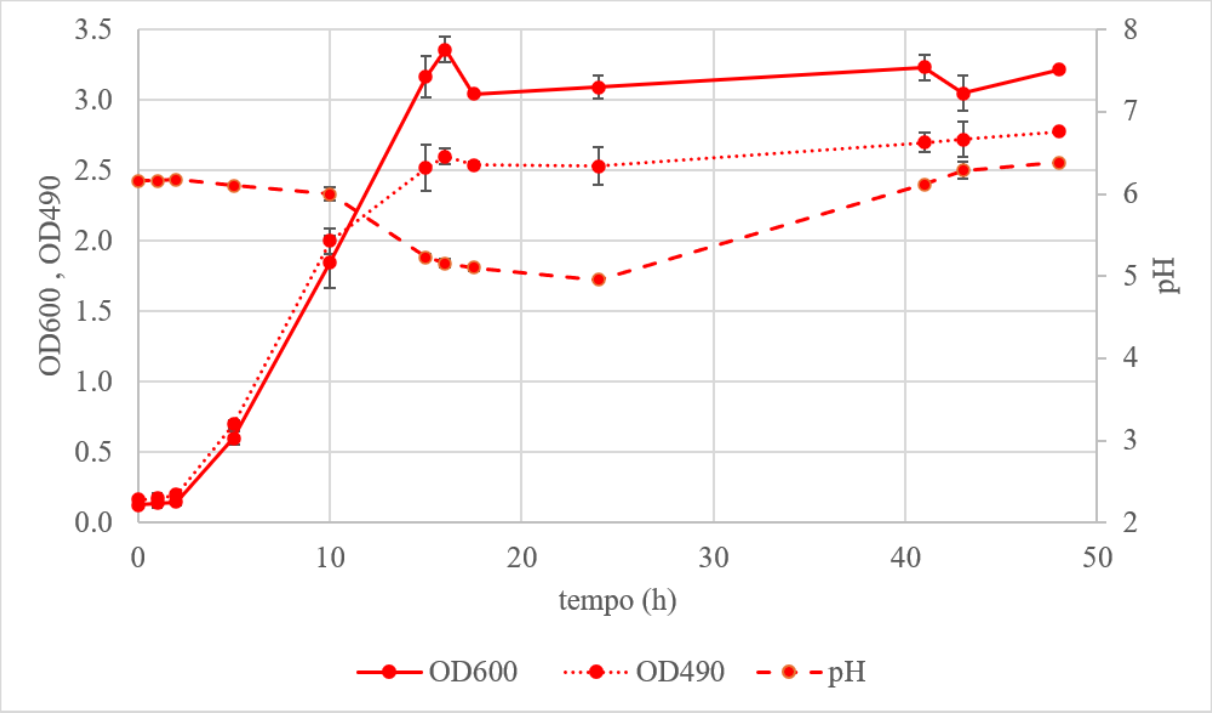


Figura 3.1 OD600, OD490 e pH coltura 1 con terreno di coltura YM.

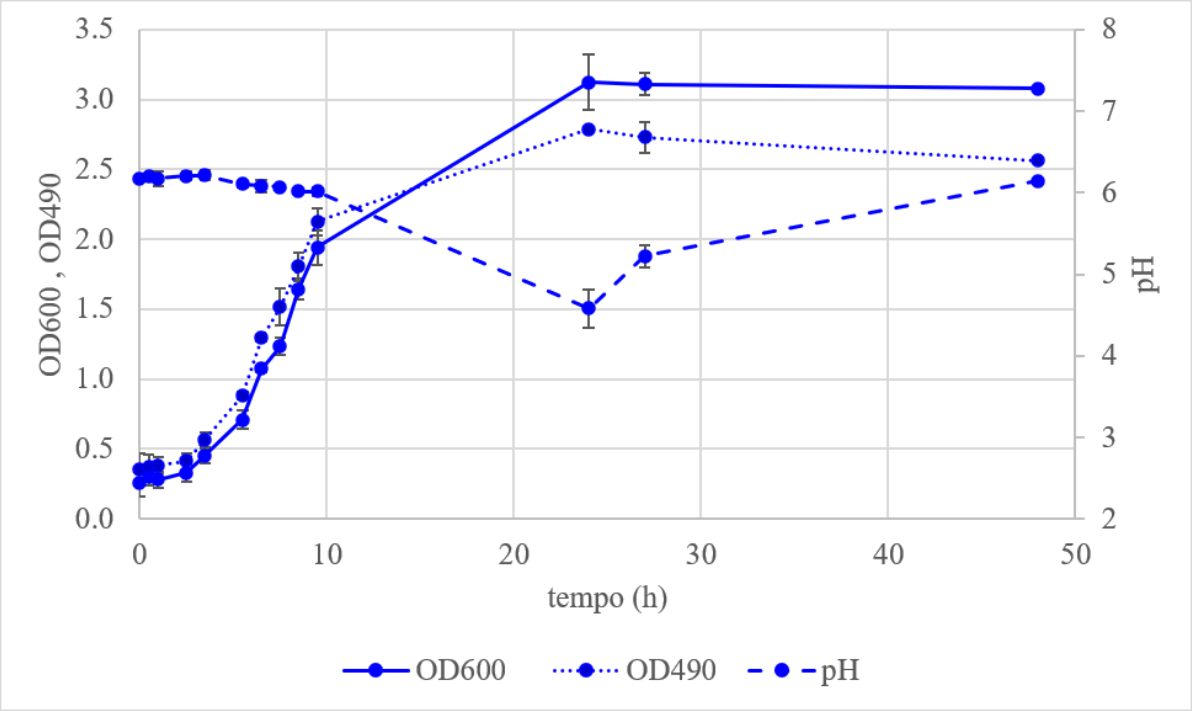


Figura 3.2 OD600, OD490 e pH coltura 2 con terreno di coltura YM.

3.4 Ottimizzazione del protocollo di estrazione dei carotenoidi

Nella figura 3.4 è mostrato lo schema di ottimizzazione del protocollo di estrazione dei carotenoidi. I riquadri con colore bianco rappresentano i cicli di estrazione comuni. Il metodo iniziale (metodo 1) da cui si è partiti è indicato in verde. La prima modifica effettuata (colore grigio) è stata l'introduzione del pretrattamento di 1FT e 3FT (paragrafo 3.4.1). La seconda modifica, il cui protocollo è denominato metodo 2, indicato in blu nello schema, è stata la riduzione dei cicli di estrazione con DMSO da quattro a tre (paragrafo 3.5.2). A partire dal metodo 2 si è poi proceduto a ridurre la quantità di acetone utilizzata nell'ultimo ciclo di estrazione, ottenendo il metodo 3 indicato in arancione (paragrafo 3.4.3) La biomassa utilizzata per le prove di estrazione è stata prodotta con due colture in beuta con terreno YM descritte nel paragrafo 3.3.

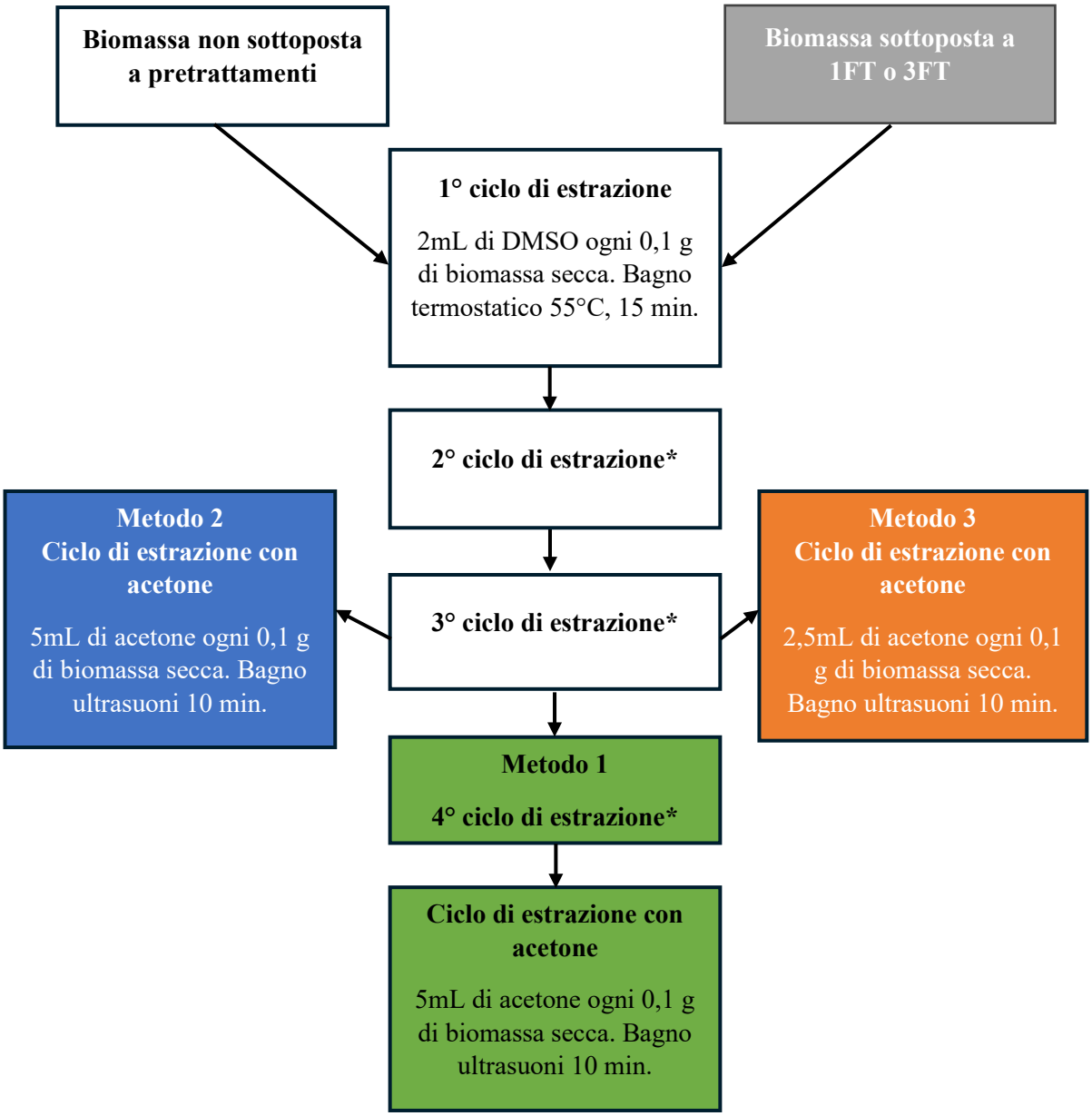


Figura 3.3 Schema di modifica del protocollo di estrazione dei carotenoidi in bianco gli elementi comuni a tutti i metodi, in verde gli ulteriori passaggi del metodo 1, in blu il metodo 2 e in arancione il metodo 3.

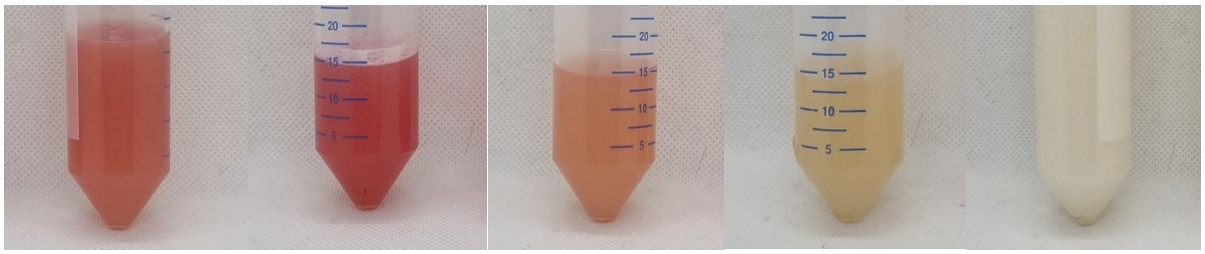


Figura 3.4 Variazione di colore durante i cicli di estrazione con metodo 1; da sinistra verso destra: 1° ciclo di estrazione con DMSO, 2°ciclo di estrazione con DMSO, 3°ciclo di estrazione con DMSO, 4° ciclo di estrazione con DMSO e ciclo di estrazione con acetone.

3.4.1 Pretrattamento di Freeze and Thaw

Con lo scopo di migliorare la resa specifica e quindi anche la resa volumetrica in carotenoidi si è introdotto il pretrattamento di Freeze and Thaw (FT). Il FT, come descritto nel paragrafo 2.6.1, consiste nel sottoporre la biomassa ad un numero prefissato di cicli di congelamento e scongelamento. L'obiettivo di questo pretrattamento è di sfruttare i cristalli di ghiaccio formatisi durante il processo di congelamento della biomassa per garantire una migliore distruzione cellulare, rendendo più accessibili i carotenoidi i quali, come citato nel paragrafo 1.3, all'interno della cellula si trovano principalmente in specifici organelli chiamati gocce lipidiche e nelle membrane cellulari. Il trattamento di FT è stato applicato in tutte le prove, contestualmente con l'estrazione da biomassa non sottoposta a trattamenti (riportata come NSP). Nei paragrafi 3.4.2 e 3.4.3, sono esposti i risultati delle modifiche apportate al protocollo di estrazione dei carotenoidi. Per ogni prova sono riportati i risultati ottenuti sia applicando il FT che utilizzando la biomassa non pretrattata. Per determinare il numero di cicli di FT da applicare alla biomassa sono state effettuate due prove: una con un singolo ciclo di FT (1FT) e una con tre cicli di FT (3FT). La procedura di estrazione utilizzata è stata quella descritta nel paragrafo 3.4.3 e denominata metodo 3.

	Biomassa NSP metodo 2 (µg/g)	**Biomassa 1FT metodo 2 (µg/g)**	**Biomassa 3FT metodo 2 (µg/g)**
DMSO 1	65.1±7.6	91.1±5.5	48.9±2.4
DMSO 2	123.2±13.8	212.1±12.7	257.1±16.4
DMSO 3	24.9±3.0	43.2±2.6	39.2±1.5
ACETONE	50.2±1.4	17.6±1.1	22.7±3.8
TOTALE	**263.4±27.9**	**364.0±21.8**	**367.9±29.3**

Tabella 3.4 Rese di estrazione nei vari passaggi a partire da biomassa NSP, 1FT e 3FT.

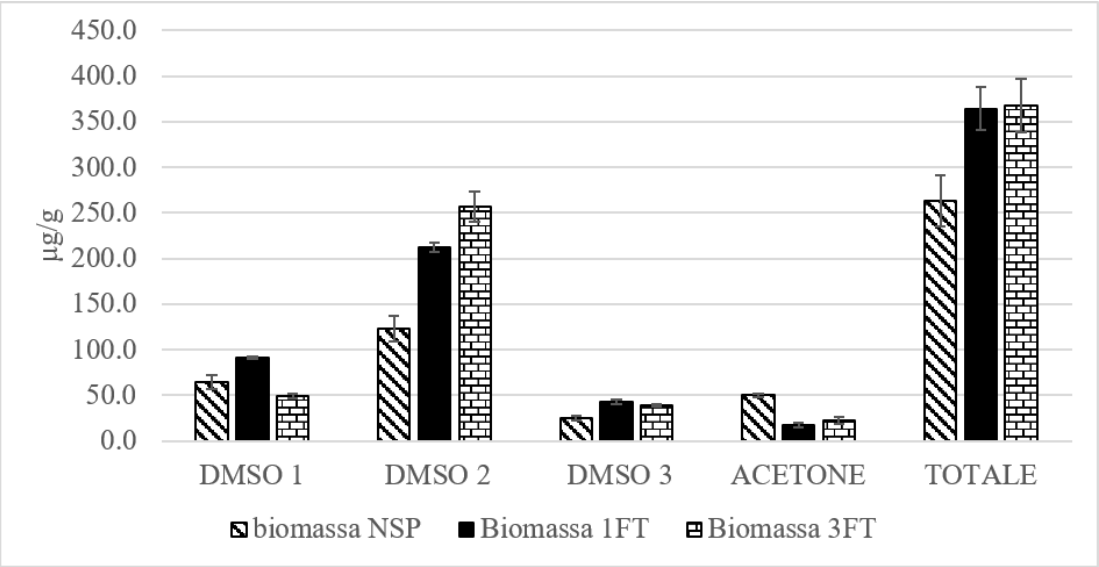


Figura 3.5 Rese di estrazione nei vari passaggi a partire da biomassa NSP, 1FT e 3FT.

I dati mostrati nella tabella 3.4 e nella figura 3.5 mostrano come in generale applicare il pretrattamento di FT sia vantaggioso sul recupero di carotenoidi, portando ad un aumento della resa specifica del 39.2±6.5% per 1FT e 39.7±7.3% per 3FT, rispetto alla biomassa NSP. Si nota inoltre, che il risultato ottenuto con 3FT e 1FT sia compatibile nella resa specifica di carotenoidi. Questo risultato porta alla decisione di applicare nelle successive prove 1FT invece di 3FT. Oltre alla resa, effettuare un solo ciclo di FT porta ad un notevole risparmio di tempo ed energia nella fase di recupero dei carotenoidi.

3.4.2 Riduzione del numero di cicli di estrazione con DMSO (Metodo 2)

Con l'obiettivo di ridurre l'utilizzo di DMSO e di impiegare meno tempo per l'estrazione dei carotenoidi, si è proposto di limitare i cicli di estrazione con DMSO da quattro a tre. Chiaramente tale procedura non deve ridurre significativamente la resa specifica in carotenoidi data dal protocollo di estrazione aggiornato. I dati mostrati nella tabella 3.5 e nella figura 3.6 mostrano come la riduzione dei cicli di estrazione con DMSO da quattro a tre non porti ad una riduzione dell'efficienza di estrazione a partire da campioni di biomassa NSP. Infatti, se si osserva la quantità totale di carotenoidi estratti i due valori, rispettivamente 260 µg/g nel caso di quattro cicli di estrazione e 261 µg/g nel caso di tre cicli, sono sovrapponibili con le deviazioni standard. Come si può notare la quantità di carotenoidi non estratti nel quarto ciclo con DMSO nella procedura modificata, sono estratti nell'ultimo ciclo di estrazione con acetone.

	Biomassa NSP Metodo 1 (µg/g)	Biomassa NSP Metodo 2 (µg/g)
DMSO 1	70.2±6.2	65.4±7.6
DMSO 2	119.9±3.4	123.1±13.8
DMSO 3	20.3±4.7	24.8±3.0
DMSO 4	10.2±0.7	Non effettuato
ACETONE	39.5±2.4	47.9±3.5
TOTALE	**260.1±17.4**	**261.2±27.9**

Tabella 3.5 Risultati della riduzione dei cicli di estrazione con DMSO da biomassa NSP.

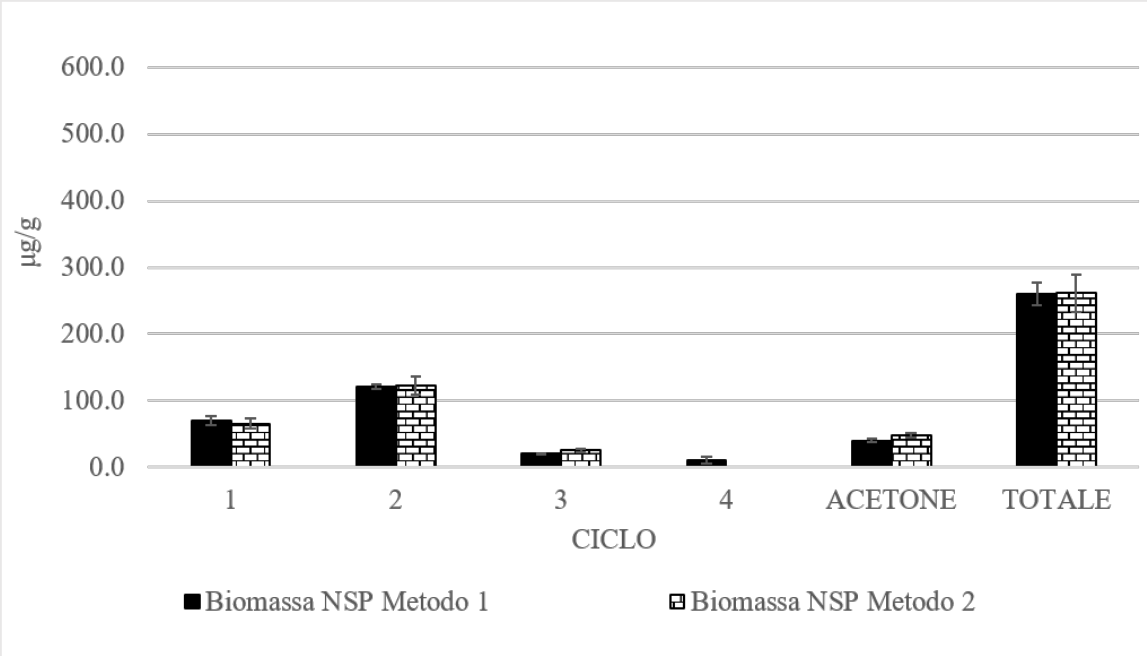


Figura 3.6 Risultati della riduzione dei cicli di estrazione con DMSO da biomassa NSP.

	Biomassa 1FT Metodo 1 (µg/g)	Biomassa 1FT Metodo 2 (µg/g)
DMSO 1	120.3±9.8	121.8±14.0
DMSO 2	255.1±7.2	245.3±22.8
DMSO 3	41.8±1.7	57.2±3.0
DMSO 4	20.1±1.1	Non effettuato
ACETONE	64.8±11.9	69.9±2.8
TOTALE	**502.1±30.4**	**494.2±42.6**

Tabella 3.6 Risultati della riduzione dei cicli di estrazione con DMSO da biomassa 1FT.

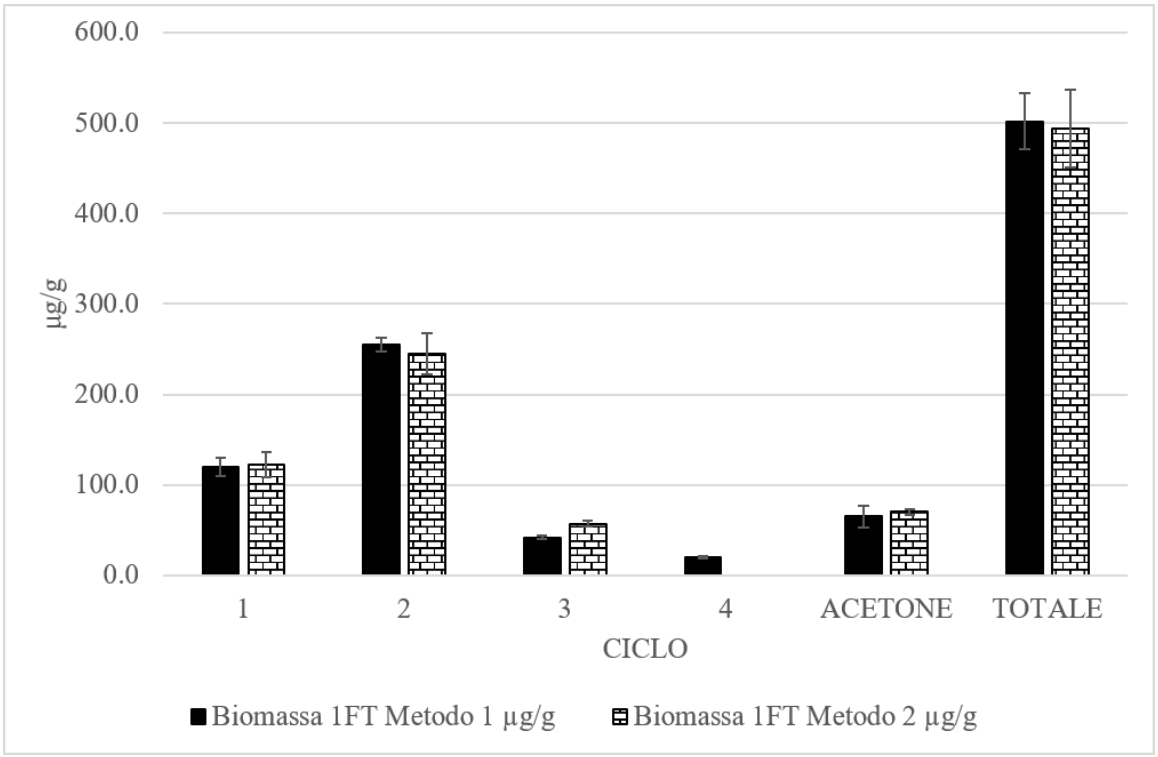


Figura 3.7 Risultati della riduzione dei cicli di estrazione con DMSO da biomassa 1FT.

Per confermare la validità della modifica del protocollo di estrazione dei carotenoidi. È stata effettuata una prova analoga anche su biomassa sottoposta a pretrattamento 1FT. Come si può osservare nella tabella 3.6 e anche nella figura 3.7, come nella prova su biomassa NSP, il risultato, in termini di resa specifica totale in carotenoidi, è confrontabile, confermando ciò che è stato osservato a partire da biomassa NSP, anche per la biomassa 1FT. L'applicazione del

pretrattamento 1FT ha portato ad un aumento della resa specifica del 93.0±6.1% per il metodo 1 e del 89.2±9.1% per il metodo 2.

3.4.3 Riduzione del volume di acetone utilizzato (Metodo 3)

A differenza del DMSO, l'acetone espone gli operatori e l'ambiente ad un rischio maggiore in termini di sicurezza. Secondo la scheda di sicurezza (Sigma-Aldrich) l'acetone è infatti classificato come liquido infiammabile con vapori infiammabili, provoca inoltre grave irritazione oculare e può provocare sonnolenza e vertigini. Per questo motivi viene maneggiato all'interno della cappa chimica. Si è pensato quindi di ridurre l'esposizione e l'utilizzo di questo solvente, dimezzando la quantità utilizzata per l'estrazione dei carotenoidi come descritto nel paragrafo 2.6.2. La quantità di acetone utilizzata è stata quindi variata da 5 mL ogni 0.1 g di biomassa secca a 2.5 mL ogni 0.1 g di biomassa secca. La procedura di estrazione utilizzata è stata quella modificata con tre cicli di estrazione con DMSO.

I dati mostrati nella tabella 3.7 e nella figura 3.8 mostrano come il ciclo di estrazione con acetone non abbia subito riduzione nella resa specifica in carotenoidi a fronte della diminuzione del rapporto tra volume di solvente e biomassa. Per verificare che la modifica nel protocollo di estrazione avesse lo stesso risultato anche nell'estrazione di carotenoidi da biomassa 1FT è stata effettuata una prova con le stesse modalità operative.

	Biomassa NSP Metodo 2 (µg/g)	**Biomassa NSP Metodo 3 (µg/g)**
DMSO 1	65.4±7.6	72.1±7.0
DMSO 2	123.1±13.8	128.3±11.1
DMSO 3	24.8±3.0	12.7±1.1
ACETONE	**47.9±3.5**	**50.0±4.0**
TOTALE	**261.2±27.9**	**263.1±23.2**

Tabella 3.7 Risultati della riduzione del volume di acetone con biomassa NSP.

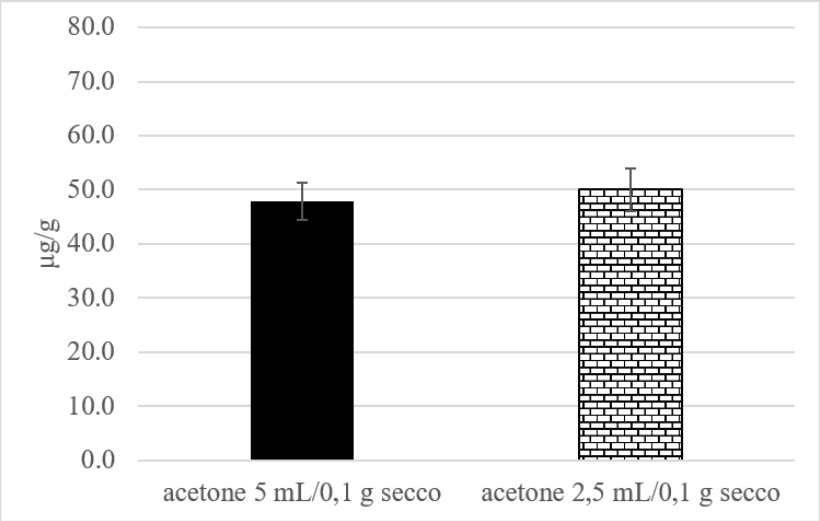


Figura 3.8 Carotenoidi estratti dal ciclo di estrazione con acetone con biomassa NSP.

Nella tabella 3.8 e nella figura 3.9 sono esposti i risultati della prova di estrazione modificata con biomassa 1FT. Anche in questo caso si nota come la resa specifica di estrazione dei carotenoidi abbia un risultato sovrapponibile sia nella quantità totale estratta che nella quantità estratta dal singolo ciclo con acetone. Per quanto riguarda il trattamento 1FT, effettuato sulla biomassa poi estratta con il metodo 3, ha portato ad un aumento della resa specifica di estrazione del 86.2±7.7%.

	Biomassa 1FT Metodo 2 (µg/g)	**Biomassa 1FT Metodo 3 (µg/g)**
DMSO 1	121.8±14.0	118.1±11.1
DMSO 2	245.3±22.8	248.8±19.6
DMSO 3	57.2±3.0	56.7±4.1
ACETONE	**69.9±2.8**	**66.2±3.9**
TOTALE	**494.2±42.6**	**489.8±38.7**

Tabella 3.8 Risultati della riduzione del volume di acetone con biomassa NSP.

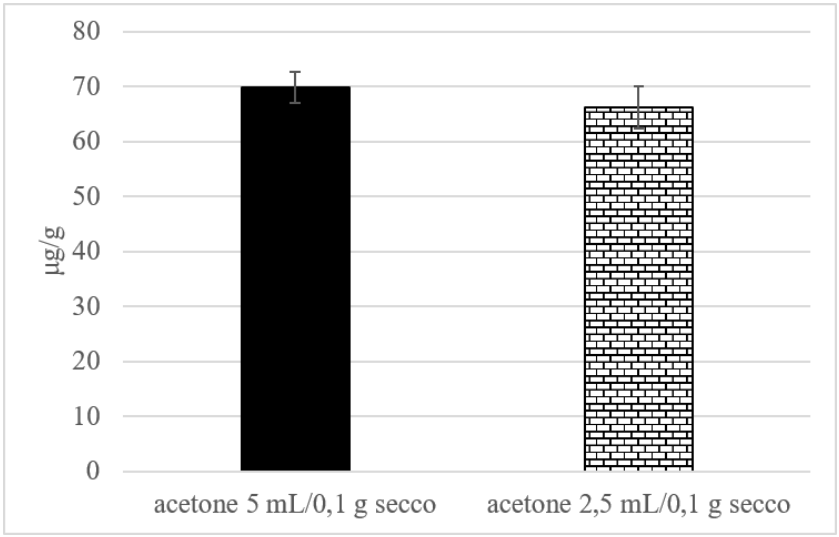


Figura 3.9 Carotenoidi estratti dal ciclo di estrazione con acetone con biomassa NSP.

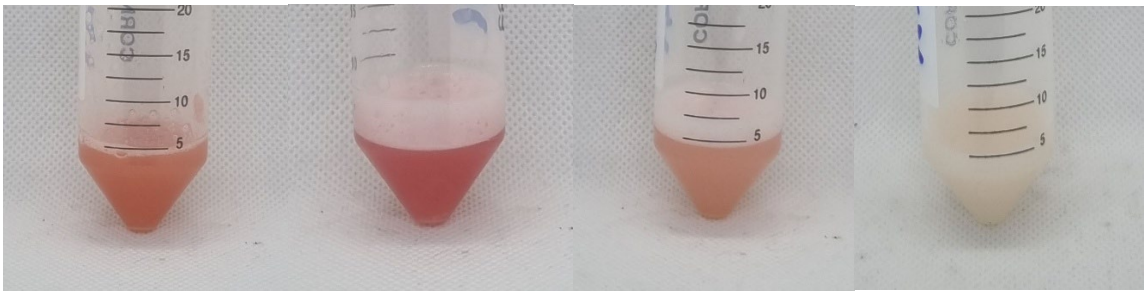


Figura 3.10 Variazione della colorazione del campione 1FT durante i di estrazione con il metodo 3; da sinistra verso destra: 1° ciclo di estrazione con DMSO, 2°ciclo di estrazione con DMSO, 3°ciclo di estrazione con DMSO e ciclo di estrazione con acetone.

Come si può notare nella figura 3.10, il campione sottoposto a estrazione con il metodo 3, subisce un processo di decolorazione. Questo è indice, seppur qualitativo, dell'efficacia dell'estrazione dei carotenoidi. Nell'ultimo ciclo di estrazione, effettuato con acetone, il campione arriva ad avere un aspetto lattiginoso.

3.5.4 Confronto tra le prove di estrazione

Nelle Figure 3.11 e 3.12 sono riportate le rese specifiche totali in carotenoidi ottenute con i diversi protocolli estrattivi testati. Dai dati emerge come, sia nel caso della biomassa non pretrattata (NSP) sia per quella sottoposta a un ciclo di congelamento e scongelamento (1FT), i risultati relativi ai tre metodi risultino confrontabili. Innanzitutto, si osserva come il pretrattamento 1FT incrementi in modo determinante l'efficienza di estrazione indipendentemente dal metodo applicato: a titolo esemplificativo, impiegando il Metodo 2, la resa specifica aumenta da 261.2±27.9 µg/g per la biomassa NSP a 494.2±42.6 µg/g con 1FT,

con una differenza statisticamente significativa (p=0.009). In secondo luogo, la riduzione da quattro a tre cicli con DMSO non compromette la capacità estrattiva del sistema, garantendo un risparmio di 2 mL di solvente per ogni 0.1 g di biomassa secca; il confronto tra il Metodo 1 (502.1±30.4 µg/g) e il Metodo 2 (494.2±42.6 µg/g) su biomassa 1FT non mostra infatti differenze statisticamente significative (p=0.081). Infine, anche il dimezzamento del volume di acetone da 5 a 2.5 mL per 0.1 g di biomassa nell'ultimo ciclo (Metodo 3) consente di mantenere inalterato il recupero di carotenoidi. L'assenza di variazioni significative tra il Metodo 2 e il Metodo 3 (489.8±38.7 µg/g , p=0.073) conferma la possibilità di ridurre sensibilmente il consumo di solventi organici senza penalizzare la resa complessiva.

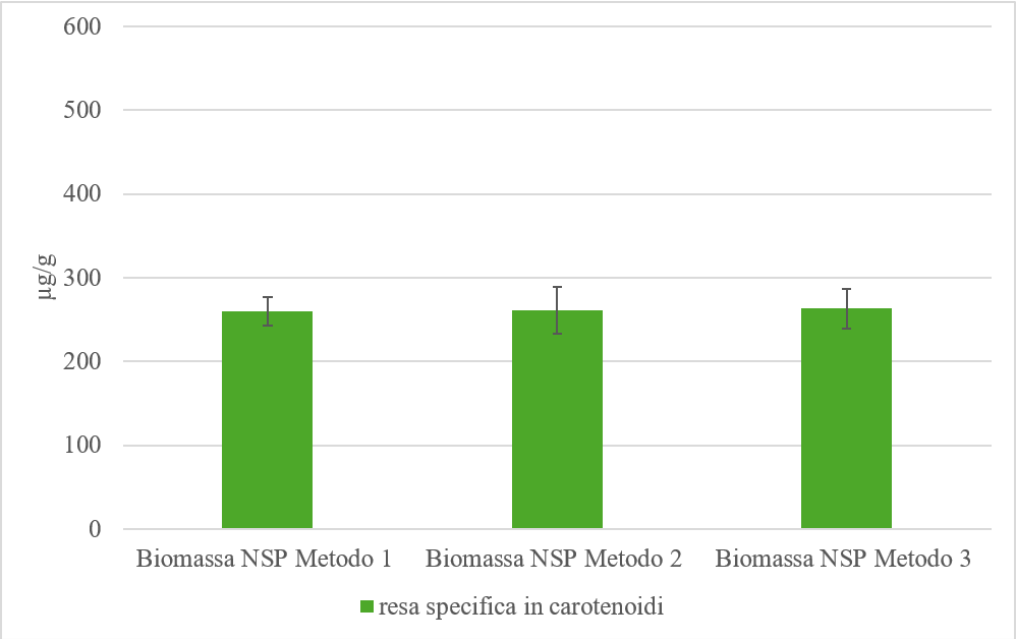


Figura 3.11 Confronto resa specifica in carotenoidi con campioni NSP.

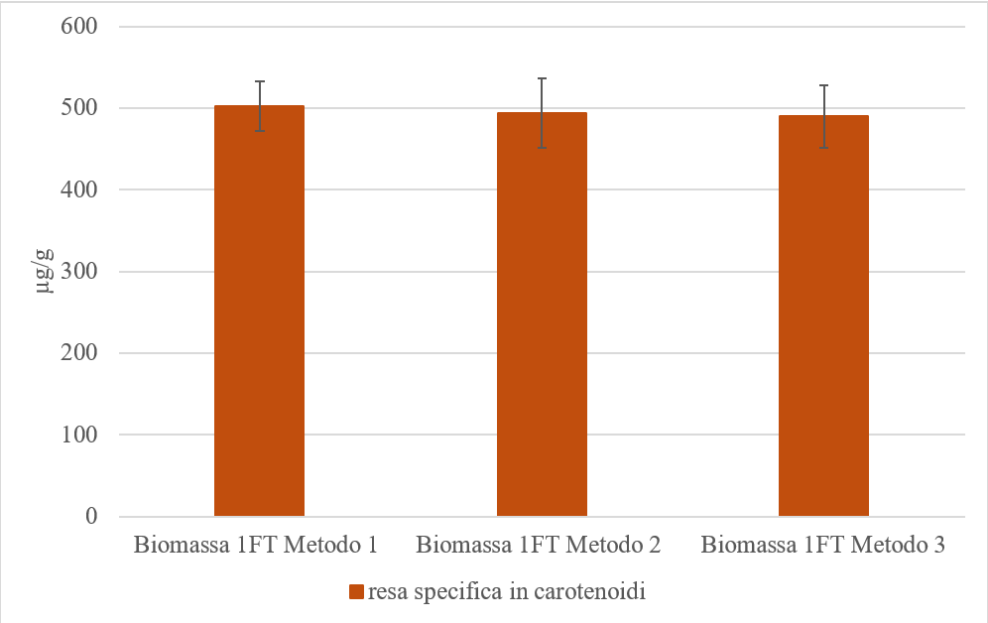


Figura 3.12 Confronto resa specifica in carotenoidi con campioni 1FT.

In conclusione, le prove di ottimizzazione del protocollo di estrazione dei carotenoidi hanno mostrato come sia la riduzione dei cicli di estrazione con DMSO da quattro a tre, che la riduzione della quantità di acetone utilizzata, non riducano la quantità di carotenoidi estratti. Quindi, il metodo 3 è scelto per tutte le successive estrazioni di carotenoidi da biomassa compreso di pretrattamento di 1FT.

3.5 Fermentazione in beuta con sciroppo di BSG

3.5.1 Fermentazione in beuta con sciroppo di BSG in modalità batch

Le fermentazioni in beuta condotte in modalità *batch* impiegando lo sciroppo di BSG come terreno di coltura sono finalizzate all'ottenimento di informazioni e parametri di processo necessari ad un confronto sistematico sia con le prove in *batch* svolte sul terreno YM, sia con le successive sperimentazioni in beuta condotte in modalità *fed-batch* e con quelle effettuate in *batch* all'interno di un bioreattore. Per l'estrazione dei carotenoidi dalla biomassa ottenuta è stato utilizzato il protocollo denominato come metodo 3.

La crescita della coltura, monitorata attraverso l'OD_{600}, mostra una fase di latenza di circa un'ora e raggiunge la fase stazionaria durante le prime 24 ore di fermentazione con un OD_{600} di 3.219. In concomitanza con la fase esponenziale di crescita il valore del pH subisce una variazione, riducendosi da un valore iniziale di 5.72 ad un minimo di 4.53. La concentrazione glucosio all'inizio della fermentazione è di 3.56 g/L e, durante le prime 24 ore, scende ad un valore pari a zero. Calcolando la velocità di consumo del glucosio, la velocità massima valutata si trova nell'intervallo dal t_0 a 3 ore, che si attesta a 0.43 g/L/h. Invece tra le 3 ore e le 24 la velocità di consumo del glucosio media subisce un rallentamento e risulta equivalente a 0.11 g/L/h.

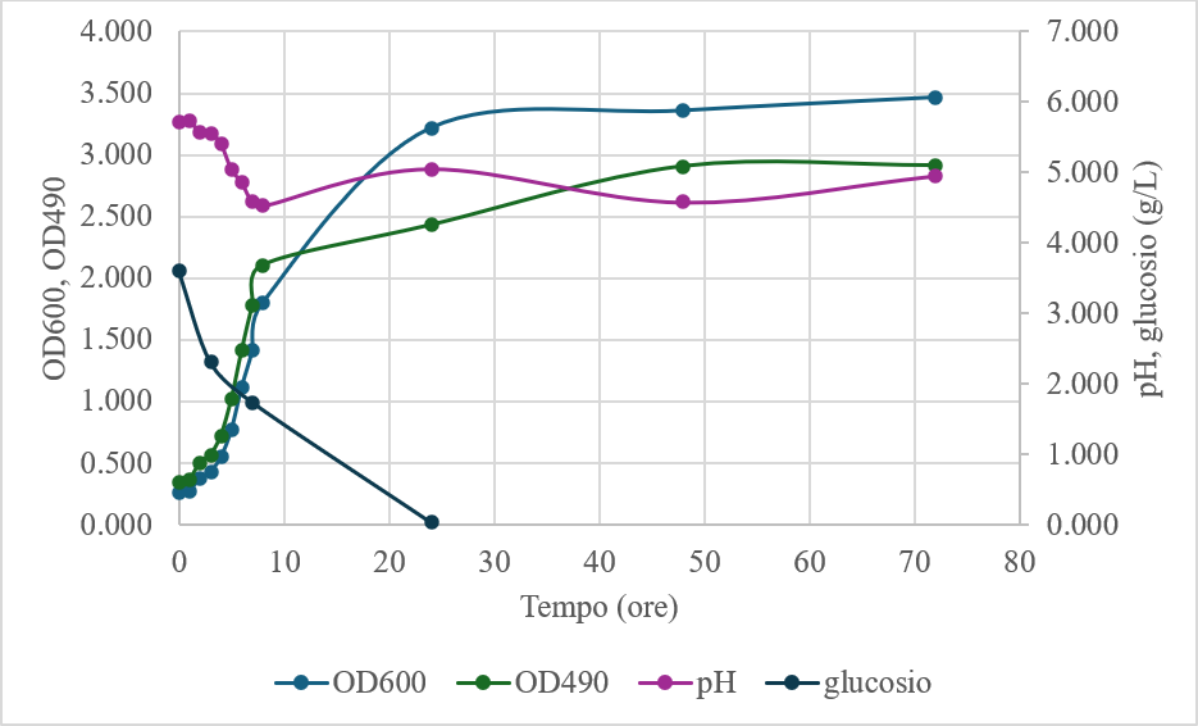


Figura 3.13 Andamento dell'OD_{600}, OD_{490}, concentrazione di glucosio e pH (coltura batch).

Tempo (ore)	OD_{600}	OD_{490}	pH	Biomassa (g/L)
0	0.260	0.342	5.72±0.04	-
24	3.219	2.431	5.05±0.03	3.56±0.09
48	3.360	2.907	4.58±0.06	4.34±0.11
72	3.467	2.914	4.95±0.04	4.82±0.14

Tabella 3.9 OD_{600}, OD_{490}, pH, biomassa (coltura batch).

Nella figura 3.13 si nota che il valore di OD_{600} si stabilizza, dopo 24 ore di fermentazione fino alle 72 ore, ad un valore superiore a 3. Il comportamento del valore di OD_{490} è di forte crescita durante la fase esponenziale, per poi subire un rallentamento con una crescita più graduale rispetto all'OD_{600} ed infine stabilizzarsi ad un valore nell'intorno di 2.9 dopo le 48 ore di fermentazione. Il valore del pH mostra un valore compreso tra 5.05 misurato a 24 ore e 4.58 misurato a 48 ore. La biomassa cresce stabilmente fino ad un valore di 4.82 g/L a 72 ore. Tuttavia, è importante tenere in considerazione che sia la misurazione dell'OD_{600} che della biomassa tengono conto sia delle cellule vive che morte, quest'ultime potrebbero andare in

contro alla lisi cellulare che riverserebbe i carotenoidi nel terreno di coltura che viene poi scartato dopo la centrifugazione. Nell'ottica di determinare la durata più efficiente della coltura, nell'ottica della produzione di carotenoidi, è importante anche considerarne la resa specifica e volumetrica. Nella tabella 3.10 si può notare come tenendo in conto la deviazione standard, sia per la resa specifica che per la resa volumetrica di estrazione dei carotenoidi, i valori ottenuti a 48 e 72 ore siano sovrapponibili, evidenziando che, da un punto di vista di ottimizzazione di processo, questo dato possa far optare per una fermentazione con una durata di 48 ore.

Tempo (ore)	Resa specifica di carotenoidi (µg/g)	Resa volumetrica di carotenoidi (µg/L)	Resa specifica oraria di carotenoidi (µg/g/h)	Resa volumetrica oraria di carotenoidi (µg/L/h)
24	393±27	1399±131	16.4±1.1	58.3±5.8
48	542±34	2299±203	11.3±0.7	47.9±4.8
72	574±41	2541±250	8.0±0.6	35.3±3.5

Tabella 3.10 resa specifica e resa volumetrica di carotenoidi.

L'andamento temporale della biosintesi (tabella 3.5) mostra una chiara correlazione tra la durata della fermentazione e l'accumulo dei carotenoidi. Tra le 24 e le 48 ore si registra la fase di massima sintesi: la resa specifica cresce da 393±27 µg/g a 542±34 µg/g (+37.9%), mentre la resa volumetrica evidenzia un incremento del 64.3%, passando da 1399±131 µg/L a 2299±203 µg/L. Nella finestra temporale compresa tra le 48 e le 72 ore, il tasso di accumulo diminuisce, fino a raggiungere valori massimi pari a 574±41 µg/g per la resa specifica e 2541±250 µg/L per la resa volumetrica. I parametri orari evidenziano un comportamento inverso rispetto all'accumulo totale. Sia la produttività specifica oraria che quella volumetrica oraria raggiungono il valore massimo nelle prime 24 ore di fermentazione (16.4±1.1 µg/g/h e 58.3±5.8 µg/L/h, rispettivamente). Nelle ore successive, entrambi i parametri subiscono una contrazione, riducendosi a 72 ore fino a 8.0±0.6 µg/L/h (-51.2%) e 35.3±3.5 µg/L/h (-39.5%). Tale andamento dimostra che, sebbene la concentrazione totale di carotenoidi aumenti fino a 72 ore, l'efficienza temporale decresce dopo le 24-48 ore. In un'ottica di ottimizzazione del processo, la definizione del momento ideale di raccolta rappresenterà un compromesso strategico tra la massimizzazione della resa volumetrica finale e l'ottimizzazione della produttività oraria del reattore. Quindi, ottenendo una resa volumetrica confrontabile tra 48 e 72 ore, la soluzione migliore sembrerebbe essere di arrestare la coltura a 48 ore.

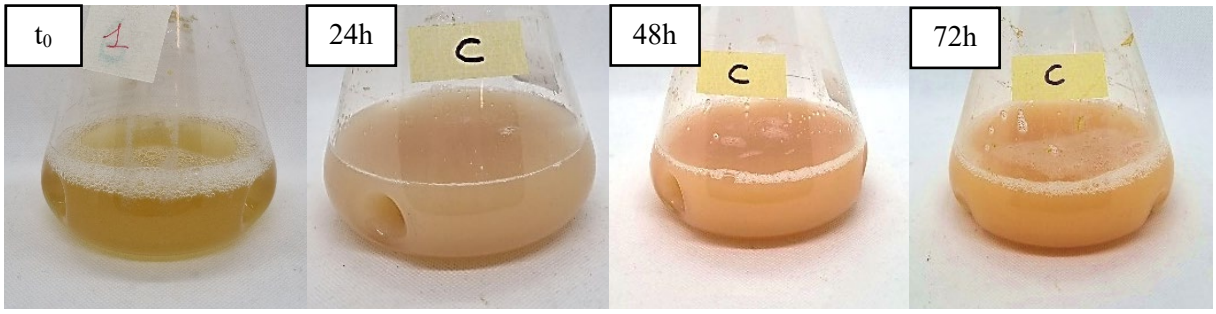


Figura 3.14 variazione di colore della coltura batch con sciroppo di BSG

Le figure 3.14 è mostrata la progressione della colorazione della coltura durante la fermentazione. Come si può notare durante le prime 48 ore si ha una variazione notevole nel colore, mentre tra 48 e 72 ore la colorazione non varia considerevolmente. Questo aspetto è anche visibile nelle letture spettrofotometriche a 490 nm (OD_{490}). Infatti, a 24 ore il valore risulta essere 2.431 mentre a 48 ore 2.907 e a 72 ore 2.914.

Confrontando la coltura effettuata con terreno di coltura YM e la coltura effettuata con sciroppo di BSG, si può notare come la principale differenza sia la biomassa prodotta in 48 ore di fermentazione. Infatti, il valore medio della biomassa ottenuta dalle colture in YM risulta essere di 8.14±0.24 g/L maggiore rispetto ai 4.34±0.11 g/L ottenuti con lo sciroppo di BSG. Questo potrebbe essere dovuto alla differenza di concentrazione di glucosio nei due terreni, rispettivamente 10 g/L nel terreno YM e 3.56 g/L nello sciroppo di BSG. Per quanto riguarda le curve di crescita si registra nel terreno YM una fase di latenza di 2 ore mentre nel caso dello sciroppo di BSG ne osserviamo un'ora. In entrambi i casi la fase stazionaria è raggiunta nelle prime 24 ore di fermentazione con valori di OD_{600} rilevati maggiori di 3. Anche l'andamento dell'OD_{490} risulta essere simile, con la differenza che i valori massimi nel terreno YM risultano essere nell'intorno di 2.5 mentre nel caso dello sciroppo di BSG si ottengono valori più altri vicini a 2.9. Il pH mostra un andamento differente, nelle colture con terreno YM si mantiene pressoché stabile nell'intorno di 6 durante la fase esponenziale per poi scendere ad un valore minimo inferiore a 5 e poi risalire ad un valore maggiore di 6. Invece, nella coltura con sciroppo di BSG scende a partire da 5.72 fino a 4.53 durante la fase esponenziale per poi crescere fino a stabilizzarsi ad un valore intorno a 5. Per quanto riguarda i carotenoidi, la resa specifica ottenuta con il metodo 3 a partire da biomassa prodotta con terreno YM a 48 ore sottoposta a 1FT risulta essere di 490±39 µg/g mentre la resa specifica nel caso della biomassa prodotta con sciroppo di BSG con le stesse modalità risulta essere di 542±34 µg/g, ottenendo quindi valori confrontabili.

3.5.2 Fermentazione in beuta con sciroppo di BSG in modalità fed-batch

Le fermentazioni condotte in beuta in modalità *fed-batch* sono state progettate con lo scopo di individuare la strategia di alimentazione più promettente per l'ottimizzazione del processo. A tal fine, la produzione di biomassa e la resa in carotenoidi sono state considerate come i parametri chiave per la valutazione delle prestazioni generali. Per garantire la piena comparabilità dei dati tra i differenti set sperimentali, l'estrazione dei carotenoidi è stata eseguita su tutti i campioni mediante la procedura definita come metodo 3.

3.5.2.1 Fermentazione in beuta con sciroppo di BSG a fed-batch singolo effettuato a 24 ore (FB24)

La curva dall'OD_{600} (figura 3.15) mostra come dopo la sostituzione del 50% del brodo di coltura con terreno di coltura fresco a 24 ore, la fase di latenza è praticamente annullata. La coltura raggiunge la fase stazionaria in circa 7 ore. Il valore dell'OD_{490} fino alle 24 ore ha un andamento comparabile. Invece, successivamente continua ad aumentare con un rateo maggiore rispetto all'OD_{600}. L'andamento della concentrazione di glucosio mostra come durante la fase esponenziale di crescita esso venga consumato totalmente. Infatti, la concentrazione di glucosio viene ridotta da 1.81±0.10 g/L ad un valore nullo nelle prime 7 ore dal *fed-batch*. Il pH segue un andamento discendente durante le prime ore per poi salire fino ad un valore massimo di 5.53.

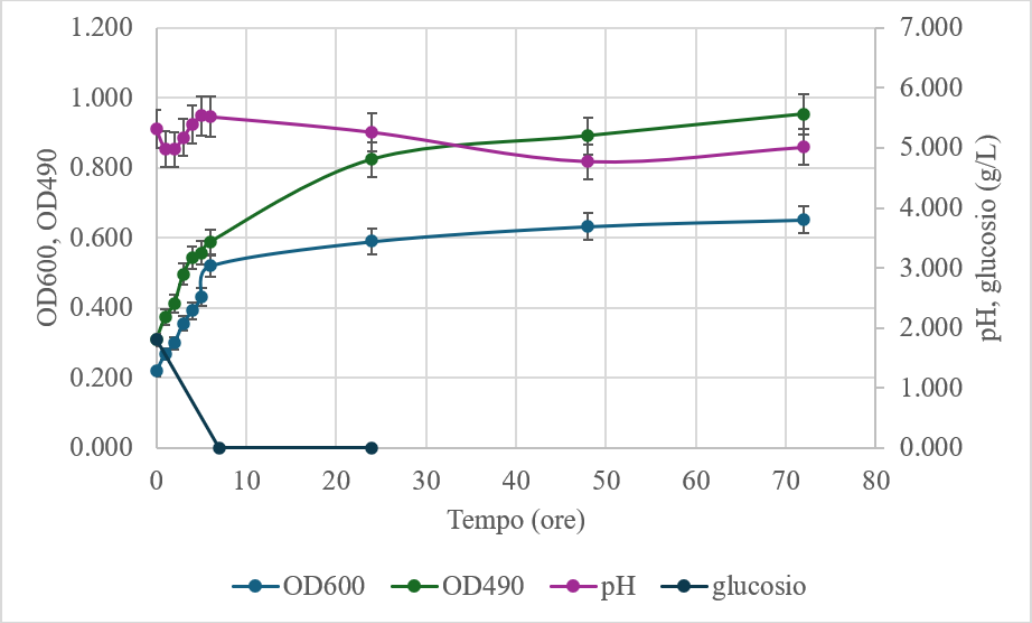


Figura 3.15 Andamento dell'OD_{600}, OD_{490}, concentrazione di glucosio e pH (coltura FB24).

Tempo dal *fed-batch* (ore)	OD_{600}	OD_{490}	pH	Biomassa g/L
-	3.219*	2.431*	5.05±0.03	3.56±0.05
t_0	0.219	0.309	5.32±0.02	1.78±0.03
24	0.590	0.824	5.26±0.03	4.31±0.04
48	0.633	0.891	4.77±0.04	4.93±0.03
72	0.652	0.953	5.01±0.05	4.90±0.09

Tabella 3.11 OD_{600}, OD_{490}, pH, biomassa a partire dall'effettuazione del fed-batch (coltura FB24).

(dato misurato senza diluizione 1:40)*

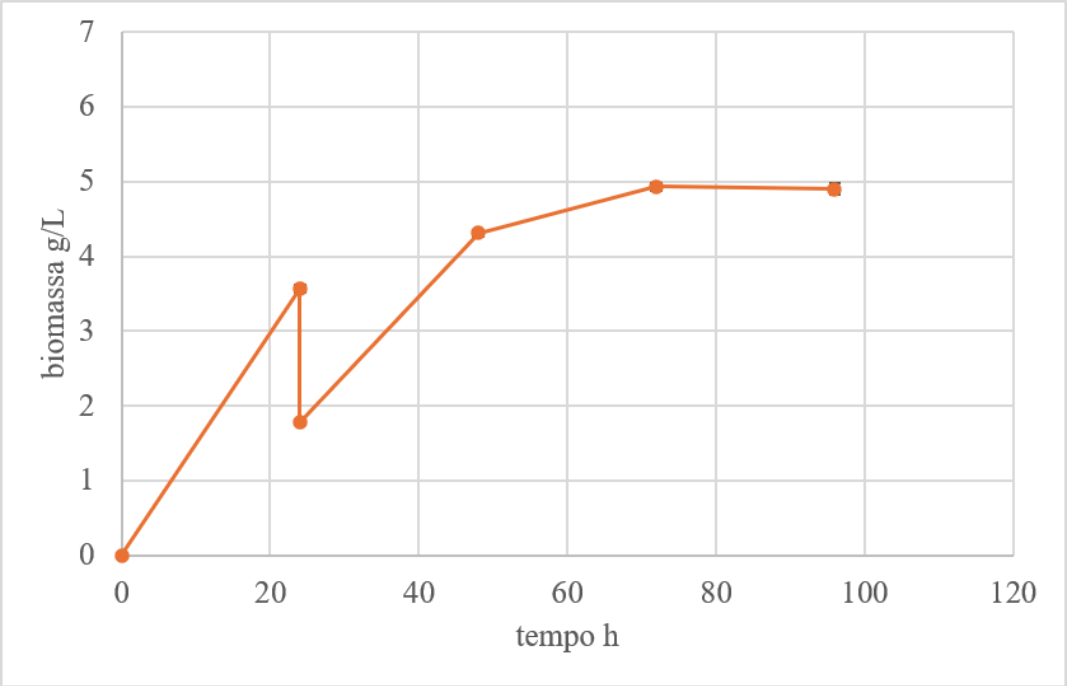


Figura 3.16 Variazione della biomassa durante la coltura fed-batch FB24.

Il grafico in figura 3.16 mostra l'andamento della biomassa durante la fermentazione *fed-batch* (dati mostrati anche nella tabella 3.11). Il grafico permette di apprezzare la crescita della biomassa a seguito del *fed-batch* effettuato 24 ore dopo l'inizio della coltura. La biomassa raggiunge un massimo di 4.93 g/L a 48 ore dal *fed-batch* per poi stabilizzarsi. È utile osservare come vari la velocità di crescita tra le prime 24 ore di coltura e le 24 ore successive al *fed-batch*: nelle prime 24 ore la velocità di crescita si attesta a 0.15 g/L/h mentre nelle 24 ore successive al *fed-batch* risulta essere di 0.11 g/L/h. è interessante notare come, nonostante il glucosio presente nel terreno di coltura successivamente al *fed-batch* sia circa la metà di quello inizialmente presente nel terreno di coltura all'inoculo, la velocità di crescita di *R. mucilaginosa* non sia ridotta in modo proporzionale. Questo dato indica come il microrganismo sia in grado di crescere ugualmente anche con un'inferiore quantità di glucosio nel terreno di coltura. Questo aspetto mostra anche come il glucosio non sia l'unica fonte di carbonio presente all'interno dello sciroppo di BSG e utilizzabile dal microrganismo.

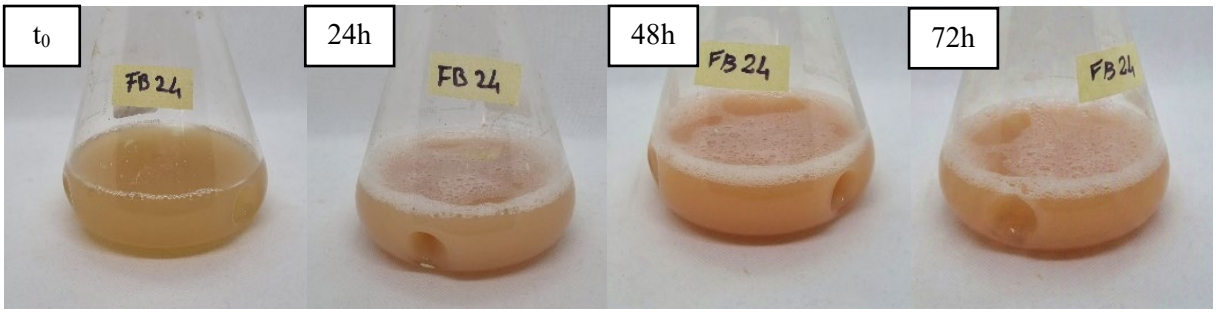


Figura 3.17 Variazione del colore della coltura FB24.

Nella figura 3.17 è mostrata la variazione di colore associata con la crescita del microrganismo dopo il *fed-batch* effettuato a 24 ore dall'inoculo. Si nota come nelle prime 24 ore la coltura assuma una colorazione arancione che si intensifica nelle prime 48 ore dal *fed-batch* per poi stabilizzarsi e rimanere tale fino al termine della fermentazione. Questo aspetto si può anche notare dall'andamento dell'OD_{490} mostrato nella tabella 3.11. Si può notare inoltre, la formazione di schiuma. Infatti, anche se nella coltura sottoposta a *fed-batch* sia stato aggiunto antischiuma SE-15 nella proporzione dello 0.02% in volume, a seguito del *fed-batch*, che ha l'effetto di una diluizione 1:2, la presenza di antischiuma risulta meno efficacie. Visti i risultati ottenuti nella fermentazione effettuata in modalità *batch* in beuta, si è deciso di effettuare l'estrazione dei carotenoidi solamente sul prelievo condotto a 48 ore dal *fed-batch*. Il risultato ottenuto mostra una resa specifica di 581 µg/g con una resa volumetrica calcolata di 2866 µg/L.

3.5.2.2 Fermentazione in beuta con sciroppo di BSG a fed-batch singolo effettuato a 48 ore (FB48)

Il grafico in figura 3.18 mostra l'OD_{600} misurato successivamente al *fed-batch* effettuato a 48 ore. Si nota come la coltura inizi a crescere senza mostrare fase di latenza e raggiungendo la fase stazionaria entro le 24 ore. L'andamento del pH mostra come durante la fase esponenziale esso scenda raggiungendo un minimo e poi risalga fino a stabilizzarsi in valore nell'intorno di 5.1. La concentrazione di glucosio inizialmente pari a 1.76±0.08 g/L viene ridotta a un valore trascurabile già nelle prime 7 ore di fermentazione.

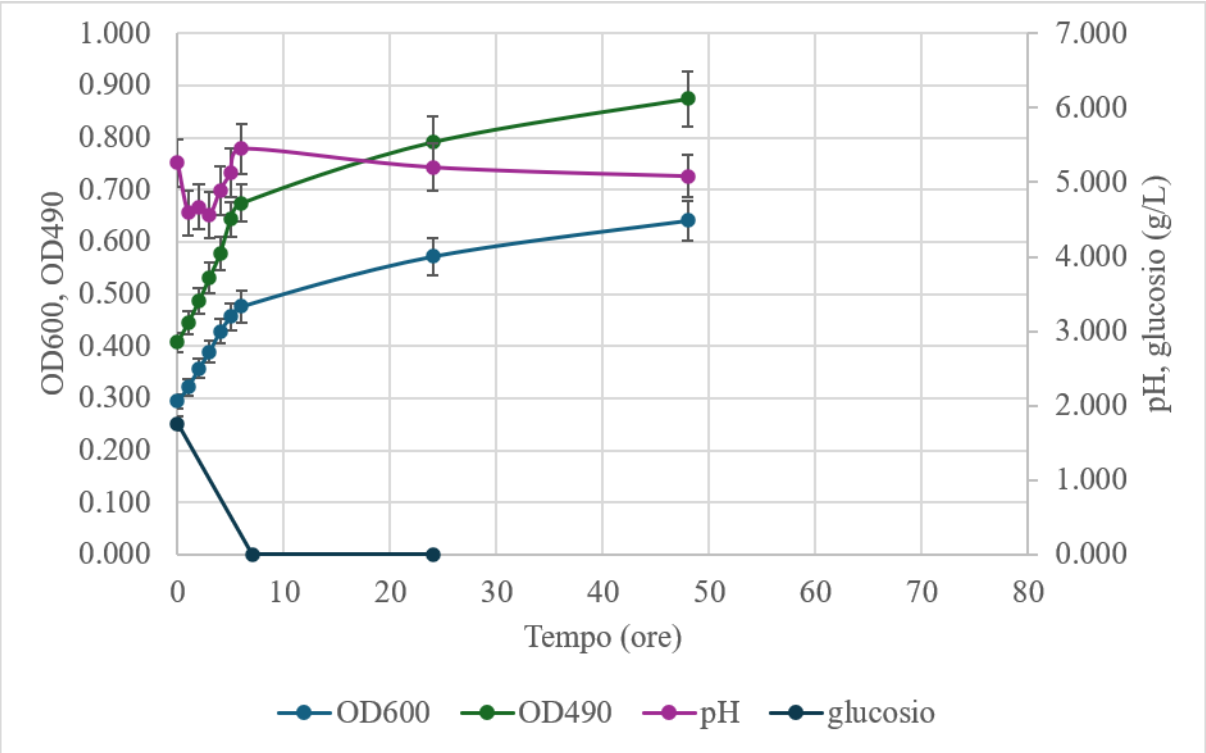


Figura 3.18 Andamento dell'OD_{600}, OD_{490}, concentrazione di glucosio e pH (coltura FB48).

Tempo fed-batch (ore)	**OD_{600}**	**OD_{490}**	**pH**	**biomassa g/L**
-	3.360*	2.907*	4.58±0.27	4.34±0.11
t_0	0.294	0.407	5.26±0.32	2.17±0.06
24	0.572	0.791	5.2±0.30	5.09±0.09
48	0.641	0.874	5.08±0.31	5.21±0.10

Tabella 3.12 OD_{600}, OD_{490}, pH, biomassa a partire dal fed-batch (coltura FB48).

(dato misurato senza diluizione 1:40)*

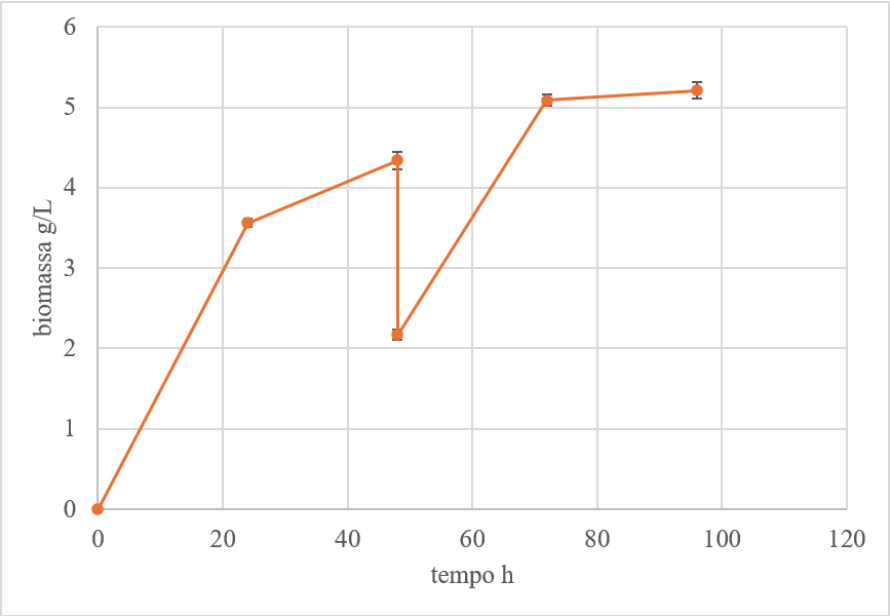


Figura 3.19 Variazione della biomassa durante la coltura fed-batch FB48.

Il grafico mostrato in figura 3.19 riassume i dati riguardanti l'andamento della biomassa, mostrati nella tabella 3.12 durante la prova FB48. Osservando l'evoluzione del valore di biomassa si nota come successivamente al *fed-batch* essa torni a crescere fino a raggiugere valori superiori rispetto alla biomassa presente precedentemente al *fed-batch*. Questo mostra come la quantità di biomassa prodotta dalla modalità *fed-batch* porti ad un vantaggio nella produzione. Infatti, la coltura batch dopo 48 ore produce 4.34 g/L di biomassa, mentre la coltura FB48 ne produce 5.21 g/L. È stata inoltre valutata la velocità di crescita del microrganismo a seguito del *fed-batch* effettuato a 48 ore. Nelle prime 24 ore dal *fed-batch* rileviamo una velocità di crescita di 0.12 g/L/h contro i 0.15 g/L/h rilevati nelle prime 24 ore dall'inoculo. In questo caso, essendo stato effettuato il *fed-batch* dopo 48 ore si possono anche confrontare le velocità di crescita calcolate a 48 ore dal *fed-batch* e a 48 ore dall'inoculo. La velocità di crescita nelle 48 ore successive al *fed-batch* risulta essere in questo caso di 0.06 g/L/h mentre nelle prime 48 ore risultava essere di 0.09 g/L/h. Anche in questo caso, si nota quindi come il terreno di coltura dopo il *fed-batch* in termini di concentrazione di glucosio non abbia le stesse caratteristiche del terreno di coltura iniziale.

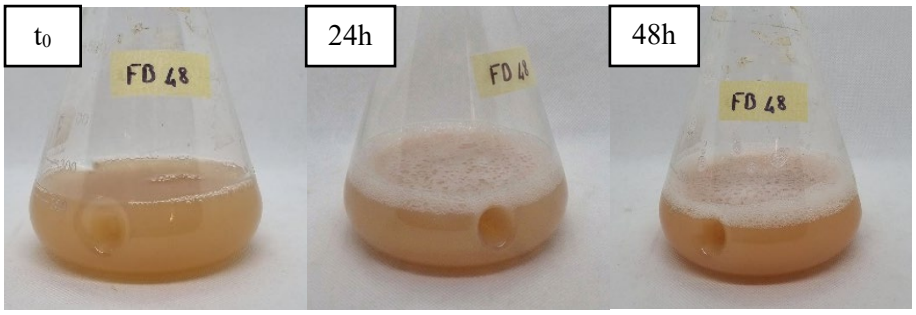


Figura 3.20 Variazione del colore nella coltura FB48.

La figura 3.20 mostra la variazione di colore della coltura a partire dal *fed-batch* effettuato a 48 ore. Si nota come la variazione di colore sia apprezzabile durante tutta la fermentazione.

Anche in questo caso l'estrazione dei carotenoidi è stata effettuata sul campione estratto a 48 ore dal *fed-batch*. I risultati ottenuti sono di 601 µg/g con una resa volumetrica di 3132 µg/L.

Confrontando le ultime due prove descritte si nota come la coltura FB48 abbia ottenuto un valore finale di biomassa pari a 5.21 g/L maggiore dei 4.90 g/L ottenuti con la coltura FB24. Dal punto di vista delle misurazioni spettrofotometriche, si nota come in entrambi i casi la fase esponenziale di crescita sia durata 7 ore. Inoltre, la produzione di carotenoidi risulta essere maggiore ottenendo un valore medio di resa specifica di 601 µg/g contro i 581 µg/g estratti dalla biomassa prodotta nella coltura FB24. Allo stesso modo anche la resa volumetrica ottenuta nella coltura FB48 (3132 µg/L) risulta maggiore della coltura FB24 (2866 µg/L). Questi risultati potrebbero indicare che per massimizzare sia la produzione di biomassa che di carotenoidi il momento migliore per effettuare il *fed-batch* sia a 48 ore dall'inoculo.

3.5.2.3 Fermentazione in beuta con sciroppo di BSG a doppio fed-batch: FB24-24

Il grafico in figura 3.21 mostra l'andamento dell'OD_{600} a seguito del primo e del secondo *fed-batch*. Si può notare come la curva durante la fase esponenziale di crescita, successivamente al secondo *fed-batch*, abbia una pendenza inferiore rispetto curva successiva al primo. Nonostante questo, raggiunge un valore di OD_{600} confrontabile con quello raggiunto dopo il primo *fed-batch.* Il pH da un valore iniziale al primo *fed-batch* 5.05 e 5.10 al secondo, a seguito di entrambe addizioni di terreno di coltura fresco, inizialmente decresce per poi risalire durante l'ultima parte della fase esponenziale e stabilizzarsi ad un valore nell'intorno di 5.2. Il consumo del glucosio ha un andamento analogo a seguito di entrambi i *fed-batch* dove viene portato ad un valore nullo nelle prime 7 ore.

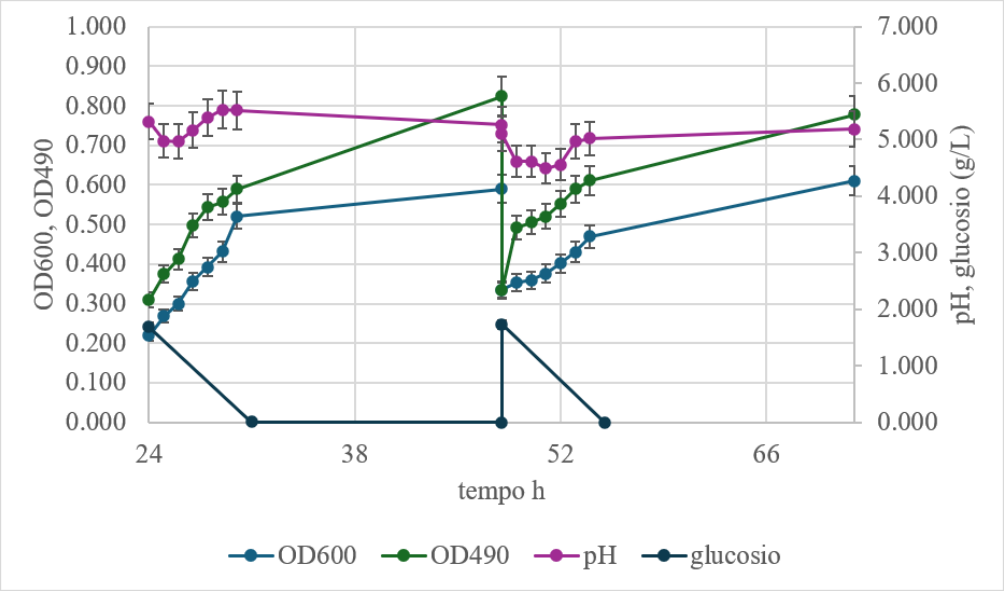


Figura 3.21 Andamento dell'OD_{600}, OD_{490}, pH e concentrazione di glucosio (FB24-24).

	Tempo dal fed-batch (ore)	OD_{600}	OD_{490}	pH	Biomassa (g/L)
	-	3.219*	2.431*	5.05±0.03	3.56±0.05
1° Fed-batch	t_0	0.219	0.309	5.32±0.31	1.78±0.03
	24	0.590	0.824	5.26±0.32	4.31±0.04
2° Fed-batch	t_0	0.335	0.333	5.10±0.30	2.16±0.03
	24	0.610	0.778	5.19±0.31	5.09±0.09

Tabella 3.13 OD_{600}, OD_{490}, pH, biomassa (FB24-24).

(dato misurato senza diluizione 1:40)*

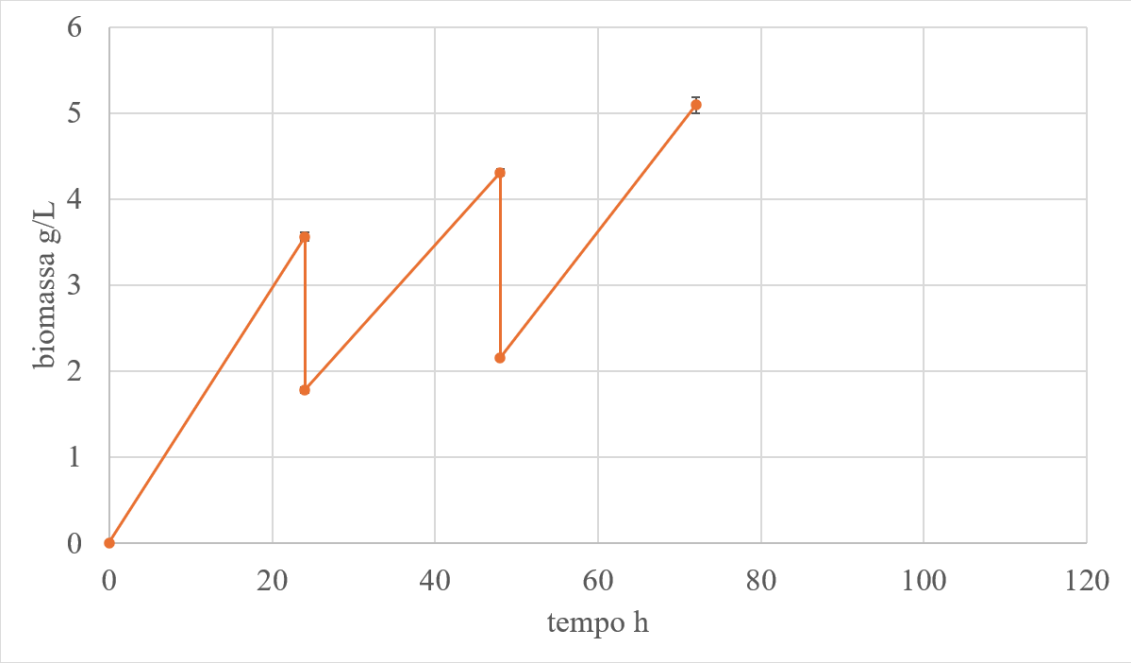


Figura 3.22 Variazione della biomassa durante la coltura fed-batch FB24-24.

Nella Figura 3.22 e nella Tabella 3.13 è illustrato l'andamento della biomassa secca (g/L) durante la conduzione della coltura FB24-24. Dai dati si osserva come, in seguito a ciascuna aggiunta di terreno di coltura, la concentrazione cellulare aumenti progressivamente, raggiungendo livelli di peso secco nettamente superiori rispetto ai valori misurati prima di ogni *fed-batch*. A 24 ore dall'inoculo, immediatamente prima della somministrazione del primo alimento, la concentrazione di biomassa secca si attestava su 3.56 g/L. A seguito del primo fed-

batch, la biomassa è incrementata nell'arco delle 24 ore successive fino a 4.31 g/L, registrando un aumento del 21% rispetto al valore rilevato al termine del primo intervallo di fermentazione. Infine, a seguito del secondo alimento, la concentrazione cellulare ha raggiunto nelle 24 ore consecutive un valore finale di 5.09 g/L, confermando il progressivo e costante accumulo di biomassa ad ogni integrazione nutrizionale.

La velocità di crescita della biomassa è risultata pari a 0.15 g/L/h nelle prime 24 ore dall'inoculo, per poi attestarsi su 0.11 g/L/h nelle 24 ore successive al primo *fed-batch* e su 0.12 g/L/h a seguito del secondo. Si osserva pertanto una contrazione della velocità di accumulo rispetto alla fase iniziale della coltura, pari al 27% dopo il primo fed e al 20% dopo il secondo. Ciononostante, i valori registrati nelle due fasi di alimentazione risultano del tutto paragonabili, dimostrando una risposta fisiologica coerente e riproducibile della coltura a ciascun alimento somministrato.

L'estrazione dei carotenoidi in questo caso è stata condotta a 24 ore dal secondo *fed-batch*. Condurre l'estrazione su tale biomassa rappresenta una estrazione effettuata a 48 ore dal primo *fed-batch* come nei casi precedenti. Il risultato ottenuto è una resa specifica di 591±51 μg/g e una resa volumetrica di 3002±312 μg/L.

3.5.2.4 Fermentazione in beuta con sciroppo di BSG FB48-24

Come evidenziato dall'andamento dell'assorbanza ottica (Figura 3.23 e Tabella 3.14), a seguito della seconda aggiunta di terreno in modalità *fed-batch*, i valori di OD_{600} suggeriscono una ripresa della crescita apparentemente più rapida rispetto al primo *fed-batch*. La coltura raggiunge infatti in fase stazionaria un valore di assorbanza (0.632) superiore a quello registrato al termine del primo ciclo (0.572). Tuttavia, l'andamento dell'OD_{600} durante la fase esponenziale non costituisce un indice quantitativo univoco dell'effettivo accumulo di biomassa. L'analisi della concentrazione cellulare espressa in peso secco (Figura 3.24) rivela infatti che a seguito del secondo *fed-batch* la coltura raggiunge una concentrazione finale di biomassa pari a 4.51 g/L, valore inferiore a quello ottenuto al termine del primo ciclo *fed-batch* (5.09 g/L). Tale riduzione nella produzione di biomassa si riflette anche sulle velocità di crescita della biomassa stessa. Rispetto ai 0.15 g/L/h calcolati nelle prime 24 ore dall'inoculo, la velocità di accumulo della biomassa scende a 0.12 g/L/h nelle 24 ore successive al primo *fed-batch*, per poi subire un ulteriore calo fino a 0.08 g/L/h a seguito della seconda alimentazione.

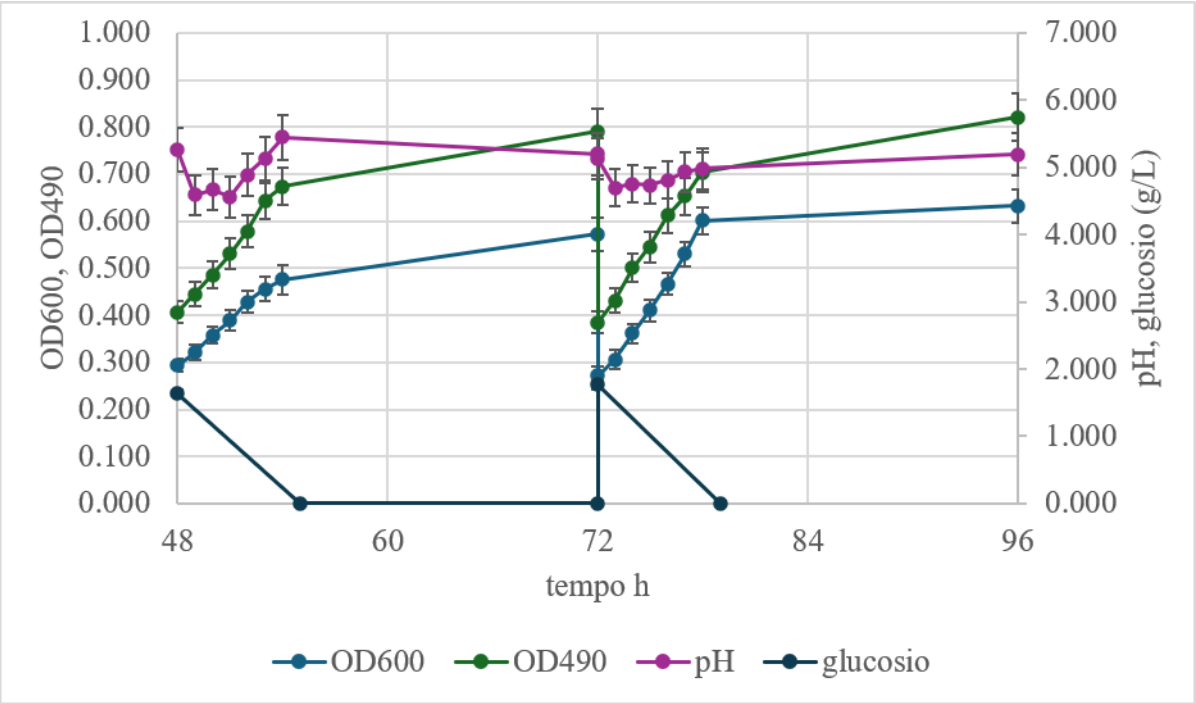


Figura 3.23 Andamento dell'OD_{600}, OD_{490}, pH e concentrazione di glucosio (FB48-24).

	Tempo dal fed-batch (ore)	**OD_{600}**	**OD_{490}**	**pH**	**Biomassa (g/L)**
	-	3.360*	2.907*	4.58±0.27	4.34±0.11
1° Fed-batch	**t_0**	0.294	0.407	5.26±0.32	2.12±0.03
	24	0.572	0.791	5.20±0.31	5.09±0.09
2° Fed-batch	**t_0**	0.272	0.385	5.12±0.30	2.55±0.05
	24	0.632	0.821	5.19±0.31	4.51±0.08

Tabella 3.14 OD_{600}, OD_{490}, pH, biomassa (FB48-24).

(dato misurato senza diluizione 1:40)*

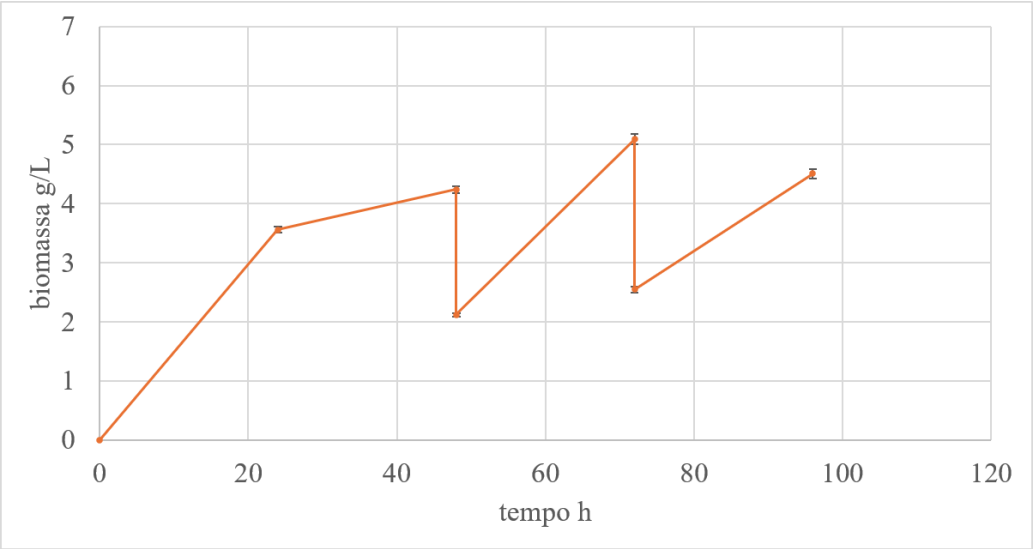


Figura 3.24 Variazione della biomassa durante la coltura fed-batch FB48-24.

L'estrazione dei carotenoidi effettuata a 24 ore dal secondo *fed-batch* mostra una resa specifica di 622 µg/g e una resa volumetrica di 2803 µg/L.

3.5.3 Confronto tra le prove in beuta

Lo scopo di confrontare le prove in beuta effettuate è innanzitutto mostrare come la coltura *fed-batch* possa essere vantaggiosa in questo tipo di fermentazione. Come secondo scopo, determinare quale modalità di fermentazione abbia una capacità maggiore di produzione di carotenoidi. Per individuare quale tra le colture *batch*, FB24, FB48, FB24-24 e FB48-24 descritte nel paragrafo 3.3.3 abbia una produzione maggiore di biomassa.

Nella Tabella 3.15 sono riportati i valori di concentrazione di biomassa secca ottenuti al termine dei processi fermentativi. Per la maggior parte delle configurazioni, la resa finale si riferisce al campionamento effettuato a 72 ore dall'inoculo. Fanno eccezione le colture FB48 e FB48-24, il cui profilo di processo è stato prolungato fino a 96 ore. In questo modo è stato possibile monitorare, nel caso della coltura FB48 le 48 ore successive al *fed-batch*, e nel caso della coltura FB48-24, le 24 ore successive al secondo *fed-batch*. Osservando i dati ci si rende conto come la coltura FB48 abbia raggiunto il quantitativo maggiore di biomassa 5.21 g/L al termine della fermentazione. La coltura FB24 arriva a 4.93 g/L, una quantità confrontabile con la coltura batch 4.82 g/L. La coltura FB24-24 produce 5.09 g/L una quantità di biomassa seconda solo alla coltura FB48. Mentre la coltura FB48-24, nonostante la durata complessiva maggiore mostra una produzione di biomassa di 4.52 g/L, inferiore a tutte le altre prove. Alla luce di questo risultato sembrerebbe che la coltura FB48, da un punto di vista della produzione di biomassa sia la più vantaggiosa. Un'altra variabile interessante risulta essere la velocità di produzione di biomassa misurata il g/L/h, questo parametro, esposto nella tabella 3.15, conferma quanto detto alla luce dei valori della biomassa, sottolineando inoltre la prestazione inferiore della coltura FB48-24 rispetto alle altre. Quest'ultimo ragionamento vale solamente nel caso in cui la biomassa estratta per effettuare i *fed-batch* non fosse utilizzata per l'estrazione

dei carotenoidi. In tal caso la biomassa utile sarebbe solo quella presente nel bioreattore al termine della fermentazione.

Coltura	Biomassa (g/L)	Velocità di produzione media di biomassa (g/L/h)
batch	4.82±0.12	(6.69±0.16) $\times 10^{-2}$
FB24	4.93±0.05	(6.85±0.07) $\times 10^{-2}$
FB48	5.21±0.10	(7.24±0.14) $\times 10^{-2}$
FB24-24	5.09±0.09	(7.07±0.13) $\times 10^{-2}$
FB48-24	4.52±0.08	(4.71±0.08) $\times 10^{-2}$

Tabella 3.15 Biomassa rimanente al termine delle fermentazioni e velocità di produzione di biomassa.

Quindi, ragionando sulla modalità di conduzione di una coltura *fed-batch* si nota come in realtà ogni volta che viene effettuato un *fed-batch* viene prelevata una quantità di coltura pari al volume di terreno di coltura che deve essere inserito. Questo volume rimosso non viene eliminato ma risulta anche esso essere biomassa utile alla produzione. Siccome i valori di biomassa prodotti sono normalizzati sul litro di coltura per calcolare il dato in questione è necessario effettuare delle ipotesi. Per semplicità, si ipotizza di lavorare con un volume di coltura di 2 L, volume compatibile con il reattore utilizzato negli esperimenti di questa tesi. In questa maniera ogni volta che viene effettuato *fed-batch* si deve rimuovere 1 L di coltura ed inserire altrettanto terreno di coltura. È importante sottolineare come l'ipotesi di un volume di coltura di 2 L non influenzi il significato dei dati ottenuti. Per esempio, se si fosse ipotizzato un volume di 200 mL, i calcoli effettuati darebbero come risultato valori di un ordine di grandezza inferiore ma con rapporti costanti, portando alle stesse conclusioni.

Coltura	biomassa totale (g)	Velocità di produzione di biomassa (g/h)
batch	9.64±0.24	1.34±0.03 $\times 10^{-1}$
FB24	13.42±0.15	1.86±0.02 $\times 10^{-1}$
FB48	14.76±0.31	1.40±0.02 $\times 10^{-1}$
FB24-24	18.05±0.27	2.51±0.04 $\times 10^{-1}$
FB48-24	18.47±0.36	1.92±0.04 $\times 10^{-1}$

Tabella 3.16 Biomassa totale prodotta con un volume di fermentazione paria 2 L.

Dai dati mostrati in tabella 3.16 si nota come da un punto di vista della produzione di biomassa il *fed-batch* effettuato 2 volte in entrambi i casi (FB24-24 e FB48-24), in valore assoluto, producano una quantità di biomassa maggiore, rispettivamente 18.05 g per FB24-24 e 18.47 g per FB48-24. Questa analisi, tuttavia, non tiene conto di una variabile; il volume totale di terreno di coltura utilizzato. Infatti, per ottenere la biomassa prodotta dalle fermentazioni a *fed-batch* singolo bisogna utilizzare il 50% in più di terreno di coltura rispetto alla fermentazione *batch*, mentre per le colture a *fed-batch* doppio se ne consuma il 100% in più. Per tenere in conto anche questo aspetto può essere utile calcolare la resa in biomassa per unità di volume di terreno di coltura utilizzato. Allo scopo di calcolare questo dato si è utilizzata l'ipotesi precedente di un volume di coltura di 2 L. In questo modo, la coltura batch utilizza 2 L di terreno di coltura, le colture FB24 e FB48 ne utilizzano 3 L e le colture a doppio *fed-batch*, FB24-24 e FB48-24, 4 L.

Coltura	resa per unità di volume di terreno di coltura (g/L)
batch	4.82±0.12
FB24	4.47±0.05
FB48	4.92±0.10
FB24-24	4.51±0.07
FB48-24	4.62±0.09

Tabella 3.17 Calcolo biomassa totale prodotta per unità di volume di terreno di coltura.

Dai dati riportati nella tabella 3.17 emerge che le configurazioni a doppio *fed-batch* presentano valori di resa per unità di terreno di coltura leggermente inferiori rispetto al processo *batch* condotto a 72 ore (4.82±0.12 g/L). Nello specifico, la prova FB24-24 registra 4.51±0.07 g/L (p= 0.0012), mentre la FB48-24 si attesta su 4.62±0.09 g/L (p=0.0020). Sebbene tali scostamenti risultino statisticamente significativi, la contrazione della resa specifica per litro di terreno somministrato è contenuta (pari a circa il 4-6%).

Per quanto riguarda i processi a singolo stadio, la condizione FB24 ha mostrato una prestazione inferiore sia rispetto al *batch* sia alla configurazione FB48, con un valore pari a 4.47±0.05 g/L. Al contrario, la prova FB48 ha consentito di raggiungere una resa di 4.92±0.10 g/L, valore del tutto sovrapponibile a quello della fermentazione batch (p=0.17), a conferma dell'assenza di variazioni statisticamente significative tra le due condizioni.

Il secondo parametro importante in questa analisi è la produzione di carotenoidi. Come già menzionato nel paragrafo 3.3.2 l'estrazione dei carotenoidi, ad eccezione della coltura *batch* per cui è stata effettuata per tutti e tre i campionamenti, nel caso delle colture FB24 e FB48, è stata effettuata a 48 ore dal primo *fed-batch*. Allo stesso modo i campionamenti delle colture a doppio *fed-batch* sono stati estratti dopo 24 ore dal secondo *fed-batch*, vale a dire a 48 ore dal primo. Il metodo di estrazione utilizzato è il metodo 3 con pretrattamento 1FT. Per avere un

quadro completo sulle colture effettuate per la produzione di carotenoidi, è necessario considerare più dati. Il primo valore è la resa specifica che indica la massa di carotenoidi estratti per unità di biomassa sottoposta ad estrazione. Come mostrato dai dati nella tabella 3.18, da un punto di vista della resa specifica notiamo come pressoché tutti i valori ad eccezione dell'estrazione sul campione batch a 24 ore risultino sovrapponibili. Tale risultato suggerisce che la coltura di *R. mucilaginosa* raggiunga la massima resa specifica in carotenoidi dopo 48 ore, calcolate dall'inoculo per le prove *batch* e dall'introduzione del terreno di coltura per le configurazioni *fed-batch*, a prescindere dalla modalità di conduzione adottata. Il risultato dell'estrazione espresso in termini di resa specifica, tuttavia, potrebbe essere influenzato da altri fattori. L'efficienza del processo di estrazione è influenzata dal grado di rottura cellulare ottenuto con 1FT, questo potrebbe variare in base all'età del campione estratto. Cioè, la composizione della biomassa di un campione estratto a 24 ore rispetto ad uno campionato a 48 o 72 ore è differente. Più si va avanti più sono presenti cellule morte che potrebbero influenzare la resa specifica. Infatti, queste cellule potrebbero essere lisate. La lisi comporta il rilascio dei composti presenti all'interno delle cellule, tra cui i carotenoidi, nel terreno di coltura, che nella fase di estrazione viene eliminato per centrifugazione. Quindi, in questo caso i carotenoidi rilasciati nel medium non sarebbero recuperati. D'altra parte, la resa volumetrica esprime la capacità produttiva globale del sistema. Poiché quantifica la massa effettiva di carotenoidi ottenibile per unità di volume di coltura (µg/L), essa integra sia la resa specifica (contenuto cellulare di carotenoidi, µg/g) sia la concentrazione di biomassa totale prodotta (g/L). I dati mostrati nella tabella 3.18 mostrano in valore assoluto una differenza maggiore rispetto alla resa specifica. Tale differenza risulta maggiormente apprezzabile dal confronto tra le figure 3.25 e 3.26. Nello specifico, la Figura 3.26 evidenzia per la coltura FB48 il valore di resa volumetrica più elevato, in accordo con la maggiore concentrazione di biomassa ottenuta (5.21 g/L). Tuttavia, prendendo in considerazione le deviazioni standard, le rese volumetriche delle diverse condizioni risultano statisticamente sovrapponibili, analogamente a quanto osservato per la resa specifica.

Coltura	Resa specifica (µg/g)	Resa volumetrica (µg/L)
Batch 24h	393±27	1399±131
Batch 48h	542±34	2299±203
Batch 72h	574±41	2541±250
FB24	581±49	2866±259
FB48	601±52	3132±331
FB24-24	591±51	3002±312
FB48-24	622±55	2803±298

Tabella 3.18 Resa specifica e resa volumetrica in carotenoidi nelle colture in beuta ottenute dal campionamento al termine delle colture.

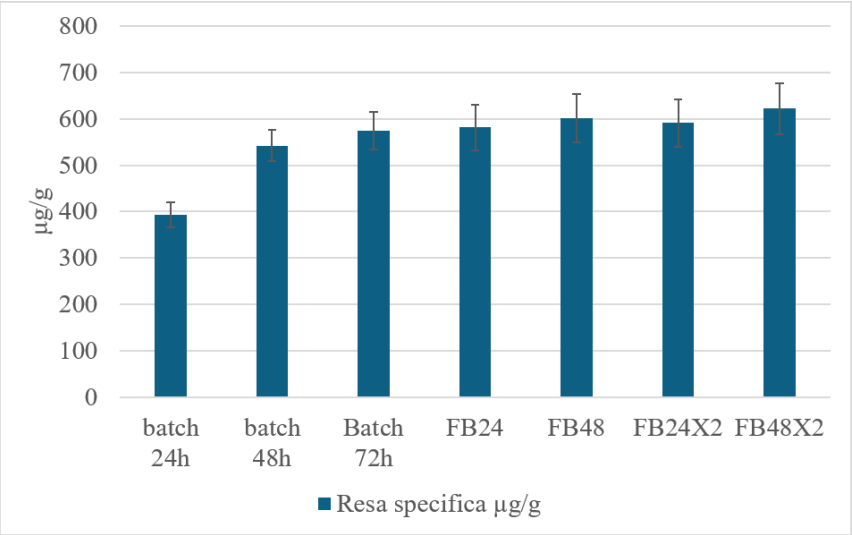


Figura 3.25 Resa specifica in carotenoidi nelle colture in beuta.

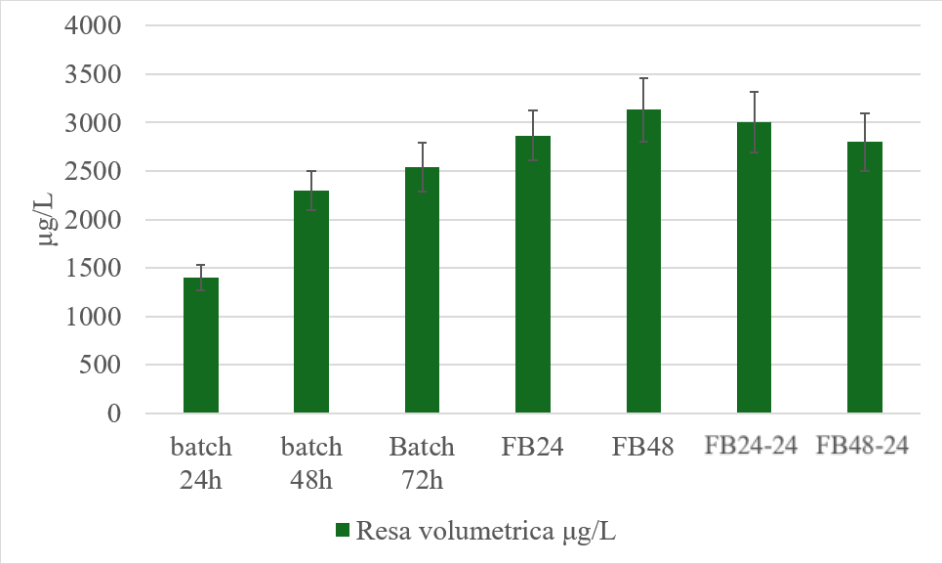


Figura 3.26 Resa volumetrica in carotenoidi nelle colture in beuta.

Per determinare quale modalità di coltura sia più vantaggiosa, si può adoperare lo stesso ragionamento utilizzato per la biomassa. Vale a dire calcolare la totalità dei carotenoidi prodotti, con l'ipotesi di un volume di coltura di 2 L, durante tutto il processo di produzione. Quindi considerando anche l'estrazione della quantità di biomassa rimossa per effettuare il *fed-batch* nelle colture *fed-batch*. Questo dato è calcolato utilizzando le rese volumetriche. Per effettuare questa analisi, è stato necessario anche valutare la resa specifica e la resa volumetrica dei campioni estratti per condurre il secondo *fed-batch*. I risultati ottenuti sono stati 413 µg/g di resa specifica e 1780 µg/L di resa volumetrica nel caso della biomassa precedente al secondo

fed-batch per la coltura FB24-24. Mentre per la coltura FB48-24, sono stati ottenuti dei valori di 489 µg/g e 2489 µg/L.

Coltura	Resa volumetrica prima del primo *fed-batch* (µg/L)	Resa volumetrica prima del secondo *fed-batch* (µg/L)	Resa volumetrica fine coltura (µg/L)	Resa totale (µg)
batch 24h	-	-	1399±131	2798±263
batch 48h	-	-	2299±203	4598±406
batch 72h	-	-	2541±250	5082±501
FB24	1399±131	-	2866±259	7131±650
FB48	2299±203	-	3132±331	8563±865
FB24-24	1399±131	1780±150	3002±312	9183±906
FB48-24	2299±203	2489±268	2803±298	10394±1066

Tabella 3.19 Calcolo resa totale in carotenoidi con un volume di 2 L.

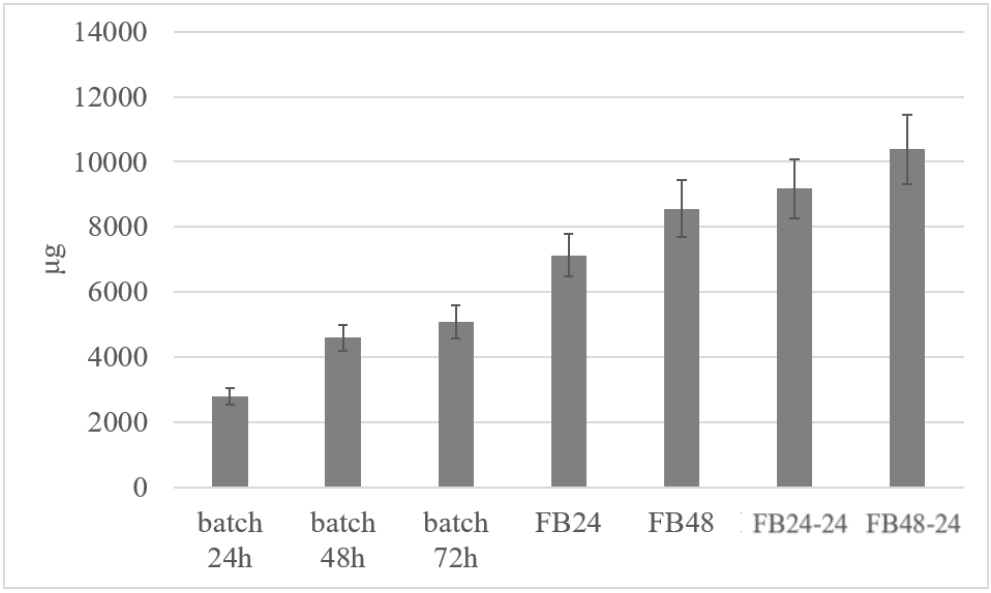


Figura 3.27 Resa totale in carotenoidi con un volume di coltura di 2L.

I dati mostrati in figura 3.27 e nella tabella 3.19 mostrano come se si considera anche la parte di coltura rimossa per effettuare i *fed-batch* nel computo del totale di carotenoidi estratti le colture *fed-batch* risultino sempre più produttive rispetto alla coltura batch. Infatti, l'analisi della significatività statistica effettuata tra la coltura *batch* a 72 ore (5082±501 µg/L) e le colture *fed-batch* mostra come la differenza in termini di produzione totale di carotenoidi sia statisticamente significativa rispetto a tutte le colture *fed-batch:* FB24 (7131±650 µg/L; p=0.012), FB48 (8563±865 µg/L; p=0.004), FB24-24 (9183±906 µg/L; p=0.002) e FB48-24 (10394±1066 µg/L; p=0.001). Inoltre, conducendo un'analisi sulla significatività tra le colture a *fed-batch* singolo e doppio, si nota come la coltura FB24 mostri differenze statisticamente significative con la coltura FB24-24 (p=0.033) e FB48-24 (p=0.011), mentre per la coltura FB48 accade il contrario mostrando una differenza non statisticamente significativa con le due colture FB24-24 (p=0.440) e FB48-24 (p=0.082). Alla luce di queste ultime considerazioni si può affermare che dal punto di vista della produzione totale di carotenoidi, la coltura FB48 sembrerebbe essere la soluzione migliore; infatti, non mostra differenze statisticamente significative con le colture FB24-24 e FB48-24, e invece, a differenza della coltura FB24, mostra una differenza statisticamente significativa con la coltura *batch* a 72 ore. Alla luce di tali evidenze, la conduzione della fermentazione con la modalità FB48 si attesta come la soluzione di processo ottimale: essa garantisce rese complessive del tutto sovrapponibili a quelle delle configurazioni a doppio *fed-batch*, assicurando un incremento produttivo statisticamente distinto dalla coltura *batch* di riferimento. Tale risultato risulta di primario interesse applicativo, poiché consente di massimizzare il recupero di carotenoidi senza introdurre la maggiore complessità gestionale e il superiore rischio di contaminazione caratteristici dei processi a doppio *fed-batch*.

A questo punto si possono introdurre altre due variabili che possono essere utili al fine di determinare quale modalità di coltura; la velocità di produzione dei carotenoidi e la resa per unità di volume di terreno di coltura utilizzato.

Coltura	velocità di produzione di carotenoidi (µg/h)	resa per unità di volume di terreno di coltura (µg/L)
batch 24h	117±11	1399±131
batch 48h	96±8	2299±203
batch 72h	71±7	2541±250
FB24	99±9	2377±217
FB48	89±9	2854±288
FB24-24	128±13	2296±226
FB48-24	108±11	2599±266

Tabella 3.20 Calcolo resa totale in carotenoidi con un volume di 2 L.

I dati riportati in Tabella 3.20 e in Figura 3.28 consentono di valutare e confrontare le diverse strategie fermentative sia in termini di cinetica di accumulo (velocità di produzione, μg/h) sia di efficienza di conversione del terreno (resa per unità di volume di sciroppo di BSG, μg/L).

Per quanto riguarda la velocità di produzione, le colture *fed-batch* mostrano prestazioni cinetiche superiori o paragonabili a quelle delle colture *batch*. Nello specifico, le configurazioni a doppio stadio raggiungono i valori orari più elevati dell'intera campagna sperimentale, con 128±13 µg/h per FB24-24 e 108±11 µg/h per FB48-24. Tali valori risultano nettamente superiori sia alla coltura *batch* a 72 ore (71±7 µg/h) sia alla coltura *batch* a 48 ore (96±8 µg/h), venendo superati unicamente dalla fase esponenziale precoce della coltura batch arrestata a 24 ore (117±11 µg/h). Anche i *fed-batch* a singolo stadio mantengono produttività orarie rilevanti (99±9 µg/h per FB24 e 89±9 µg/h per FB48).

Analizzando invece la resa per unità di volume di terreno di coltura, la configurazione FB48 si attesta sul valore medio più elevato (2854±288 µg/L), mostrando prestazioni del tutto confrontabili o superiori rispetto alla coltura *batch* a 72 ore (2541±250 µg/L), FB48-24 (2599±266 µg/L) e FB24 (2377±217 µg/L). Al contrario, la coltura FB24-24, pur avendo registrato la velocità di accumulo più elevata, presenta la resa per litro di terreno di coltura più contenuta tra i *fed-batch* (2296±226 µg/L), evidenziando come una cinetica rapida non si traduca necessariamente nella massima resa di conversione del substrato somministrato.

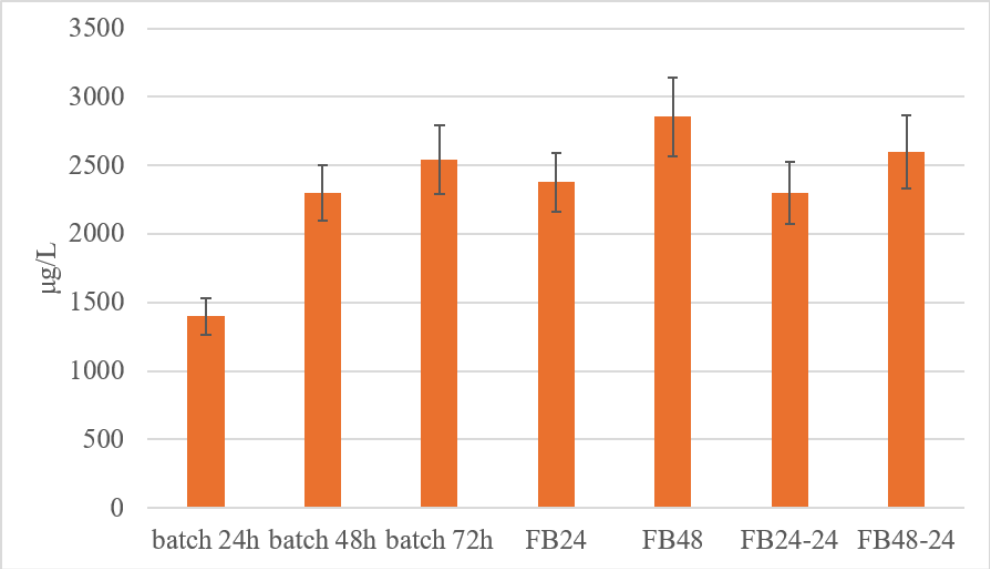


Figura 3.28 Resa in carotenoidi per unità di volume di coltura.

In conclusione, si può affermare, che per quanto riguarda la produzione dei carotenoidi, sembrerebbe che le colture *fed-batch* presentino una valida opzione rispetto alle colture *batch*. Infatti, la produzione totale di carotenoidi risulta aumentare al minimo del 40.3±7.6% con la coltura FB24 ad un massimo del 104.5±21% per la coltura FB48-24. Per quanto riguarda la produzione di carotenoidi per unità di volume di coltura, l'analisi statistica mostra che la coltura FB24 (2377±217 µg/L) rispetto a *batch* 72 ore (2541±250 µg/L) ha una differenza statistica significativa indicata da p=0.00095, nel caso della coltura FB24-24 (2296±226 µg/L) rispetto a *batch* 72 ore (2541±250 µg/L); la differenza statistica è significativa con p=0.00032. Questo espone come anche nel caso dei valori di produzione di carotenoidi per unità di volume di

coltura impiegato con prestazione nel valore medio inferiore rispetto alla coltura *batch* 72 ore i valori ottenuti siano confrontabili. Dunque, si può affermare che con la stessa quantità di terreno di coltura utilizzata, si ottiene la stessa quantità di carotenoidi oppure una quantità superiore, ma al termine della fermentazione la quantità di carotenoidi prodotti risulta superiore avendo in totale utilizzato nelle colture *fed-batch* un volume di terreno di coltura maggiore. Per esempio, la coltura FB48 produrrebbe, con un volume di coltura di 2 L, un totale di 8563 µg di carotenoidi utilizzando 3 L di terreno di coltura, mentre la coltura *batch* ne produrrebbe 5082 µg utilizzandone 2 L. Quindi, in generale se l'obiettivo della fermentazione è produrre la quantità di carotenoidi maggiore le opzioni *fed-batch* sembrerebbero risultare sempre vantaggiose, rimanendo invece comparabili dal punto di vista della velocità e della resa per unità di volume di terreno di coltura. Quest'ultimo aspetto lascia pensare che la quantità di carotenoidi ottenibile da ogni unità di volume di terreno di coltura sia pressoché costante indipendentemente dal tipo di fermentazione con le stesse condizioni di temperatura e agitazione. Infatti, tralasciando la coltura *batch* a 24 ore, tutte le colture hanno mostrato una resa volumetrica per unità di volume di coltura confrontabile con una significatività statistica alta a confermare la validità del dato. Infine, tra le colture *fed-batch* si può notare come l'unica coltura, dal punto di vista della produzione totale di carotenoidi, a mostrare una differenza significativa nei confronti della coltura *batch* 72 ore e una differenza non significativa con le altre colture *fed-batch* risulta essere la coltura FB48. Quest'ultimo aspetto porta ad individuare questa modalità di coltura come la più promettente, considerando anche la sua semplicità gestionale rispetto alle colture a doppio *fed-batch.*

3.6 Fermentazioni in bioreattore in modalità batch

Sono state effettuate due prove di fermentazione in bioreattore utilizzando sciroppo di BSG come terreno di coltura, le cui modalità sono descritte nel paragrafo 2.5. Nella tabella 3.21 sono riportate le condizioni di coltura comuni ad entrambe le prove.

Temperatura	25°C
Ossigeno disciolto	60%
Velocità di agitazione	150 rpm
pH	Monitorato non controllato
Durata	72 ore
Volume di coltura	2 L
Inoculo	Standardizzato da precoltura in beuta con sciroppo di BSG
Aggiunta antischiuma	SE15 0.01%vol dopo 5 ore dall'inoculo

Tabella 3.21 Condizioni di coltura in bioreattore.

Durante la fermentazione sono stati monitorati OD_{600}, OD_{490}, pH, biomassa e concentrazione di glucosio. Inoltre, tutti i campioni di biomassa ottenuti estratti a 24, 48 e 72 ore sono stati sottoposti ad estrazione di carotenoidi con il metodo 3 utilizzando la biomassa sia in condizioni NSP che 1FT per verificare l'effetto del pretrattamento anche su biomassa prodotta in bioreattore su sciroppo di BSG.

3.6.1 Prova 1 in modalità batch in bioreattore

Il grafico riportato nella figura 3.29 mostra attraverso il monitoraggio dell'OD600 che la coltura abbia iniziato la fase esponenziale già ad un'ora dall'inoculo. Questo fa supporre che la fase di latenza non sia stata presente oppure abbia avuto una durata inferiore ad un'ora e quindi non apprezzabile dai dati rilevati e mostrati in grafico. La coltura raggiunge un valore di OD_{600} superiore a 2.5 nelle prime 7 ore di fermentazione per poi stabilizzarsi al di sopra di un valore di 3.5 dopo 24 come mostrato nella tabella 3.22. Il valore dell'OD_{490} ha un andamento simile, portandosi anch'esso ad un valore superiore a 3 nelle prime 24 ore di fermentazione. L'andamento del pH mostra una variazione negativa del valore coincidente con la fase esponenziale di crescita fino ad un valore minimo di 3.94 a 9 ore, risalendo poi ad un massimo a 24 ore di 6.24 e infine stabilizzandosi in un valore di 4.87 a 48 ore, terminando con una misurazione di 4.73 a 72 ore. La concentrazione di glucosio subisce una importante variazione durante la fase esponenziale fino ad arrivare, nelle prime 24 ore, ad un valore pari a zero. Per quanto riguarda l'andamento della biomassa prodotta, mostrato in tabella 3.22 si nota come a 24 ore il valore misurato sia inferiore ai valori rilevati a 48 e 72 ore che invece risultano sovrapponibili.

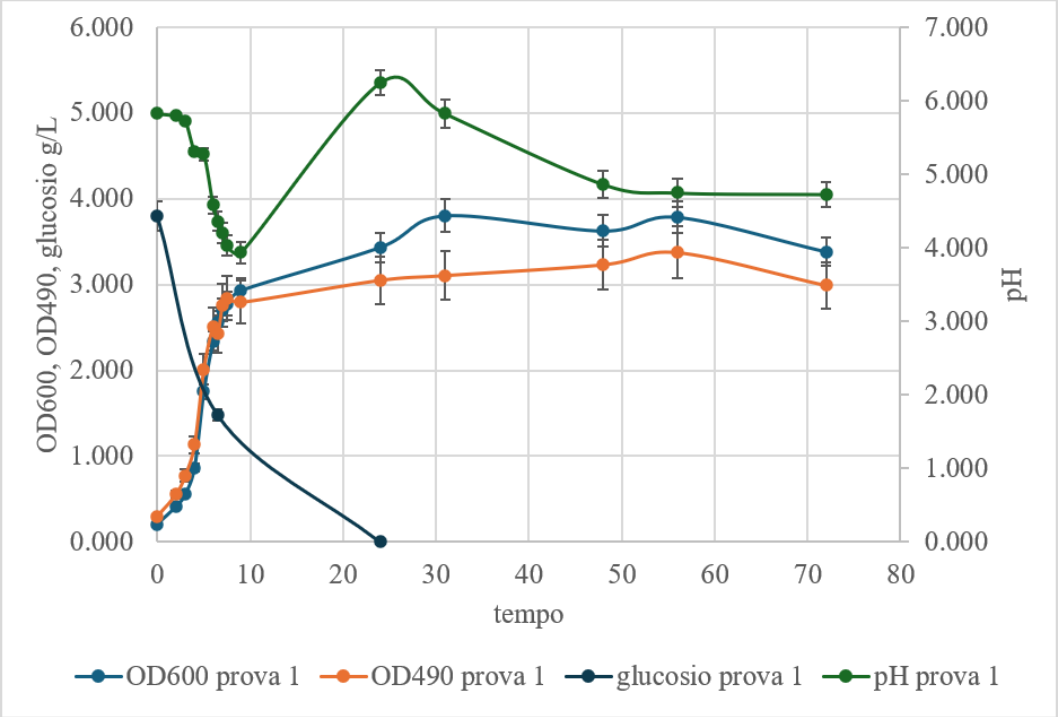


Figura 3.29 Andamento OD_{600}, OD_{490}, pH e glucosio della prova 1 in bioreattore.

Tempo (ore)	OD_{600}	OD_{490}	pH	Biomassa (g/L)	Glucosio(g/L)
0	0.206	0.299	5.83±0.18	-	3.80±0.20
8	2.773	2.840	4.36±0.12	-	1.48±0.12
24	3.436	3.051	6.25±0.19	4.6±0.1	0
48	3.626	3.233	4.87±0.15	7.1±0.2	-
72	3.383	2.990	4.73±0.14	7.5±0.3	-

Tabella 3.22 OD_{600}, OD_{490}, pH, biomassa e concentrazione di glucosio della prova 1 in bioreattore

I dati mostrati in tabella 3.23 espongono i risultati delle estrazioni di carotenoidi effettuate con il metodo 3, sia da biomassa NSP che da biomassa 1FT. Lo scopo di condurre le estrazioni con entrambe le metodologie è stato confermare il comportamento osservato con la biomassa prodotta con terreno YM in beuta con la biomassa prodotta in bioreattore con sciroppo di BSG. I risultati ottenuti confermano l'efficacia del pretrattamento di congelamento e scongelamento (1FT), la cui applicazione consente di incrementare la resa specifica e la resa volumetrica di carotenoidi in media del 59.7±3.3% rispetto alla biomassa non pretrattata (NSP). Dall'analisi cinetica emerge come, per entrambe le condizioni, i valori di resa specifica e volumetrica registrati a 24 ore risultino nettamente inferiori rispetto a quelli osservati alle tempistiche successive. Al contrario, le prestazioni ottenute a 48 e 72 ore si attestano su livelli del tutto equivalenti, dimostrando che l'accumulo dei pigmenti raggiunge un plateau già a 48 ore. In un'ottica di ottimizzazione industriale, tali evidenze indicano che la fermentazione può essere arrestata a 48 ore senza penalizzare il recupero finale di prodotto, garantendo un significativo risparmio di tempo e di energia. In un processo batch, dove la produttività globale è fortemente condizionata dai tempi morti legati alle operazioni di lavaggio, sterilizzazione e preparazione del reattore, la riduzione del tempo di residenza di 24 ore comporta un vantaggio economico e gestionale di primario interesse.

Tempo	resa specifica biomassa NSP (µg/g)	resa specifica biomassa 1FT (µg/g)	resa volumetrica biomassa NSP (µg/L)	resa volumetrica biomassa 1FT (µg/L)
24h	286±23	462±41	1316±134	2125±235
48h	347±35	562±51	2464±318	3990±474
72h	358±32	559±49	2685±347	4193±535

Tabella 3.23 Resa specifica e resa volumetrica di carotenoidi

3.6.2 *Prova 2 in modalità batch in bioreattore*

Nella figura 3.30 sono visibili i dati misurati durante la seconda prova in bioreattore. L'andamento dell'OD_{600} mostra una fase di latenza compresa tra un'ora e due ore. Successivamente la coltura entra nella fase esponenziale portandosi ad un OD_{600} superiore a 2 nelle prime 8 ore di fermentazione e stabilizzandosi ad un valore compreso tra 2.8 e 3.3 tra le 24 e le 72 ore. L'OD_{490} segue l'andamento dell'OD_{600} con un comportamento assimilabile. L'andamento del pH mostra come durante la fase esponenziale si ottenga una diminuzione dal valore iniziale di 5.51 ad un minimo di 4.33 a 9 ore dall'inoculo, successivamente si osserva un picco rilevato a 24 ore di 5.94 per poi tornare a scendere fino ad un valore compreso tra 4.76 rilevato a 48 ore e 5.10 rilevato a 72 ore. La concentrazione di glucosio è stata misurata ad un intervallo di due ore durante la fase esponenziale di crescita per poi effettuare una misurazione a 24 ore dall'inoculo. I dati mostrano come, a partire da una concentrazione iniziale di 3.5 g/L, si verifichi un marcato consumo di glucosio durante le prime ore della fase esponenziale: il valore scende a 1.73 g/L a 2 ore e a 1.20 g/L a 4 ore, per poi attestarsi su 1.09 g/L all'ottava ora. Questo corrisponde a una deplezione del 69% del glucosio iniziale, con una velocità specifica di consumo di glucosio pari a 0.30 g/L/h. Successivamente, la diminuzione del glucosio prosegue con un andamento più graduale in corrispondenza dell'avvicinamento alla fase stazionaria. La misurazione effettuata sul campionamento a 24 ore mostra come il glucosio sia stato esaurito completamente. La biomassa, i cui valori sono mostrati in tabella 3.18, indica una crescita notevole tra le 8 e le 24 ore. In questo caso il valore rilevato a 48 ore e a 72 ore risulta sempre superiore rispetto a 24 ore, mentre la variazione di biomassa tra 48 e 72 ore risulta cospicua mostrando una crescita di 0.5 g/L nell'intervallo considerato.

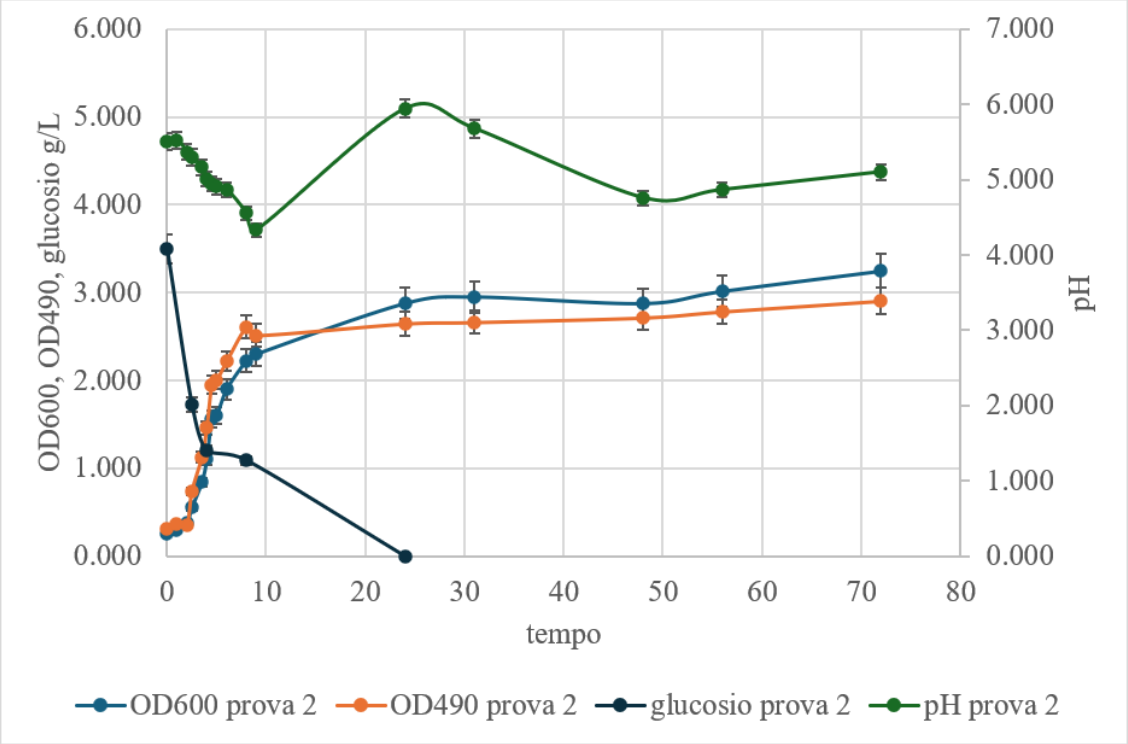


Figura 3.30 Andamento OD_{600}, OD_{490}, pH e glucosio della prova 1 in bioreattore.

Tempo (h)	OD_{600}	OD_{490}	pH	Biomassa [g/L]	Glucosio [g/L]
0	0.255	0.306	5.51±0.09	-	3.5±0.16
2	0.556	0.738	5.30±0.08	-	1.73±0.08
4	1.105	1.495	5.01±0.09	-	1.2±0.06
8	2.227	2.610	4.56±0.06	0.6±0.1	1.09±0.05
24	2.879	2.348	5.94±0.06	3.9±0.1	0
48	2.878	2.133	4.76±0.02	6.9±0.2	-
72	3.246	2.907	5.10±0.07	7.4±0.4	-

Tabella 3.24 OD_{600}, OD_{490}, pH, biomassa e concentrazione di glucosio della prova 1 in bioreattore

I dati riportati nella Tabella 3.25 evidenziano la maggiore efficienza dell'estrazione di carotenoidi condotta su biomassa sottoposta al pretrattamento di congelamento e scongelamento (1FT). In particolare, considerando la media dei tre campionamenti effettuati, l'impiego del pretrattamento 1FT consente di incrementare la resa di estrazione del 63.9±5.3% rispetto alla biomassa non pretrattata (NSP). L'evoluzione della resa specifica e della resa volumetrica in carotenoidi nel corso del processo indicano che i valori ottenuti a 24 ore risultano inferiori rispetto a quelli registrati a 48 e 72 ore. Poiché le prestazioni a 48 e 72 ore offrono risultati del tutto confrontabili per entrambi i parametri, una conduzione della fermentazione limitata a 48 ore risulta la scelta ottimale, garantendo la massima produttività con una riduzione del tempo di processo.

Tempo	resa specifica biomassa NSP (µg/g)	resa specifica biomassa 1FT (µg/g)	resa volumetrica biomassa NSP (µg/L)	resa volumetrica biomassa 1FT (µg/L)
24h	212±29	360±37	828±134	1404±180
48h	359±41	570±47	2478±355	3933±438
72h	343±38	562±52	2503±413	4103±601

Tabella 3.25 Resa specifica e resa volumetrica di carotenoidi

3.6.3 Confronto tra le prove in bioreattore

L'andamento dell'assorbanza a 600 nm (OD_{600}), mostrato in Figura 3.31, evidenzia profili sovrapponibili per entrambe le prove durante le prime 8 ore di fermentazione, per poi mostrare una divergenza nelle ore successive. Tale scostamento è verosimilmente attribuibile ai limiti intrinseci della misura spettrofotometrica: ad alte densità cellulari si esce dall'intervallo di linearità della legge di Lambert-Beer e, contestualmente, la torbidità o la potenziale degradazione della matrice del bianco (sciroppo di BSG) possono introdurre errori nella lettura. Ciononostante, la concordanza nei primi punti di campionamento e la specularità dell'andamento generale confermano la riproducibilità del profilo di crescita. Un comportamento analogo si osserva per l'OD_{490} (Figura 3.32), caratterizzata da dati sovrapponibili nelle prime 8 ore e da valori inferiori nella seconda prova durante la fase stazionaria. Va tuttavia ribadito che la densità ottica fornisce una valutazione prevalentemente qualitativa della cinetica di fermentazione, laddove la quantificazione puntuale della crescita risiede nella determinazione della biomassa secca. In conclusione, l'analisi spettrofotometrica consente di identificare chiaramente il profilo cinetico della coltura: una fase di latenza nelle prime 2 ore dall'inoculo, una fase di crescita esponenziale e il raggiungimento della fase stazionaria entro le 24 ore.

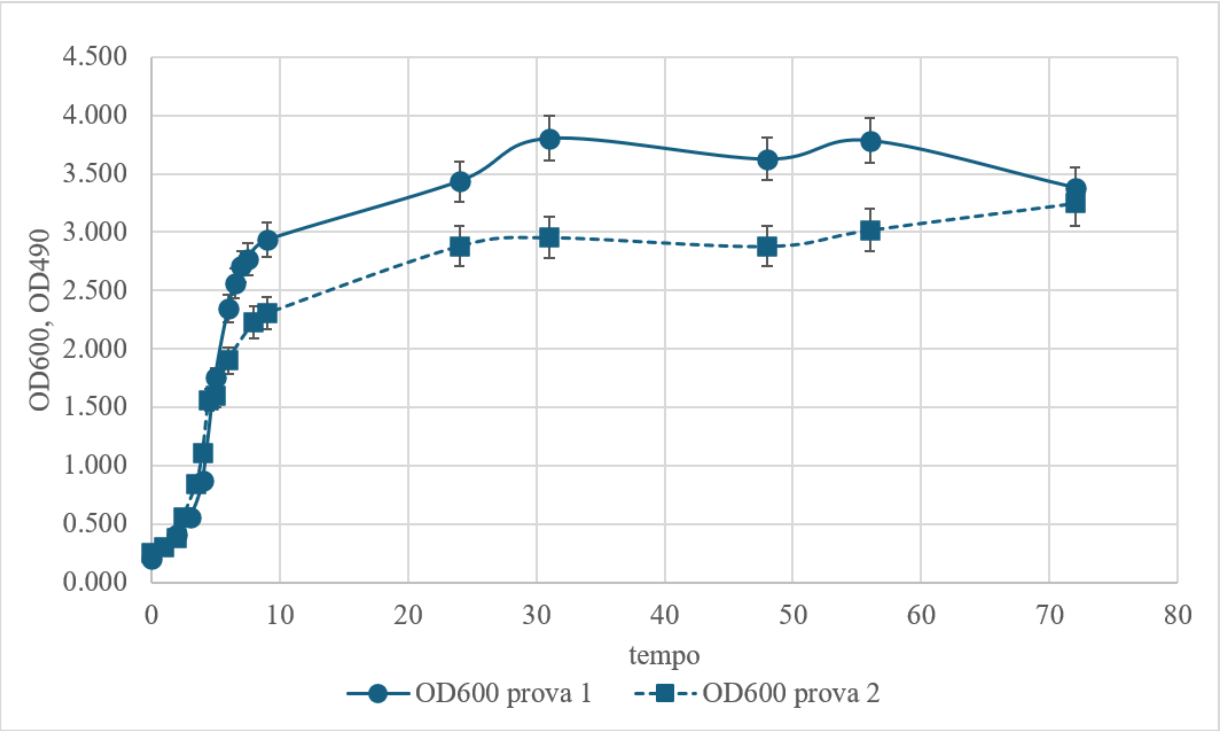


Figura 3.31 Confronto andamento OD_{600} tra prova 1 e prova 2 in bioreattore.

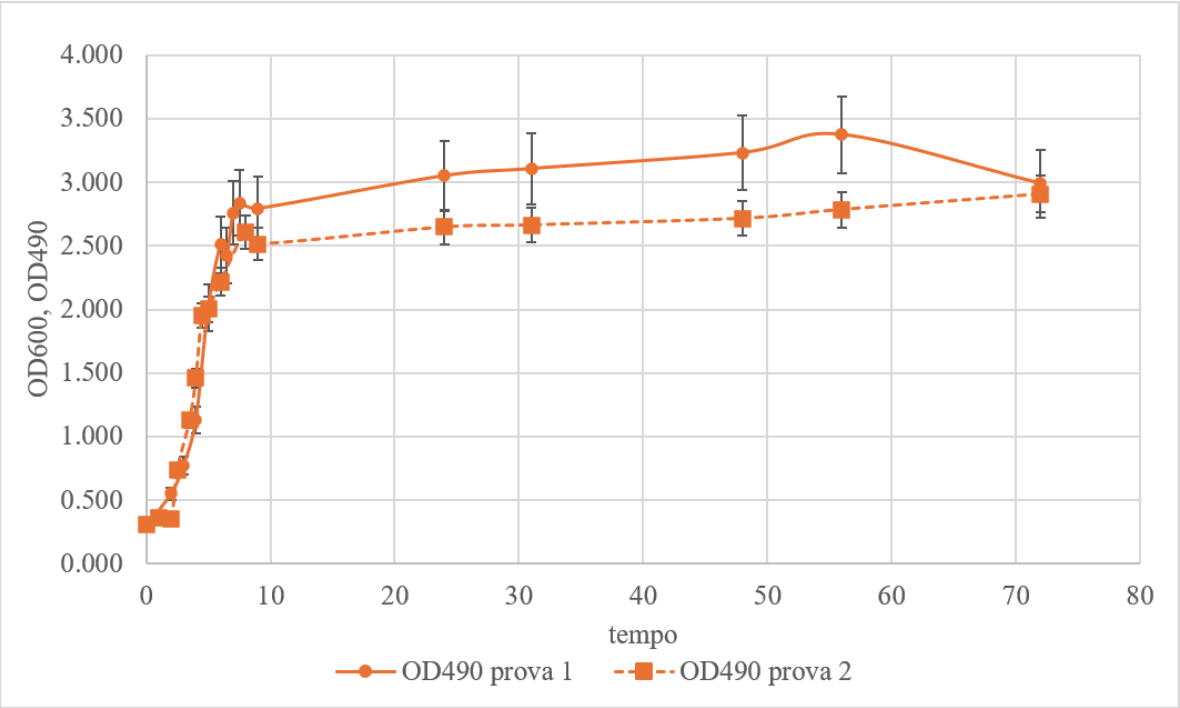


Figura 3.32 Confronto andamento OD_{490} tra prova 1 e prova 2 in bioreattore.

Nella figura 3.33 sono presentati gli andamenti di pH e concentrazione di glucosio. L'andamento de pH risulta essere confrontabile in entrambe le fermentazioni. Si nota facilmente come nella fase esponenziale si abbia una riduzione del pH fino ad un minimo misurato in entrambe le prove a 9 ore. Successivamente, il pH è aumentato fino ad un massimo rilevato a 24 ore. Infine, è diminuito per stabilizzarsi in entrambi i casi ad un valore nell'intorno di 5. Per quanto riguarda la concentrazione di glucosio, in entrambi i casi vi è stata una forte diminuzione nelle prime ore di fermentazione, portando ad esaurire il glucosio entro le prime 24 ore di fermentazione.

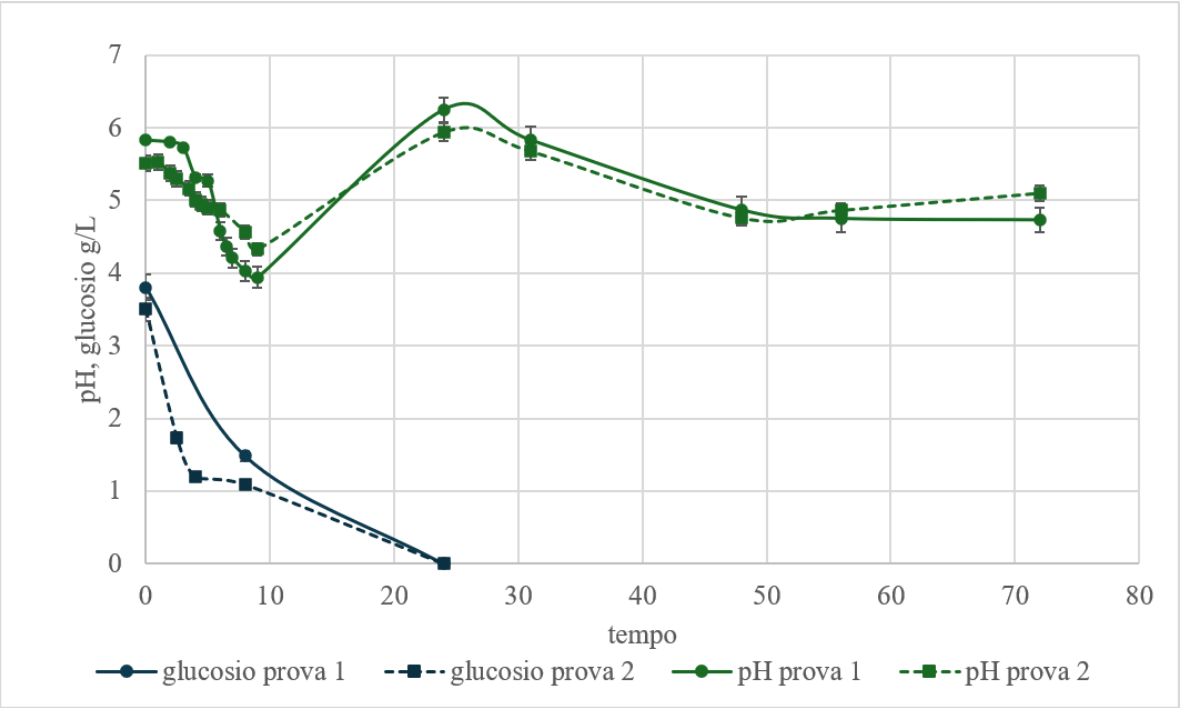


Figura 3.33 Confronto andamento pH e concentrazione di glucosio tra prova 1 e prova 2 in bioreattore.

Nella tabella 3.25 sono mostrati i valori di biomassa delle due prove in bioreattore, come si può notare nella prima prova il valore rilevato a 24 ore risulta essere superiore rispetto alla prova 2, questo può essere spiegato con una crescita in fase iniziale più ridotta, confermando anche la lettura inferiore nella misurazione dell'OD_{600}. Tuttavia, col protrarsi della prova i valori di biomassa ottenuti a 48 ore e 72 ore risultano invece sovrapponibili tra la prova 1 e la prova 2.

ora	biomassa (g/L) prova 1	biomassa (g/L) prova 2
24	4.6±0.1	3.9±0.1
48	7.1±0.2	6.9±0.2
72	7.5±0.3	7.4±0.4

Tabella 3.25 Confronto biomassa priva 1 e prova 2 in bioreattore.

3.6.3.1 Confronto estrazione di carotenoidi tra prova 1 e prova 2 in bioreattore

Gli istogrammi rappresentati nelle figure 3.34 e 3.35 confrontano la resa specifica in carotenoidi per ogni campionamento durante le prove 1 e 2 in bioreattore. Innanzitutto, si può facilmente

notare come l'adottare il pretrattamento di 1FT abbia migliorato in entrambi i casi la resa di estrazione. Un altro aspetto interessante è la resa specifica dei campioni estratti a 24 ore. Infatti, nella prova 2 si nota come il quantitativo di carotenoidi estratti risulti inferiore. Questo aspetto è un'ulteriore conferma della minor produzione di biomassa ma anche di carotenoidi nelle prime 24 ore di fermentazione, confermando quanto osservato con la misurazione dell'OD_{490}. Più in basso sono riportati nelle figure 3.36 e 3.37 gli istogrammi raffiguranti la resa volumetrica in carotenoidi nelle due prove. Anche in questo caso si nota come i valori favoriscano la tecnica di estrazione 1FT. Inoltre, essendo la resa volumetrica, in prodotto tra resa specifica e biomassa, l'aspetto della minor produzione di biomassa a 24 ore viene amplificato ulteriormente, rendendo più visibile la differenza. Invece, per quanto riguarda i risultati ottenuti a 48 e 72 ore essi risultano sovrapponibili, sia a parità di tempo di campionamento, ma anche tra di loro per tutti i campioni. Come già suggerito nei paragrafi 3.4.1 e 3.4.2, questo aspetto confermato dalla ripetitività ottenuta effettuando due prove, sembrerebbe confermare la convenienza di arrestare la fermentazione a 48 ore.

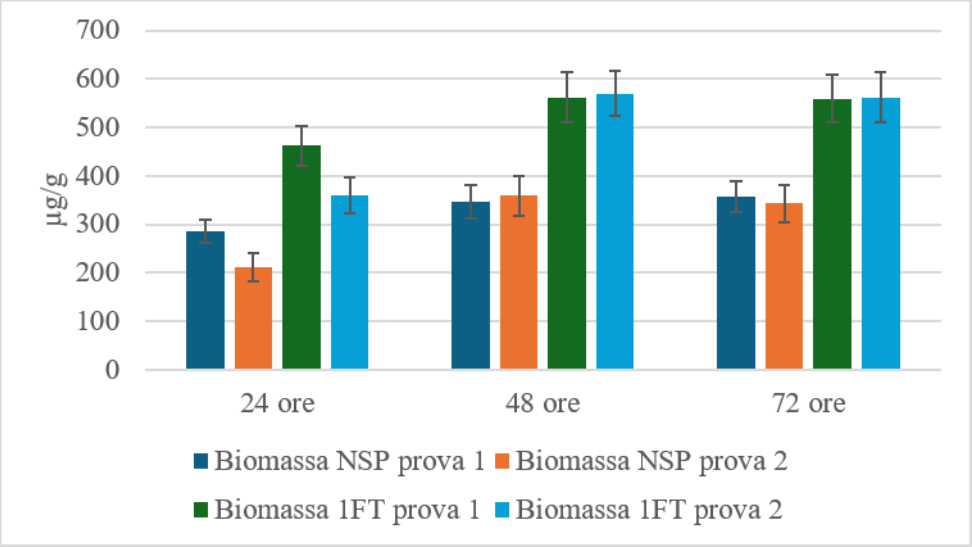


Figura 3.34 Resa specifica in carotenoidi prova 1 e prova 2 in bioreattore con biomassa NSP e 1FT.

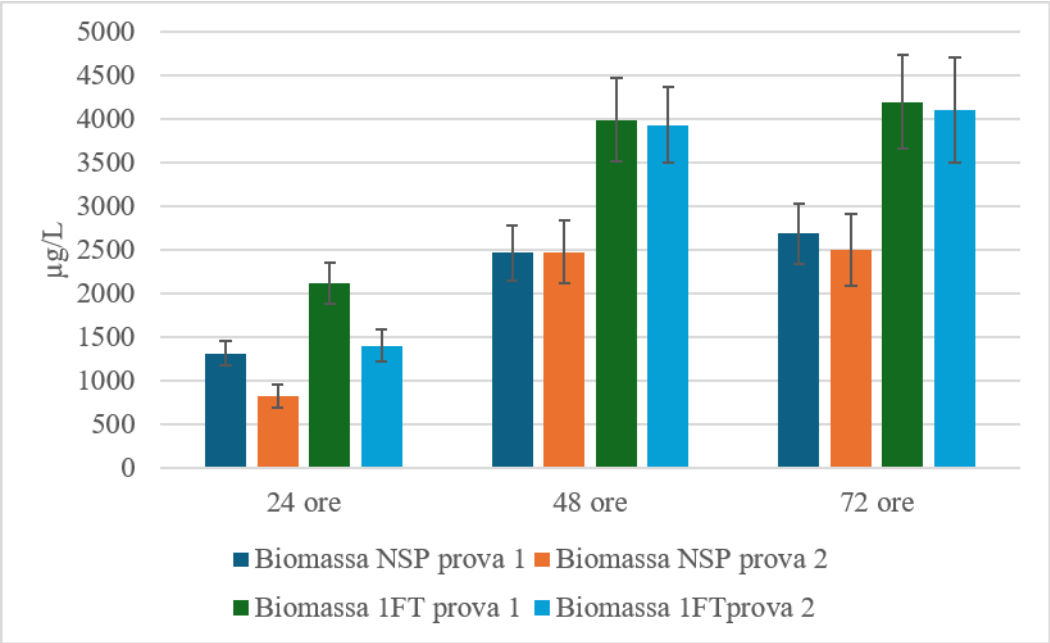


Figura 3.35 Resa volumetrica in carotenoidi biomassa prova 1 e prova 2 in bioreattore con biomassa NSP e 1FT.

4. Conclusioni e sviluppi futuri

I risultati delle prove in beuta evidenziano come la modalità di conduzione *fed-batch* consenta di massimizzare la produzione sia di biomassa sia di carotenoidi, sia nell'opzione a *fed-batch* singolo che in quella a doppio *fed-batch*. La scelta dello schema *fed-batch* più idoneo per il trasferimento richiede un compromesso tra la resa produttiva e la complessità gestionale del processo. Dalla sperimentazione è emerso che le colture a doppio *fed-batch* (FB24-24 e FB48-24) garantiscono la produzione complessiva di biomassa e carotenoidi più elevata. Ipotizzando un volume di coltura pari a 2 L, la condizione FB24-24 ha fornito 18.05±0.27 g di biomassa e 9183±906 µg di carotenoidi, mentre la FB48-24 ha raggiunto 18.47±0.36 g di biomassa e 10394±1066 µg di carotenoidi. Per contro, le configurazioni a singolo *fed-batch* FB24 e FB48 hanno registrato rese inferiori, rispettivamente pari a 13.42±0.15 g di biomassa e 7131±650 µg di carotenoidi per FB24, e 14.76±0.31 g di biomassa e 8563±865 µg di carotenoidi per FB48. Tuttavia, l'analisi della significatività statistica ha mostrato come la modalità di coltura FB48, sul fronte della produzione totale di carotenoidi, risulti avere una differenza statisticamente significativa con la coltura *batch* a 72 ore, mentre ha una differenza non statisticamente significativa con entrambe le colture a *fed-batch* doppio. Tali evidenze indicano come la modalità di coltura FB48 possa essere il compromesso migliore tra coltura *batch* e *fed-batch*. Infatti, in combinazione con l'analisi statistica, occorre considerare l'impatto operativo di tali schemi: l'esecuzione di un secondo *fed-batch* comporta infatti un maggior numero di manipolazioni, incrementando il rischio di contaminazione biologica.

Per quanto riguarda le prove condotte in bioreattore, i dati dimostrano la possibilità di ridurre la durata del processo batch da 72 a 48 ore, ottenendo una produzione di biomassa e carotenoidi equivalente a quella osservata nei tempi più lunghi, con un sensibile risparmio del tempo di processo.

Sul fronte del downstream, la revisione del protocollo di estrazione ha consentito di abbattere il consumo di solventi del 25% per il DMSO e del 50% per l'acetone, mantenendo inalterata la resa in carotenoidi sia con il Metodo 2 che con il Metodo 3 rispetto al protocollo di riferimento (Metodo 1). Inoltre, l'introduzione del pretrattamento di congelamento e scongelamento (1FT) ha dimostrato un impatto cruciale sulla resa estrattiva: l'impiego della biomassa sottoposta a 1FT permette di incrementare il recupero di carotenoidi compreso tra il 64.5% e il 93.1% rispetto all'estrazione condotta su biomassa non pretrattata (NSP).

Come possibili sviluppi futuri, si prospetta lo scale-up dei processi *fed-batch* in bioreattore, affiancato da un'analisi di ottimizzazione dei parametri operativi, quali l'introduzione del controllo attivo del pH e l'incremento della percentuale di ossigeno disciolto.

5. Bibliografia

Aksu, Z., & Eren, A. T. (2007). Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical Engineering Journal, 35*(2), 107–113. https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.01.004

An, G.-H., Jang, B.-G., & Cho, M.-H. (2001). Cultivation of the carotenoid-hyperproducing mutant 2A2N of the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) with molasses. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 92*(2), 121–125. https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80211-5

Archana Goyal, Gaurav Shukla, Shruti Mishra, Sarita Mallik, Anuradha Singh, Manish Dubey. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* (Vol. 13, n. 4, e9532, 2023/2024) https://doi.org/10.55251/jmbfs.9532

Callejo, M. J., García Navas, J. J., Alba, R., Escott, C., Loira, I., González, M. C., & Morata, A. (2019). Wort fermentation and beer conditioning with selected non-Saccharomyces yeasts in craft beers. *European Food Research and Technology*, *245*(6), 1229-1238. https://doi.org/10.1007/s00217-019-03244-w

Castillo Martinez F.A., Balciunas E.M., Salgado J.M. Lactic acid properties, applications and production: A review. Trends in Food Science & Technology 2013. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.11.007

Cheng, Y. T., & Yang, C. F. (2016). Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 61, 270–275. https://doi.org/10.1016/j.jtice.2015.12.027

Dancker P.; Glas K.; Gastl M. Potential utilisation methods for brewer's spent grain: a review. International Journal of Food Science and Technology, 2025, 60(1). https://doi.org/10.1093/IJFOOD/vvae022

Frengova, G. I., & Beshkova, D. M. (2009). Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: Yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 36*(2), 163–180. https://doi.org/10.1007/s10295-008-0492-9

Ghilardi, C., Sanmartin Negrete, P., Carelli, A. A., & Borroni, V. (2020). Evaluation of olive mill waste as substrate for carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Bioresources and Bioprocessing, 7*, 52. https://doi.org/10.1186/s40643-020-00341-7

Gomaa, A. (2018). Application of enzymes in brewing. Journal of Nutrition and Food Science Forecast, 1(5).

Ikram, S., Huang, L., Zhang, H., Wang, J., & Yin, M. (2017). *Composition and Nutrient Value Proposition of Brewers Spent Grain*. Journal of Food Science, 82, 2232–2242. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13794

Kaneda, H., Kano, Y., Sekine, T., Ishii, S., Takahashi, K., & Koshino, S. (1992). Effect of pitching yeast and wort preparation on flavor stability of beer. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *73*(6), 456-460.
https://doi.org/10.1016/0922-338X(92)90137-J

Khaled B Al-Monofy, Mahmoud H Farghali, Lamiaa A Al-Madboly, Amal M Abo Kamer, Ahmed A Abdelaziz. Advances in biomanufacturing and recent biological applications of the fundamental bacterial carotenoids: a comprehensive review. Microbial Cell Factories 2025.
https://doi.org/10.1186/s12934-025-02847-1

Kot, A. M., Błażejak, S., Gientka, I., Kieliszek, M., & Bryś, J. (2018). Torulene and torularhodin: New fungal carotenoids for industry? *Microbial Cell Factories, 17*, 49.
https://doi.org/10.1186/s12934-018-0893-z

Lee, J. J. L., Chen, L., Shi, J., Trzcinski, A., & Chen, W.-N. (2014). Metabolomic profiling of *Rhodosporidium toruloides* grown on glycerol for carotenoid production during different growth phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62*(41), 10203–10209.
https://doi.org/10.1021/jf502987q

Lewis, M. J., & Young, T. W. (2001). Finishing processes. In *Brewing* (pp. 339-350). Springer.
https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0729-1_19

Libkind, D., Moliné, M., van Broock, M., Brizzio, S. e Sampaio, J.P., 2025. Production of uncommon carotenoids and lipids by red yeasts: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 109(1), pp.102-118.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC12823764/

Li, Z., Li, C., Cheng, P. e Yu, G., 2022. *Rhodotorula mucilaginosa*—alternative sources of natural carotenoids, lipids, and enzymes for industrial use. *Heliyon*, 8(11), p.e11505.
https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11505

Lopes N.A., Diaz Remedi R., dos Santos Sá C., Veiga Burkert C.A., Fernandes de Medeiros Burkert J., Different cell disruption methods for obtaining carotenoids by *Sporodiobolus pararoseus* and *Rhodothorula mucilaginosa*, Food Sci Biotechnol. 2017 May 29;26(3):759–766.
https://doi.org/10.1007/s10068-017-0098-y

Pagels F., Pereira R. N., Vicente A. A., Guedes A. C.; Extraction of Pigments from Microalgae and Cyanobacteria—A Review on Current Methodologies; *Appl. Sci.* 2021, *11*(11), 5187
https://doi.org/10.3390/app11115187

Papapostolou H., Kachrimanidou V., Alexandri M., Plessas S., Papadaki A., Kopsahelis N.; Natural Carotenoids: Recent Advances on Separation from Microbial Biomass and Methods of Analysis. Antioxidants 2023, 12(5), 1030.
https://doi.org/10.3390/antiox12051030

Parker, D. K. (2012). Beer: Production, sensory characteristics and sensory analysis. In *Alcoholic beverages* (pp. 133-158). Elsevier.
https://doi.org/10.1533/9780857095176.2.133

Raita S., Felmane L., Kusnere Z, Spalvins K., Kuzmika I., Berzina I., Mika T. Environmental and Climate Technologies 2023, vol. 27, no. 1, pp. 1027–1048
https://doi.org/10.2478/rtuect-2023-0075

Ribeiro, B. D., Barreto, D. W., & Coelho, M. A. Z. (2011). Technological Aspects of βCarotene Production. In Food and Bioprocess Technology (Vol. 4, Issue 5, pp. 693–701).
https://doi.org/10.1007/s11947-011-0545-3

Rodrigues, T. V. D., Amore, T. D., Teixeira, E. C., & Burkert, J. F. M. (2019). Carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa* in batch and fed-batch fermentation using agroindustrial byproducts. *Food Technology and Biotechnology, 57*(3), 388–398.
https://doi.org/10.17113/ftb.57.03.19.6068

Rodríguez-Sáiz, M., de la Fuente, J. L., & Barredo, J. L. (2010). *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. *Applied Microbiology and Biotechnology, 88*(3), 645–658.
https://doi.org/10.1007/s00253-010-2814-x

Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T. T., & Bourtoom, T. (2011). Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry, 46*(1), 210–218.
https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.009

Saini R.K.; Keum Y.-S. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. Food Chemistry 2018.
https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099

Saubenova, M.; Rapoport, A.; Venkatachalam, M.; Dufossé, L.; Yermekbay, Z.; Oleinikova, Y. Production of Carotenoids by Microorganisms. Fermentation 2024. 10, 502.
https://doi.org/10.3390/fermentation10100502

Schisler, D. O., Ruocco, J. J., & Mabee, M. S. (1982). Wort trub content and its effects on fermentation and beer flavor. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *40*(2), 57-61.
https://doi.org/10.1094/ASBCJ-40-0057

Schmidt, I., Schewe, H., Gassel, S., Jin, C., Buckingham, J., Hümbelin, M., Sandmann, G., & Schrader, J. (2011). Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma*/*Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied Microbiology and Biotechnology, 89*(3), 555–571.
https://doi.org/10.1007/s00253-010-2976-6

Schneider, T., et al. (2013). Pigment production by Rhodotorula mucilaginosa cultured on brewer's spent grain hydrolysate. Bioresource Technology, 148, 132-137.
https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.138

Schwarz, P., & Li, Y. (2011). Malting and brewing uses of barley. *Barley: Production, Improvement, and Uses*, 478-521.
https://doi.org/10.1002/9780470958636.ch15

Siebert, K. J. (2001). Chemometrics in brewing-A review. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 59(4), 147-156.
https://doi.org/10.1094/ASBCJ-59- 0147

Sriphuttha, C., Boontawan, P., Boonyanan, P., Ketudat-Cairns, M., & Boontawan, A. (2023). Simultaneous lipid and carotenoid production via *Rhodotorula paludigena* CM33 using crude glycerol as the main substrate: Pilot-scale experiments. *International Journal of Molecular Sciences, 24*(24), 17192.
https://doi.org/10.3390/ijms242417192

Willaert, R. (2007). The beer brewing process: Wort production and beer. *Handbook of Food Products Manufacturing*, *2*, 443.
https://doi.org/10.1002/9780470113554.ch20

Zhengjie Xie, Meiling Dan, Guohua Zhao, Damao Wang. Recent advances in microbial high-value utilization of brewer's spent grain. Bioresource Technology 408 (2024) 131197.
https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.131197