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

Formulazione di microbiomi (lieviti-batteri) per la produzione di idrogeno, etanolo ed acidi organici

Relatori

Prof. Bernardo Ruggeri

Dr. Ing. Carlos Enrique Gomez Camacho

Candidato

Romolo Di Sabatino

Dicembre 2021

Sommario

Introduzione 1
1 Bioetanolo e bioidrogeno 3
1.1 Bioetanolo 3
1.1.1 Metodi di produzione 6
1.1.1.1 Grano di mais 6
1.1.1.2 Canna da zucchero 7
1.1.2 Costi e produzioni annue 8
1.2 Idrogeno 10
1.2.1 Metodi di produzione idrogeno 11
1.2.2 Steam reforming del metano 11
1.3 Bioidrogeno 12
1.3.1 La Dark Fermentation 12
2 Le comunità microbiche 15
2.1 Colture miste VS monocolture 15
2.2 Fermentazione delle biomasse organiche 16
2.2.1 Fonti di biomassa organica per la fermentazione 18
2.2.1.1 Analisi economica 20
2.2.2 Possibile processo di coltura mista per la produzione di etanolo, idrogeno e acidi organici da risorse rinnovabili e confronto critico con i processi attuali 20
2.2.2.1 Considerazioni economiche ed ambientali 22
3 Kefir d'acqua 25
3.1 Produzione 26
3.2 Substrati e fattori che influenzano le caratteristiche di fermentazione ... 27
3.3 Diversità microbica 29
3.3.1 Batteri dell'acido lattico 29
3.3.2 Batteri dell'acido acetico 29
3.3.3 Altri batteri 29
3.3.4 Lieviti 29
3.4 Interazioni metaboliche e metaboliti 30
3.4.1 Il metabolismo del saccarosio e l'azione del lievito 30

3.5 Possibile scale-up della produzione di kefir d'acqua 31
4 Spore forming bacteria 33
5 Obiettivi, materiali e metodi, procedure sperimentali 35
5.1 Obiettivi 35
5.2 Materiali e metodi analitici 35
5.2.1 Misura di solidi volatili (VS) e solidi totali (TS) 35
5.2.1.1 Misura solidi totali (TS) 36
5.2.1.2 Misura solidi volatili (VS) 37
5.2.2 Acidità titolabile 38
5.2.3 Gradi Brix (°Bx) 39
5.2.4 Conducibilità 39
5.2.5 Misura di pH 40
5.2.6 Misura del potenziale redox (ORP) 41
5.2.7 Analisi dei brodi fermentati 42
5.2.8 Spettroscopia 43
5.2.9 Misura del gas prodotto 43
5.2.10 Analisi di immagini 44
5.2.11 Trattamento dei dati sperimentali 45
5.2.11.1 Analisi delle curve risultanti dall'analisi del gas 45
5.2.11.2 Analisi statistica dei dati 46
5.3 Procedure sperimentali 46
5.3.1 Inoculi 46
5.3.1.1 Inoculo "Water Kefir" 46
5.3.1.2 Inoculo "Spore Forming Bacteria" - Clostridium 50
5.3.2 Substrato 51
5.3.2.1 Pre-trattamenti 53
5.3.3 Prove di fermentazione 54
6 Risultati delle prove sperimentali, considerazioni e commenti 57
6.1 Inoculo "Water Kefir" 57
6.2 Pre-trattamenti 63
6.3 Prove di fermentazione 70

6.3.1 Prima prova 71
6.3.2 Seconda prova 73
6.3.3 Terza prova 75
7 Conclusioni 79
Appendice A : Ulteriori test e analisi effettuati durante la fermentazione dei grani di kefir d'acqua 81
Appendice B : Scelta della percentuale di TS da utilizzare per il substrato 87
Appendice C : Primo test di fermentazione non riportato nel rispettivo paragrafo. Ulteriori analisi eseguite per le prive 1, 2 e 3 89
Bibliografia 93
Ringraziamenti 97

INDICE TABELLE

Tabella 1.1 Vantaggi generali rivendicati sui biofuels [6]. 4
Tabella 1.2 Proprietà fisiche e chimiche di metanolo, etanolo e benzina [6]. 5
Tabella 1.3 Componenti di costo nella produzione di etanolo da mais e canna da zucchero [3] 9
Tabella 2.1 Esempi di produzione e composizione di rifiuti organici. Tratto da [3] con modifiche. 19
Tabella 3.1 Confronto tra kefir d'acqua e kefir di latte. Tratto da [17] con modifiche. 25
Tabella 3.2 Contenuto di calcio di vari potenziali substrati di kefir d'acqua [17]. 28
Tabella 6.1 Valori di ORP per le respirazioni cellulari [28]. 60
Tabella 6.2 Caratteristiche dei diversi pre-trattamenti. 63
Tabella 6.3 Condizioni operative. 70
Tabella 6.4 Percentuale maltosio nel substrato pre-trattato. 71
Tabella 6.5 Risultati della prima prova di fermentazione. 71
Tabella 6.6 Tempi di latenza delle 3 curve relative al volume totale di gas (prima prova). 72
Tabella 6.7 Risultati della seconda prova di fermentazione. 73
Tabella 6.8 Tempi di latenza delle 3 curve relative al volume totale di gas (seconda prova). 74
Tabella 6.9 Percentuale dei prodotti di fermentazione nella seconda prova di fermentazione. 75
Tabella 6.10 Risultati della terza prova di fermentazione. 75
Tabella 6.11 Tempi di latenza delle 3 curve relative al volume totale di gas (terza prova). 76
Tabella 6.12 Percentuale dei prodotti di fermentazione nella terza prova di fermentazione. 77
Tabella 7.1 Informazioni nutrizionali del mix enzimatico utilizzato nello studio dei pre-trattamenti. 88
Tabella 7.2 Risultati parziali della terza prova effettuata senza il pre-trattamento del substrato. 89
Tabella 7.3 Tempi di latenza delle 2 curve relative al volume totale di gas (della prova effettuata senza il pre-trattamento del substrato). 89

INDICE FIGURE

Figura 1.1 Riduzione delle emissioni di gas serra, rispetto alla benzina, da parte del bioetanolo prodotto da una varietà di materie prime (sulla base del ciclo di vita). Tratta da [6] con modifiche. 6
Figura 1.2 Produzione di etanolo dal mais. Tratto da [3] con modifiche. 7
Figura 1.3 Produzione di etanolo dalla canna da zucchero. Tratto da [3] con modifiche. 8
Figura 1.4 Percorsi di produzione di idrogeno dalla biomassa. Tratto da [11] con modifiche. 10
Figura 1.5 Produzione di idrogeno. Tratto da [3] con modifiche. 11
Figura 1.6 Panoramica della via metabolica che porta alla formazione di idrogeno nel processo di digestione anaerobica. Tratto da [14] con modifiche. 13
Figura 2.1 Esempi di prodotti da fermentazione anaerobica di materia organica. Mostrati solo i principali prodotti. L'idrogeno è riportato tra parentesi perché è prodotto contemporaneamente agli acidi organici dagli zuccheri o dalle catene di acidi grassi, ma non necessariamente dagli aminoacidi. 16
Figura 2.2 Schema di processo ipotizzato per la produzione simultanea di etanolo, acidi organici e idrogeno da rifiuti organici. Tratto da [3] con modifiche. 21
Figura 3.1 Fasi della produzione del kefir d'acqua tradizionale. Tratto da [17] con modifiche. 27
Figura 3.2 Alcuni substrati atipici che possono essere utilizzati nella preparazione del kefir d'acqua [17]. 28
Figura 3.3 Metaboliti primari e interazione tra il microbiota del kefir d'acqua. Tratta da [17] con modifiche. 30
Figura 4.1 Analisi della cultura DF: accoppiamento di cluster virtuali (FC) e morfologie osservate. Tratto da [2] con modifiche. 33
Figura 4.2 Via metabolica del glucosio da parte di HPB in condizioni anaerobiche. ① Piruvato ferredossina ossidoreduttasi (PFOR); ② Idrogenasi; ③ NADH ferredossina ossidoreduttasi. Le lettere indicano gli organismi che conducono queste reazioni come segue: A Batteri dell'acido lattico (*Streptococcus, Lactobacillus*); B *Clostridium propionicum*; C Lieviti, Acetobacter, *Zymomonas, Sarcina ventriculi, Erwinia amylovora*; D *Enterobacteriaceae* (coli-aerogeni); E, Clostridia; F *Aerobacter*; G Lievito; H Clostridia (organismi butirrici e butirrici); I Batteri dell'acido propionico. Tratto da [14] con modifiche. 34
Figura 5.1 Fotografia della **b**ilancia analitica, modello E42S (Gibertini Elettronica, Novate Milanese, Italia). 36

Figura 5.2 Fotografia dell'essiccatore da laboratorio. 37
Figura 5.3 (a) Fotografia della stufa modello Isco 1900 e (b) crogioli all'interno della stufa. 37
Figura 5.4 Fotografia della muffola analitica. 38
Figura 5.5 Fotografie di: (a) Refrattometro Laiss e (b) visualizzazione interna di una misura. 39
Figura 5.6 Misuratore Conducibilità. 40
Figura 5.7 Fotografie di: (a) pH-metro Steiel, (b) pH-metro portatile e (c) pH-metro Crison. 41
Figura 5.8 Fotografia del misuratore Red-Ox modello M99220. 42
Figura 5.9 HPLC Kontron Instruments. 42
Figura 5.10 Fotografia di: (a) Centrifuga modello IEC CL30 con una sua foto interna (b). La (c) invece raffigura il termostato modello IGLOO 560 dell'HPLC. 43
Figura 5.11 Spettroscopio UV/VIS (PerkinElmer, PDA, UV-VIS, Lambda 465). 43
Figura 5.12 Fotografia di: (a) Apparecchiatura per la rilevazione di gas con un particolare (b) sull'interno. (c) Esempio live della interfaccia dove si riportano le curve relative alla produzione di gas. 44
Figura 5.13 Fotografie del (a) Microscopio Olympus BH-2 con un particolare sugli obbiettivi (b). 45
Figura 5.14 Bottiglie utilizzate per la prima prova di fermentazione dei grani di kefir d'acqua con un particolare volto a mostrare i grani all'interno della soluzione. 47
Figura 5.15 Chiusura utilizzata nelle bottiglie per creare le condizioni di non totale anaerobiosità. 47
Figura 5.16 Fermentazione dei grani di kefir d'acqua nel Minifors I. 48
Figura 5.17 Micrografia della miscela di lieviti e batteri nell'inoculo WK (x60). 49
Figura 5.18 Pellet ottenuto post centrifuga. 49
Figura 5.19 (a) Slurry da letame bovino solido, 1:1 (*m/m*) con un particolare (b) sulla paglia. 50
Figura 5.20 (a) Sistema completo di agitazione con un particolare (b) sul motore. 50
Figura 5.21 Micrografia di uno Spore Forming Bacteria (x60). 51
Figura 5.22 Risultati della caratterizzazione del pane raffermo t.q. 52
Figura 5.23 Substrato al 10% di TS. 52
Figura 5.24 Test per la scelta del pre-trattamento in agitazione. 53

Figura 5.25 Chiusura delle bottiglie di fermentazione con particolari su Albero motore, Pinza, Pinza Hoffman e Agitatore presente nel tappo fornito dalla casa produttrice dell'AMPTS 2. 55
Figura 5.26 Vista completa dell'unità di lavoro dell'AMPTS 2. 56
Figura 6.1 Caratterizzazione dei primi grani di kefir d'acqua utilizzati. 57
Figura 6.2 Caratterizzazione dei secondi grani di kefir d'acqua utilizzati. 57
Figura 6.3 Variazione del pH nel tempo. 58
Figura 6.4 Concentrazione totale di acido acetico (g/L) alla fine degli 8 backslopping. 58
Figura 6.5 Variazione della concentrazione dell'acido acetico (g/L) nel tempo per i BS 5, 6, 7 e 8. 59
Figura 6.6 Variazione dell'ORP nel tempo (i BS 5, 6, 7 e 8 fanno riferimento all'asse delle ordinate di destra). 59
Figura 6.7 Variazione dei gradi °Brix nel tempo. 60
Figura 6.8 Micrografia della miscela di lieviti e batteri durante la fermentazione dei primi grani di WK (x60). Il blu di metilene è stato utilizzato per colorare i microrganismi presenti 61
Figura 6.9 Micrografia della miscela di lieviti e batteri nell'inoculo WK (x60). I batteri sono i microrganismi più piccoli, i lieviti quelli più grandi. 61
Figura 6.10 Variazione della conducibilità [ppm] nel tempo. 62
Figura 6.11 Variazione della massa umida dei grani negli 8 BS. 63
Figura 6.12 (a) Assorbanza del glucosio e di altri zuccheri studiati da [30]. (b) Misure di assorbanza di due soluzioni a diverse concentrazioni di glucosio. 64
Figura 6.13 Misura dell'OD per 3 dei 6 test. 64
Figura 6.14 Misura dei Gradi °Brix per 3 dei 6 test. 65
Figura 6.15 Misura dell'OD per 3 dei 6 test. 65
Figura 6.16 Misura dei Gradi °Brix per 3 dei 6 test. 66
Figura 6.17 Variazione nel tempo della misura dell'OD durante le 24 ore di trattamento con NaOH. 66
Figura 6.18 Substrato pre-trattato per 24 ore con NaOH. Si possono notare alcune parti gelificate. 67
Figura 6.19 Variazione nel tempo della misura dei Gradi °Brix durante le 24 ore di trattamento con NaOH. 67
Figura 6.20 Micrografia del substrato t.q. (10% di TS) al tempo zero (x60). ... 68
Figura 6.21 Micrografia del substrato (10% di TS) dopo 24 ore di trattamento con NaOH (x60). 68
Figura 6.22 Micrografia del substrato (10% di TS) dopo 24 ore di trattamento con NaOH (x60) con indicati i "vuoti". 69
Figura 6.23 Grano idrolizzato trattato con NaOH. Tratto da [31]. 69
Figura 6.24 Risposta dell'analisi tramite HPLC del substrato pre-trattato. 71

Figura 6.25 Evoluzione del gas e frazioni di idrogeno e anidride carbonica per ogni sistema nella prima prova. 72
Figura 6.26 Evoluzione del gas e frazioni di idrogeno e anidride carbonica per ogni sistema nella seconda prova. 74
Figura 6.27 Cromatogramma dei 12 sistemi fermentati (seconda prova). 74
Figura 6.28 Evoluzione del gas e frazioni di idrogeno e anidride carbonica per ogni sistema nella terza prova. 76
Figura 6.29 Cromatogramma dei 12 sistemi fermentati (terza prova). 77
Figura 7.1 Prima prova di fermentazione della prima tipologia di grani di kefir d'acqua con il substrato a 60 g/L. 81
Figura 7.2 Seconda prova di fermentazione della prima tipologia di grani di kefir d'acqua con il substrato a 40 g/L. 81
Figura 7.3 Variazione della concentrazione di Acido Acetico all'interno dei surnatanti dei primi 5 backslopping dopo uno stoccaggio a 4°C per più di 20 giorni. 82
Figura 7.4 Variazione dei gradi Brix all'interno dei surnatanti dei primi 5 backslopping dopo uno stoccaggio a 4°C per più di 20 giorni. 82
Figura 7.5 Variazione nelle 24 ore dei TS durante il BS numero 6. 83
Figura 7.6 Variazione nelle 192 ore dei TS durante il BS numero 7. 83
Figura 7.7 Variazione nelle 96 ore dei TS durante il BS numero 8. 84
Figura 7.8 Micrografia di grani stoccati a 4°C per 3 mesi. Particolare su lieviti con morfologia di ife (x60). 84
Figura 7.9 Micrografia di grani stoccati a 4°C per 3 mesi. Particolare su lieviti con morfologia di ife (x60). 85
Figura 7.10 Micrografia e "post processing" attraverso la tecnica del "***Focus stacking***" eseguita tramite Photoshop 2021 di un grano post stufa a 105°C per 24 ore (x4). 85
Figura 7.11 Micrografia e "post processing" tramite Photoshop 2021 del surnatante finale del BS 2 (x60). In azzurro i lieviti e in rosso i batteri. 86
Figura 7.12 Micrografia di un surnatante stoccato a 4°C per più di 20 giorni (x60). Si può notare la massiccia presenza di vacuoli all'interno dei lieviti e quindi non nella loro forma vegetativa, simbolo della non ottimale condizione di stoccaggio. 86
Figura 7.13 Misura dell'OD per i due diversi test. 87
Figura 7.14 Misura dei gradi Brix per i due diversi test. 87
Figura 7.15 Evoluzione del gas e frazioni di idrogeno e anidride carbonica per ogni sistema nella prova effettuata senza il pre-trattamento del substrato. 89
Figura 7.16 Tasso di produzione della prova effettuata senza il pre-trattamento del substrato. 90
Figura 7.17 Tassi di produzione della prima prova. 90

Figura 7.18 Tassi di produzione della seconda prova. 91
Figura 7.19 Tassi di produzione della terza prova. 91

ACRONIMI

- **AAB** : Acetic Acid Bacteria;
- **AD** : Anaerobic Digestion;
- **AP** : Acid Pre-Treatment;
- **BP** : Basic Pre-treatment;
- **BS** : Backslopping;
- **DF** : Dark Fermentation;
- **EP** : Enzymatic Pre-treatment;
- **EPS** : Esopolisaccaridi;
- **ESP** : Enzymatic Pre-treatment with Salt;
- **HCB** : Hydrogen Consuming Bacteria;
- **HPB** : Hydrogen Producing Bacteria;
- **HPLC** : High-Performance Liquid Chromatography;
- **HTS** : High-Temperature Shift reactor;
- **ICE** : Internal Combustion Engine;
- **LAB** : Lactic Acid Bacteria;
- **LTS** : Low-Temperature Shift reactor;
- **OD** : Optical Density;
- **ORP** : Oxidation-Reduction Potential;
- **SEM** : Scanning Electron Microscopy;
- **SFB** : Spore Forming Bacteria;
- **SP** : Salt Pre-treatment;
- **TA** : Titratable Acidity;
- **t.q.** : Tal quale;
- **TS** : Total Solid;
- **VS** : Volatile Solid;
- **WK** : Water Kefir;

Introduzione

Negli ultimi anni, l'aumento dei problemi ambientali, legati soprattutto allo sfruttamento dei combustibili fossili, porta con se la necessità, sempre maggiore, di trovare nuove soluzioni, rinnovabili e sostenibili, per soddisfare il fabbisogno energetico mondiale [1].

Tra le possibili soluzioni sicuramente quella biotecnologica, soprattutto nell'ultimo decennio, sta avendo un rapido sviluppo. L'industria in questo settore si sta preparando ad affrontare una transizione da economie basate sul petrolio a modelli bioeconomici circolari e in questa grande sfida, giocano un ruolo fondamentale le diverse risorse di biomassa, rifiuti organici, i materiali lignocellulosici, grassi e oli di scarto, residui ricchi di zucchero e amido, sfruttate ad oggi dalle 224 bioraffinerie presenti in tutta Europa, e la vasta comunità microbica può essere sfruttata presente nel nostro pianeta [2].

Tra i prodotti principali dei processi biochimici, sicuramente idrogeno ed etanolo sono tra quelli con il più alto interesse, ma insieme ad essi, anche acido acetico, acido lattico e acido butirrico sono importanti e hanno una vasta gamma di usi. Tra questi, quello con la produzione annuale maggiore è l'etanolo, usato principalmente come combustibile e in minor quantità anche nella produzione di esteri. Al di sotto come quantità di produzione, c'è l'idrogeno il quale è usato principalmente nella produzione di fertilizzanti (sintesi dell'ammoniaca), metanolo, raffinazione del petrolio e nell'industria chimica per reazioni di idrogenazione. Un ulteriore utilizzo, ancora molto marginale, è quello per le fuel cells o come combustibile per i veicoli. Per quanto riguarda gli acidi invece, quello prodotto maggiormente tra quelli sopracitati è l'acetico, il quale è usato come intermedio nella produzione di plastica e della pittura. L'acido lattico viene usato principalmente nella produzione di plastiche e in campo alimentare, mentre il butirrico trova impiego nell'industria chimica, alimentare e cosmetica. Questi ultimi due sono prodotti in quantità molto minori rispetto al resto [3]. Nella Tabella I sono riportati i valori di riferimento dei tassi di produzione, il prezzo e le loro principali applicazioni.

Tabella I Produzione industriale e usi di alcuni prodotti di fermentazione [3].

Chemical	Produzione (milioni di tonnellate all'anno)	Prezzo di mercato (US$/kg)	Applicazioni principali
Etanolo	70,00	0,5	Combustibile
Idrogeno	50,00	7,0	Produzione di metanolo e fertilizzanti, raffineria
Acido acetico	7,00	0,5	Plastica, solventi, pesticidi
Acido lattico	0,15	1,3-1,6	Plastica, ingrediente alimentare
Acido butirrico	0,08	1,2	Prodotti farmaceutici, solventi, cosmetici

Di questi, principalmente 2, etanolo e idrogeno, ma considerando ovviamente anche gli acidi, sono i prodotti finali di interesse per questo lavoro di tesi e sui quali si basa il presente lavoro per valutare i risultati ottenuti alla fine del lavoro presso il laboratorio biotecnologico del Politecnico di Torino. La principale ipotesi di ricerca che motiva questo lavoro è la scansione di soluzioni biotecnologiche per la produzione di questi composti alternativa ai loro attuali metodi di produzione. In particolare, viene data attenzione all'utilizzo di colture microbiche miste, testando la fattibilità di formulazioni di inoculi per

fermentazioni industriali, partendo da una coltura indigena di kefir d'acqua (il cui uso primario storico sono state le fermentazioni casalinghe di probiotici). Come substrato è stato utilizzato uno scarto alimentare, in particolare quello del pane, cercando ovviamente di massimizzare la produzione, minimizzare i consumi energetici e l'uso di chemicals al fine di aumentare così la sostenibilità del processo studiato.

La struttura della tesi sarà divise in 2 macroaree, la prima parte, più teorica e di ricerca bibliografica, comprende una parte iniziale riguardante il bioetanolo e il bioidrogeno, richiami al metabolismo dei principali microrganismi, alla fermentazione anaerobica (AD) e alla dark fermentation (DF), ci sarà poi un confronto tra fermentazioni inoculate con monocolture e colture miste, evidenziando i pro e i contro di una e dell'altra, facendo anche una panoramica attuale sullo stato dell'arte di quest'ultime e infine saranno descritte le caratteristiche dei diversi tipi di inoculi. La seconda parte invece sarà tuta dedicata alla fase sperimentale, con una panoramica generale sui metodi analitici, misure e strumenti utilizzati, passando poi alla spiegazione del trattamento dei dati ottenuti ed infine si parlerà delle prove effettuate con i relativi risultati terminando con conclusioni e considerazioni.

PARTE 1: Teoria e analisi bibliografica

1 Bioetanolo e bioidrogeno

Come già accennato nell'introduzione i combustibili fossili non possono continuare ad essere sfruttati per soddisfare il fabbisogno energetico mondiale a causa della loro non uniforme presenza nel globo e per la loro limitata quantità [4]. La forte dipendenza del nostro mondo dai combustibili fossili ha causato e continua a causare una serie di effetti sfavorevoli, tra cui il peggioramento della qualità dell'aria, l'innalzamento della temperatura globale e la forte diminuzione delle riserve di petroli [5]. Il settore maggiormente responsabile per il consumo di combustibili fossili e per le emissioni di monossido di carbonio (CO) è quello dei trasporti, che impatta rispettivamente per il 60% e 70%. Inoltre, si stima questo settore abbia responsabilità anche per il 19% delle emissioni globali di biossido di carbonio (CO_2). Per avere un'idea del forte impatto che questo settore ha per quanto riguarda appunto la dipendenza da combustibili fossili e l'inquinamento, a livello mondiale nel 2007, secondo i dati, c'erano 806 milioni di veicoli tra auto e camion leggeri. Un numero che secondo le previsioni è destinato ad aumentare fino a 1,3 miliardi entro il 2030 e 2 miliardi entro il 2050, con potenziali forti conseguenze negative sugli equilibri di ecosistemi e clima. Tutti questi problemi, in aggiunta anche all'aumento delle emissioni di gas serra e al conseguente riscaldamento globale, alle considerazioni da fare sulla salute e alla sicurezza dell'umanità, portano alla necessità di sviluppare sempre più modi alternativi per alimentare i veicoli, con nuovi carburanti competitivi dal punto di vista ambientale, economico e tecnicamente fattibile [6]. Oltre a questo, anche il continuo aumento della popolazione mondiale e il conseguente aumento della richiesta mondiale di energia, sta mettendo davanti ad una grande sfida la ricerca scientifica. Per quanto riguarda la popolazione mondiale, nel 2011 questa era di circa 7 miliardi di persone e sono stati consumati 15 TWh di energia, i quali sono destinati ad aumentare fino a 30 TWh nel 2050, con un aumento previsto della popolazione fino a 9 miliardi di persone [4].

Nuove fonti di energia sostenibile di natura non fossile possono essere la soluzione a questo problema [7], come per esempio i prodotti intermedi ottenuti dalla digestione anaerobica hanno un alto interesse come vettori energetici (etanolo), prodotti chimici (acidi) o entrambi (idrogeno) [3].

1.1 Bioetanolo

Per trovare una soluzione a questo, sono stati sviluppati negli anni numerosi combustibili alternativi. Questi non derivano dal petrolio come i classici combustibili, ma sono ottenuti dalle diverse biomasse. I biocarburanti offrono dunque diversi vantaggi che possono essere riassunti nella Tabella 1.1 [6].

Tabella 1.1 Vantaggi generali rivendicati sui biofuels [6].

Aspetti economici	Sostenibilità
	Diversità del carburante
	Aumento del numero di posti di lavoro nella produzione rurale
	Aumento delle imposte sul reddito
	Aumento degli investimenti in impianti e attrezzature
	Sviluppo agricolo
	Competitività internazionale
	Riduzione della dipendenza dal petrolio importato
Impatti ambientali	Riduzione dei gas serra
	Riduzione dell'inquinamento dell'aria
	Biodegradabilità
	Maggiore efficienza della combustione
	Migliore utilizzo della terra e dell'acqua
	Sequestro del carbonio
Sicurezza energetica	Obiettivi domestici
	Affidabilità dell'approvvigionamento
	Riduzione dell'uso dei combustibili fossili
	Pronta disponibilità
	Distribuzione nazionale
	Rinnovabilità

Tra i diversi tipi di biocombustibili, ad oggi il più utilizzato nel mondo è il bioetanolo, il quale può essere prodotto principalmente da materie prime (biomasse) che possono essere raggruppate in 3 macro aree: zuccheri semplici, amido e lignocellulosa. Proprio la disponibilità di queste biomasse è uno dei problemi principali per la sua produzione. L'uso del bioetanolo come combustibile o della miscela di esso con la benzina veniva già utilizzato nel 1894 in Germania e Francia nei motori a combustione interna (ICE). Il Brasile invece, lo utilizza come carburante dal 1925, periodo in cui questo veniva prodotto in quantità 70 volte maggiore rispetto alla benzina. Anche in Europa, dopo la crisi petrolifera degli anni '70 si è iniziato ad usarlo.

Per quanto riguarda la qualità del prodotto, ci sono alcune richieste da soddisfare, tra queste:

- Gli impianti devono utilizzare solo fonti da biomassa e non fonti fossili;
- Per massimizzare i benefici, i sottoprodotti devono essere valorizzati a usati in maniera efficiente;
- Si devono minimizzare le emissioni di ossidi di azoto [6].

La qualità dipende anche dai percorsi di produzione in quanto questa consiste in diverse procedure sequenziali, ovvero pre-trattamenti, idrolisi, fermentazione e distillazione, quindi ogni fase, in base a come viene effettuata, darà diversi risultati sulla qualità [5]. L'etanolo è un importante combustibile liquido anche per la riduzione delle

emissioni di CO_2, inoltre ha un alto numero di ottano (108), minimizzando così il rischio di accensione precoce. Soffermandoci invece sugli svantaggi, esso presenta una densità energetica inferiore rispetto alla benzina e ha bassa pressione di vapore (che rende quindi più difficile l'accensione a freddo). Nella Tabella 1.2 sono riportate le proprietà fisiche e chimiche dell'etanolo paragonate al metanolo e al gasolio [6]

Tabella 1.2 Proprietà fisiche e chimiche di metanolo, etanolo e benzina [6].

Proprietà	**Metanolo CH_3OH**	**Etanolo C_2H_5OH**	**Benzina C_4-C_{12}**
Peso molecolare (g/mol)	32	46	~ 114
Gravità specifica	0,789	0,788	0,739
Densità del vapore rispetto all'aria	1,10	1,59	3,0 - 4,0
Densità del liquido ($g*cm^{-3}$ a 298 K)	0,79	0,79	0,74
Punto di ebollizione (K)	338	351	300 - 518
Punto di Fusione (K)	175	129	-
Calore di evaporazione (Btu/lb)	472	410	135
Potere calorifico ($kBTU*gal^{-1}$)			
Inferiore	58	74	111
Superiore	65	85	122
Pressione di progetto del serbatoio (psig)	15	15	15
Viscosità (cp)	0,54	1,20	0,56
Punto di flash (K)	284	287	228
Infiammabilità/esplosione limiti			
(%) Inferiore (LFL)	6,7	3,3	1,3
(%) Superiore (UFL)	36	19	7,6
Temperatura di autoaccensione	733	636	523 - 733
Solubilità in acqua (%)	Miscibile (100%)	Miscibile (100%)	Trascurabile (~0,01)
Azeotropo con l'acqua	No	95% EtOH	Immiscibile
Energia minima di accensione in aria (MJ)	0,14	0,23	-

Ovviamente in base a come il bioetanolo viene prodotto, questo offre benefici sulle emissioni di gas serra più o meno marcate. Si vede dalla Figura 1.1, in base al proprio ciclo vita, come la produzione a base di mais, offre benefici limitati, pari al 18% in meno rispetto

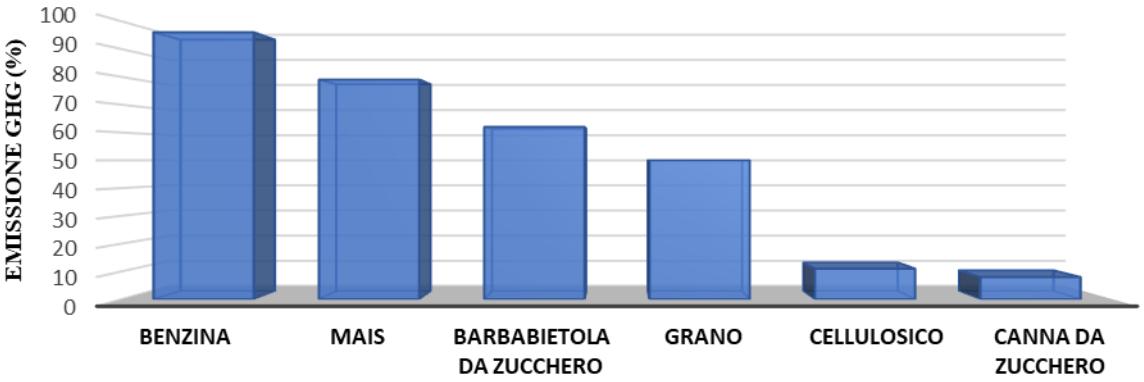


Figura 1.1 Riduzione delle emissioni di gas serra, rispetto alla benzina, da parte del bioetanolo prodotto da una varietà di materie prime (sulla base del ciclo di vita). Tratta da [6] con modifiche.

alla benzina, mentre utilizzando canna da zucchero e biomasse cellulose la riduzione è del 90% [6].

Tuttavia c'è un ulteriore problema, ossia quello del conflitto "*human food*", con il quale si intende il fatto che non si possono coltivare terreni solo per produrre biomassa ai fini energetici, in quanto quei terreni servono anche per la produzione di cibo [5]. Infine, l'incremento della produzione di bioetanolo negli ultimi decenni è accelerato, si è passati infatti da 31 miliardi di litri nel 2001 (dei quali il 62% prodotto in Brasile e Stati Uniti) [8] a 89 miliardi di litri nel 2015 [3]. Come detto più volte in precedenza, il bioetanolo si può ottenere da diverse materie prime, infatti anche per quanto riguarda i paesi con maggior produzione, Brasile e Stati Uniti (ad oggi l'88% della produzione mondiale è condivisa tra questi due paesi [3]), la materia prima utilizzata è differente : canna da zucchero per il primo e grano di mais per il secondo [8].

1.1.1 Metodi di produzione

Si è già parlato nel paragrafo precedente delle principali materie prime utilizzate nella produzione del bioetanolo, ottenuto tipicamente attraverso la loro fermentazione con l'utilizzo di colture pure di microrganismi selezionati. In generale la scelta della materia prima dipende dalla posizione e quindi dalla disponibilità geografica, e in base alla scelta sono state poi sviluppate tecnologie diverse [3].

1.1.1.1 Grano di mais

Le operazioni schematizzate nella Figura 1.2, la quale mostra il flusso di produzione di bioetanolo da mais, sono le seguenti: macinazione della materia prima, liquefazione, idrolisi dell'amido, fermentazione e purificazione dell'etanolo. Lo step fondamentale è quello di liquefazione e successiva idrolisi in quanto questi sono il fulcro della buona riuscita della fermentazione dato che i microrganismi possono metabolizzare facilmente

solamente gli zuccheri più semplici, monosaccaridi, e non così velocemente zuccheri complessi (amido per esempio), polisaccaridi, che appunto necessitano di essere idrolizzati. La liquefazione, che è posta dopo una fase di macinazione, avviene alla temperatura di 80-90 °C con lo scopo di solubilizzare tutti i componenti dell'amido (amilosio e amilopectina). In questa fase, per migliorare il risultato, viene aggiunto anche un enzima termoresistente, l'α-amilasi, che inizia la fase di idrolisi dell'amido la quale verrà poi completata nello step successivo. In seguito avviene l'idrolisi dell'amido a pH neutro o acido e con l'aggiunta di enzimi idrolitici, il tutto è seguito dalla fermentazione a temperatura di 35-40 °C della soluzione concentrata di glucosio effettuata con colture pure di microrganismi, per lo più attraverso la specie *Saccharomyces Cerevisiae*. La reazione semplificata che descrive la produzione di etanolo dalla fermentazione del glucosio è la seguente :

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

Alla fine del processo si ottiene una concentrazione di etanolo pari a circa l'8-10% in peso (7-11% in volume), il quale poi viene purificato al 99% in peso attraverso una serie di colonne di distillazione seguite da purificazione finale [3].

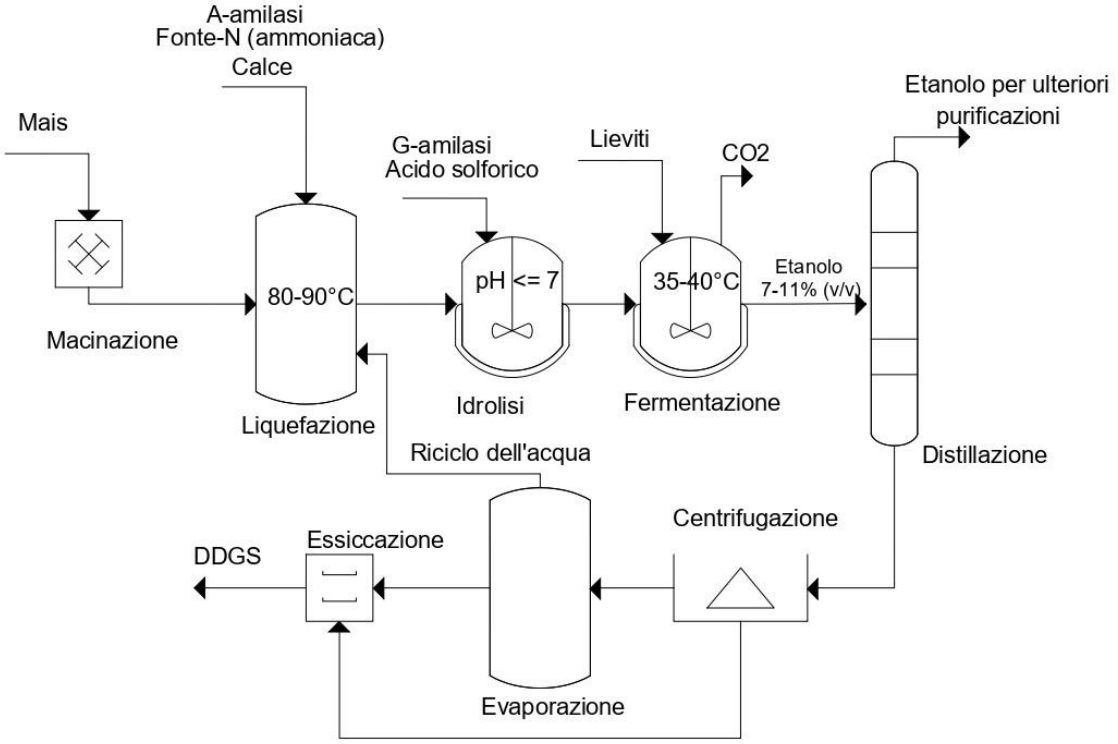


Figura 1.2 Produzione di etanolo dal mais. Tratto da [3] con modifiche.

1.1.1.2 Canna da zucchero

Nel caso dell'uso di canna da zucchero come materia prima, l'etanolo è un co-prodotto della produzione dello zucchero. Il processo, rappresentato in Figura 1.3, è costituito dai seguenti step: si inizia con l'ottenere un estratto di canna da zucchero che viene immediatamente separato dalla bagassa. Quest'ultima viene bruciata nella caldaia per generare corrente elettrica per gli impianti industriali, mentre l'estratto passa attraverso una fase di chiarificazione e concentrazione. Nella prima fase esso viene purificato attraverso trattamenti fisici e chimici e le fibre e le particelle di sporco vengono rimosse attraverso

vagli e idrocicloni. L'estratto viene poi pre-riscaldato a 70 °C, successivamente a 105 °C e infine viene fatto decantare. Si ottiene un fango che viene filtrato per recuperare lo zucchero e il resto viene ricircolato nel processo. Si ottiene un succo chiarificato il quale nel caso in cui non abbia la concentrazione desiderata, viene miscelato con la melassa, poi sterilizzato per evitare contaminazioni dannose per i microrganismi e alla fine viene messo nel

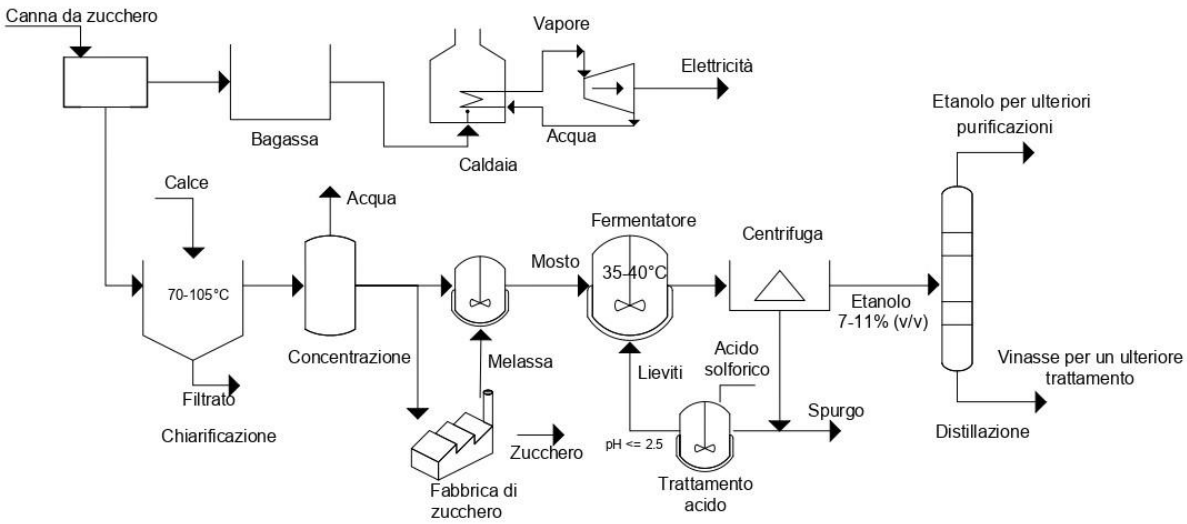


Figura 1.3 Produzione di etanolo dalla canna da zucchero. Tratto da [3] con modifiche.

fermentatore a 35-40 °C. Dopo circa 6-12 ore si ottiene un etanolo concentrato al 7-11% in volume il quale dopo distillazione arriva alla purezza desiderata. Il fermentato, prima di andare in distillazione, viene centrifugato e i lieviti separati vengono trattati a pH acido (2,0-2,5) per minimizzare la contaminazione batterica in modo da poterlo riciclare nel processo [3].

1.1.2 Costi e produzioni annue

Un aspetto che non va mai trascurato è il costo totale della produzione. In tutti e due i casi appena elencati, il contributo maggiore è dato dal prezzo della materia prima, 60% del costo totale per quanto riguarda il grano di mais e il 68% per la canna da zucchero. Ai costi vanno poi aggiunti quelli riguardanti per esempio i prodotti chimici e i microrganismi, 7% circa per il mais, quelli delle utilities e anche quelli riguardanti la distillazione. In quest'ultima, il costo riguarda il prezzo del vapore che nel caso della produzione da zucchero di canna, è molto basso poiché il processo prevede una valorizzazione termica di un residuo (bagassa), cosa che invece non avviene con il mais [3]. I diversi contributi sono riassunti nella Tabella 1.3.

Tabella 1.3 Componenti di costo nella produzione di etanolo da mais e canna da zucchero [3]

	Mais		**Canna da zucchero**[a]	
	US$/kg di etanolo	% del costo totale di produzione	US$/kg di etanolo	% del costo totale di produzione
Mais o canna da zucchero	0,26	58,4	0,15	67,7
Altre materie prime	0,03	7,5	-	-
Vapore	0,04	9,4	0,0[b]	0,0[b]
Altri servizi (elettricità, gas naturale, acqua di raffreddamento)	0,04	9,7	0,04	16,0
Manodopera e forniture (operazioni e manutenzione dell'impianto)	0,02	4,3	0,01	3,6
Capitale	0,04	8,7	0,02	9,4
Altro (assicurazione e amministrazione)	0,01	2,1	0,01	3,3
Costo totale di produzione	0,45		0,22	
Vendita del coprodotto	-0,10			
Costo netto di produzione	0,35			

[a] Non sono inclusi i ricavi dell'elettricità prodotta dalla combustione della bagassa

[b] Il vapore è prodotto dalla bagassa bruciata nell'impianto

Infine per quanto riguarda la produzione annua di etanolo, negli USA è di circa 200000 ton/anno, ma può variare da poche migliaia fino a 1000000 ton/anno [3].

1.2 Idrogeno

Come alternativa ai comuni combustibili anche l'idrogeno gioca un ruolo importante [7]. Tra i diversi vantaggi che lo collocano in cima alla lista dei vettori energetici sostenibili ideali, ci sono :

- Impatto ambientale molto basso (viene anche ottenuta H_2O come sottoprodotto dopo l'uso);
- Le diverse fonti dalle quali si può ottenere sono tutte rinnovabili (acqua, materia organica, rifiuti organici);
- L'eccesso che viene prodotto si può immagazzinare ed usarlo quando necessario (ad esempio quando si ha elevata richiesta di energia elettrica) [1].

Inoltre il suo rendimento energetico è 2,75 volte più grande dei combustibili idrocarburici, ed è pari a 122 kJ/g. L'uso dell'idrogeno però non si ferma solo all'utilizzo come fonte di energia, ma anzi esso ad oggi è ampiamente utilizzato nel settore industriale per la produzione di chemicals (principalmente ammoniaca e metanolo [9]), per idrogenare gli oli, per lavorare l'acciaio e per desolforare la benzina nelle raffinerie. Dai dati si evince infatti che ogni anno in tutto il mondo vengono commercializzate circa 50 milioni di tonnellate di idrogeno con un aumento di richiesta del 10% ogni anno, mentre ci si aspetta che entro il 2025 almeno il 10% circa del mercato energetico mondiale sarà in mano all'idrogeno [7].

Ovviamente affinché l'idrogeno sia sostenibile e abbia un impatto minore sull'ambiente, anche i metodi di produzione e le fonti usate devono essere rinnovabili e sostenibili [4]. Ad oggi la maggior parte dell'idrogeno in commercio è ottenuto attraverso steam reforming e in piccole percentuali anche attraverso gassificazione del carbone ed elettrolisi dell'acqua. Questi percorsi di produzione non sono sostenibili in quanto usano fonti di energia non rinnovabili e per questo la produzione attraverso l'uso di materie prime come le biomasse risulta un ottimo spunto per il futuro per quanto riguarda la produzione di idrogeno [10]. In Figura 1.4 sono rappresentate le possibili vie di produzione partendo dalla biomassa.

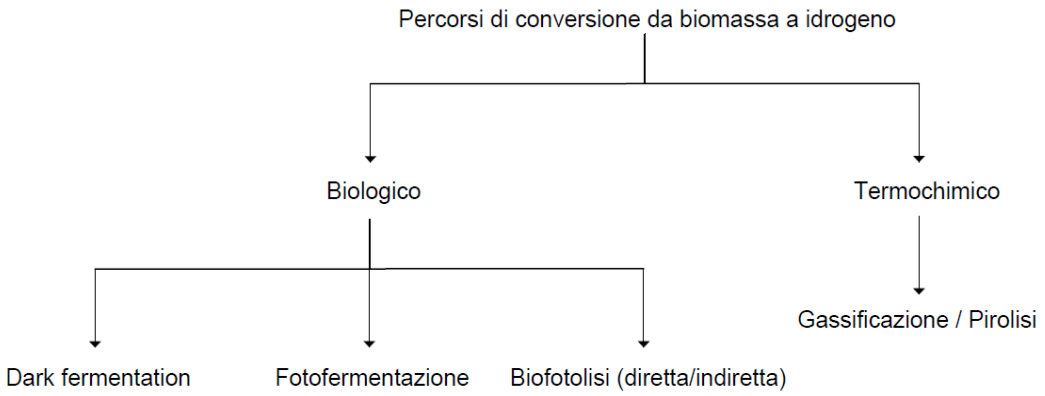


Figura 1.4 Percorsi di produzione di idrogeno dalla biomassa. Tratto da [11] con modifiche.

processi biologici per la produzione di bioidrogeno risultano essere energeticamente meno

intensivi rispetto ad altri processi [11] anche se la loro sostenibilità energetica è sempre stato un aspetto fondamentale da considerare [12].

1.2.1 Metodi di produzione idrogeno

Ad oggi, come già accennato, di tutto l'idrogeno usato a livello mondiale, la maggior parte è prodotto attraverso lo steam reforming del metano, processo che come detto prima non è sostenibile, e una piccola percentuale attraverso l'elettrolisi dell'acqua [1].

1.2.2 Steam reforming del metano

Per quando riguarda la reazione chimica complessiva del processo, questa è la seguente :

$$CH_4 + 2H_2O \rightarrow CO_2 + 4H_2$$

Nella Figura 1.5 è schematizzato l'intero processo, il quale viene suddiviso il 3 fasi distinte: reforming, water gas shift e rimozione della CO_2. Nella prima fase, che avviene a 900 °C su un catalizzatore a base nichel, il metano arriva dopo la desolforazione e viene miscelato con del vapore surriscaldato per dare luogo alla reazione (endotermica) seguente:

$$CH_4 + H_2O \rightarrow CO + 3H_2$$

Nella seconda fase si vuole convertire il monossido di carbonio e per farlo si sfruttano 2 diverse fasi, entrambe catalizzate : HTS ad alta temperatura e LTS a bassa temperatura. Nel primo convertitore ad alta temperatura si hanno condizioni pari a 310-450 °C e 100-8375 kPa, con catalizzatore di ossido di ferro (Fe_2O_3) e si raggiunge una conversione del monossido di carbonio pari al 94%. La temperatura in ingresso a questa sezione è controllata per evitare, causa l'esotermicità di questa reazione, l'aumento di temperatura sopra i 550 °C in uscita. A questo punto la piccola parte di CO non convertito viene fatto reagire nel secondo reattore (LTS) a temperature pari a 200-250 °C su ossido di rame (CuO). Il tutto può essere descritto dalla seguente reazione:

$$CO + H_2O \rightarrow CO_2 + H_2$$

Infine, tutto il flusso gassoso viene compresso a 35 atm, la CO_2 viene trattenuta in uno scrubber con monoetanolamina e si ottiene così idrogeno con una percentuale di CO_2 pari allo 0,1% in peso [3].

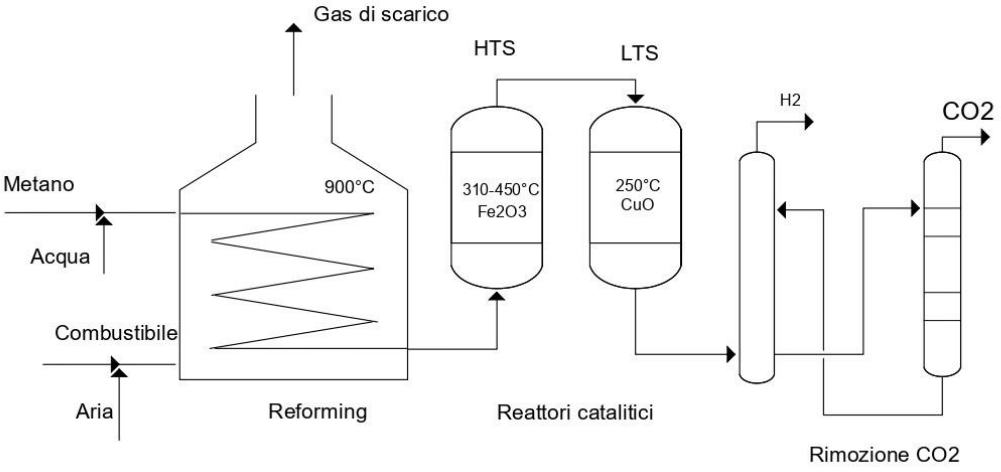


Figura 1.5 Produzione di idrogeno. Tratto da [3] con modifiche.

Secondo [13] tipicamente la produzione di idrogeno con questa tecnologia vanno da 10000 a 100000 Nm^3/h, mentre per applicazioni con celle a combustibile questa si abbassa fino a 5 – 1000 Nm^3/h. Per quanto riguarda i costi, l'influenza maggiore è data dal prezzo del combustibile e del vapore.

1.3 Bioidrogeno

Una delle alternative per la produzione di idrogeno gassoso è quella del bioidrogeno, utilizzando microrganismi anaerobici [7] e una vasta gamma di materie prime rinnovabili e a basso prezzo [1]. Durante le fermentazioni viene prodotto idrogeno in fase gassosa e acidi organici in fase liquida. Solitamente nella digestione anaerobica a due stadi, acidi organici e idrogeno vengono poi metabolizzati per produrre metano [7]. Di conseguenza la AD, a singolo o a due stadi, porta ad un basso tasso di produzione di bioidrogeno.

Per quanto riguarda la selezione delle materie prime da utilizzare nella produzione di bioidrogeno, ci sono alcuni criteri da tenere in considerazione:

- Disponibilità;
- Costo;
- Quantità di carboidrati presenti e biodegradabilità;
- Eventuale presenza di composti che possono inibire la crescita microbica;
- Umidità;
- Rapporto C/N.

Per esempio nei rifiuti agricoli sono abbondantemente presenti zuccheri semplici come il glucosio, il saccarosio e l'amido.

Ci sono diversi fattori che influenzano la produzione di idrogeno attraverso la fermentazione e ognuno di questi va ottimizzato in maniera tale da massimizzare la quantità prodotta, tra questi ci sono : l'inoculo, il substrato e la temperatura. Per quanto riguarda l'inoculo, ovviamente questo gioca un ruolo fondamentale in quanto i prodotti di una fermentazione dipendono dal metabolismo della biomassa presente. Uno dei principali attori di queste comunità microbiche, che possono essere considerate ubiquitarie, è il phylum Firmicutes, in particolare i microrganismi anaerobi appartenenti al genere *Clostridium*. Si possono usare per esempio colture pure oppure colture miste; una delle differenze tra i due casi sta nel fatto che nel primo, rilevare e prevedere i cambiamenti metabolici è più semplice rispetto al secondo nel quale ovviamente essendoci una diversità di specie questo non è facilmente rilevabile[11].

1.3.1 La Dark Fermentation

Nella più comune ed utilizzata digestione anaerobica, ci sono diversi tipi di batteri che producono idrogeno, anidride carbonica e metaboliti solubili in acqua come acidi organici (propionico, butirrico e acetico) ed etanolo convertendo il materiale organico che hanno a disposizione nel digestore. Osservando la Figura 1.6, dove sono rappresentati i percorsi metabolici, si vede come poi questi tipi di prodotti vengono metabolizzati da un'altra tipologia di microorganismi, gli archèi, che a differenza di quella precedente, consumano l'idrogeno e i metaboliti solubilizzati in acqua, dando come prodotti metano e CO_2 [14]. La dark fermentation invece è il percorso metabolico che esclude la metanogenesi attraverso la scelta di determinate condizioni operative e uno dei seguenti pre-trattamenti: acido, basico, shock termico, congelamento o scongelamento, al fine di inibire la bio-attività metanogenica in modo da avere come prodotti finali quelli citati prima, idrogeno, acidi organici ed etanolo. Il principale protagonista nella DF per la produzione di idrogeno sono

i *Clostridium spp*., ma per rendere più conveniente questo tipo di processo, si possono utilizzare anche microorganismi misti, come per esempio i fanghi attivi da cui i *Clostridium spp*. sono facilmente selezionabili [1]. Teoricamente dal glucosio si possono ottenere 12 moli di idrogeno per ogni mole di glucosio consumata (equazione sottostante), ma in natura non ci sono vie metaboliche che permettono di ottenere questi tipi di produzione a causa della crescita cellulare non possibile e dal fatto che è una reazione endoergonica (Δ_G_0 = 3,2 kJ/mol) [14] .

$$C_6H_{12}O_6 + 6H_2O \rightarrow 12H_2 + 6CO_2$$

Secondo [15] le moli di idrogeno ottenute in realtà, sono diverse in base al tipo di microrganismi e sono in generale pari a 2 per ogni mole di glucosio consumato per gli anaerobici facoltativi e 4 per gli strettamente anaerobici.

Per quanto riguarda quindi la produzione di idrogeno, la dark fermentation sembra essere la più promettente dati i suoi costi ridotti ed efficienza di produzione relativamente alta. Inoltre, un altro punto a suo favore è il fatto che si possono usare rifiuti organici dell'agricoltura o acqua di scarico come substrati e quindi essere utile anche allo smaltimento dei rifiuti. Tuttavia a livello di macro scala ci sono ancora diverse limitazioni soprattutto per quanto riguarda i rendimenti minori di produzione [14].

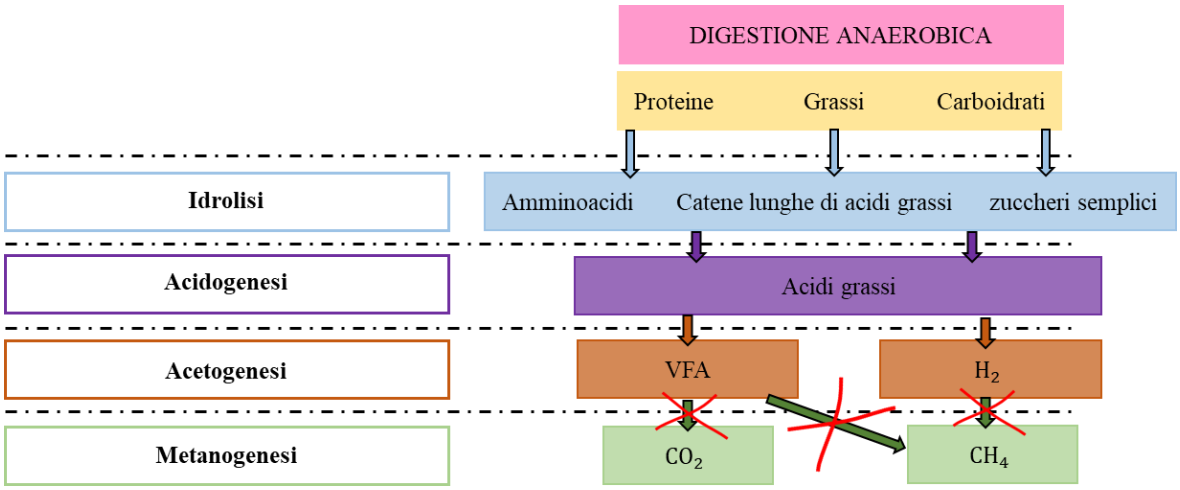


Figura 1.6 Panoramica della via metabolica che porta alla formazione di idrogeno nel processo di digestione anaerobica. Tratto da [14] con modifiche.

2 Le comunità microbiche

Nel primo capitolo si è parlato principalmente di due diversi prodotti di interesse mondiale e come questi vengono prodotti attraverso processi fermentativi ad opera di microrganismi. Ad oggi nel campo biotecnologico, molti prodotti chimici ed alimentari vengono ottenuti attraverso l'uso di coltivazioni sterili, utilizzando principalmente monocolture, questo perché in generale, come già accennato precedentemente, le dinamiche delle comunità microbiche essendo influenzate da interazioni specie-specie e specie-ambiente, con metabolismi più complessi da studiare e quindi da poter sfruttare a proprio piacimento, sono molto più articolate e difficili da controllare. Ad oggi, i processi già citati come la Digestione Anaerobica (AD) e la Dark Fermentation (DF) sfruttano le comunità microbiche per la produzione di biometano e bioidrogeno rispettivamente. Riuscire a comprendere maggiormente le interazioni tra le diverse e possibili comunità microbiche potrebbe portare a migliorare gli attuali processi di produzione, sviluppando ulteriormente le attuali tipologie di bioprocessi [16].

2.1 Colture miste VS monocolture

Ad oggi i processi biotecnologici su scala industriale che sfruttano le colture miste sono quelli utilizzati per il trattamento biologico delle acque reflue o dei rifiuti, in condizioni aerobiche (nel caso dei fanghi attivi) o anaerobiche (digestione anaerobica). Nello specifico, quest'ultima sfrutta il trattamento dei rifiuti per produrre un carrier energetico, il biogas (metano), attraverso la degradazione della materia organica presente. Queste colture miste possono essere sfruttate anche per la produzione di sostanze chimiche e di un altro importantissimo carrier in ottica futura, l'idrogeno.

Sono maggiormente presenti invece i processi industriali che sfruttano le colture pure, infatti queste vengono attualmente utilizzate per esempio per la produzione di bioetanolo e acido lattico. I processi che sfruttano colture miste, confrontati con quelli a colture pure, hanno diversi vantaggi, tra cui :

- Sterilizzazione delle linee di processo non necessarie;
- Opportunità di sfruttamento di rifiuti solidi come substrato;
- Costi bassi per la preparazione dell'inoculo;
- Anche la pre-coltivazione dell'inoculo non ha bisogno di condizioni sterili [3].

Uno dei fattori che rende così interessanti le colture miste, è la possibilità di utilizzare un mix di substrati e questo grazie alla presenza di diverse tipologie di specie microbiche che data la loro coesistenza nello stesso ambiente possono metabolizzare tipologie diverse di substrato attraverso magari diversi passaggi, ognuno eseguito da una o più tipologie presenti, per arrivare poi alla fine alla conversione del substrato nel prodotto desiderato. Tutto questo infatti è quello che avviene nel trattamento aerobico delle acque reflue e nella digestione anaerobica. Molto interessanti sono i prodotti intermedi della digestione anaerobica, etanolo, acidi organici e l'idrogeno, i quali nella digestione anaerobica vengono convertiti a metano [3].

2.2 Fermentazione delle biomasse organiche

Proprio questi prodotti di interesse, etanolo, acidi organici (acetico, lattico e butirrico principalmente) e idrogeno, potrebbero essere prodotti dalla fermentazione anaerobica di biomassa organica utilizzando colture miste. In Figura 2.1 sono riportati diversi percorsi che portano a questi prodotti, in base alla natura della biomassa di partenza. Riguardo gli acidi organici, oltre ai principali sopracitati, possono essere prodotti anche acido formico, acido propionico e acido succinico.

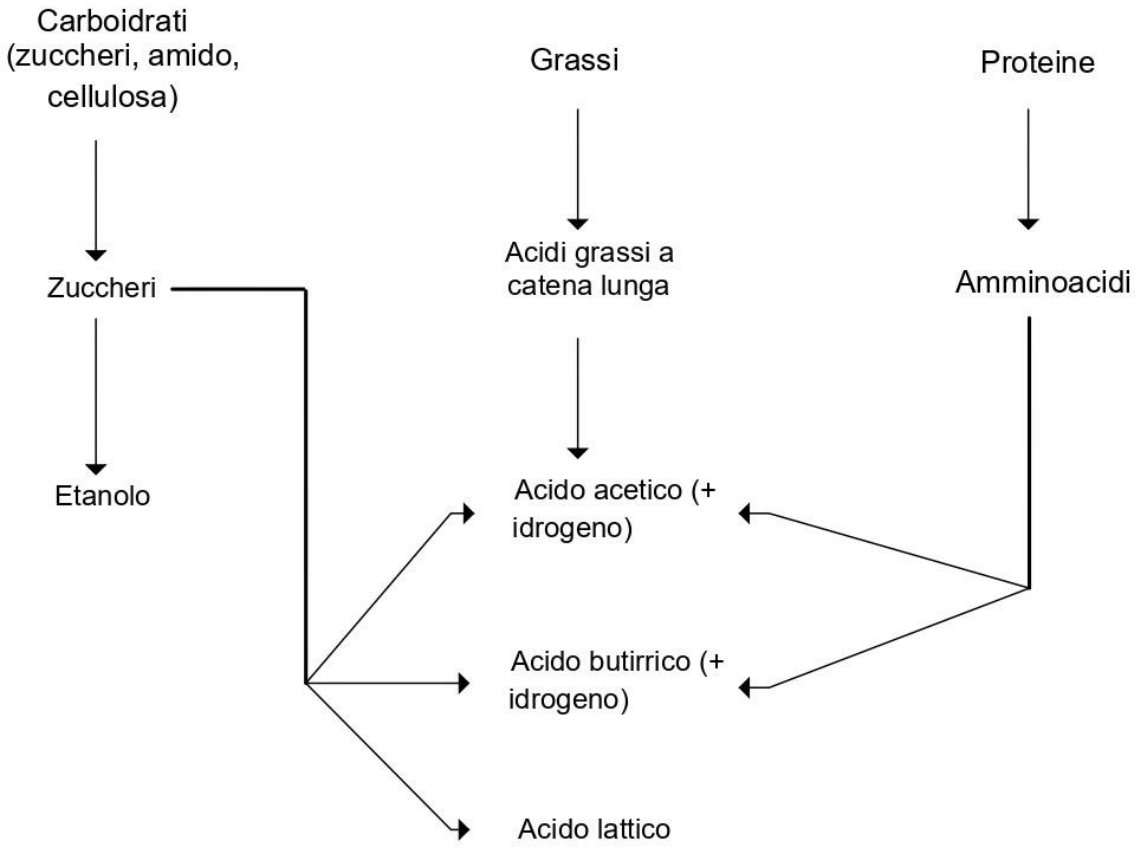


Figura 2.1 Esempi di prodotti da fermentazione anaerobica di materia organica. Mostrati solo i principali prodotti. L'idrogeno è riportato tra parentesi perché è prodotto contemporaneamente agli acidi organici dagli zuccheri o dalle catene di acidi grassi, ma non necessariamente dagli aminoacidi.

Tutte queste specie possono essere tranquillamente ulteriormente metabolizzate per produrre metano, quindi se l'obiettivo finale è quello di ottenere questi prodotti intermedi, la via metanogenica va inibita. Riguardo la Figura 2.1 e quindi riguardo le diverse tipologie di substrato, queste possono essere divise principalmente in 3 macrogruppi: carboidrati, grassi e proteine, e in base ovviamente alla biomassa di partenza, la natura del prodotto è differente. Per esempio i carboidrati possono essere presenti come monosaccaridi (zuccheri) o polisaccaridi (cellulosa e amido) e qui entra in gioco il discorso accennato nel paragrafo precedente e cioè quello in cui alcune tipologie di microrganismi presenti compiono una specifica azione piuttosto che un'altra, che nel caso in cui sia presente un polisaccaride, questo viene idrolizzato in zuccheri più semplice grazie alla presenza di enzimi prodotti direttamente dai microrganismi.

Di seguito è riportato un esempio di fermentazione di carboidrati in presenza di coltura mista :

$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$

(Produzione di Etanolo)

$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$

(Produzione di Acido acetico)

$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$

(Produzione di Acido butirrico)

$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHOHCOOH$

(Produzione di Acido lattico)

Tra le specie batteriche capaci di metabolizzare i carboidrati in acidi organici, etanolo e idrogeno, ci sono gli *Escherichia coli*.

Per quando riguarda le proteine invece, sostanze organiche ad alto peso molecolare contenenti zolfo e azoto, devono essere idrolizzate in amminoacidi prima di poter essere metabolizzate. Da quest'ultimi si ottengono in genere acido acetico e butirrico, come riportato nelle seguenti equazioni :

$C_2H_5O_2N + H_2 \rightarrow 2CH_3COOH + NH_3$

(Glicina ad Acido acetico)

$C_3H_7O_2N + 2H_2O \rightarrow CH_3COOH + NH_3 + CO_2 + 2H_2$

(Alanina ad Acido acetico)

$C_5H_9O_4N + H_2O \rightarrow CH_3COOH + 0{,}5CH_3CH_2CH_2COOH + NH_3 + CO_2$

(Glicina ad Acido acetico e butirrico) [3]

Dalle seguenti reazioni si vede come l'idrogeno può essere prodotto o consumato dagli amminoacidi.

Soffermandoci sui lipidi invece, questi sono una combinazione di acidi grassi a catena lunga e glicerolo e hanno un alto peso molecolare. Anche loro per essere metabolizzati devono necessariamente essere idrolizzati nei corrispettivi monomeri, acidi grassi e glicerolo. Di seguito sono riportati due esempi, di cui uno riguardante la conversione in condizioni anaerobiche degli acidi grassi a catena lunga in acido acetico e idrogeno, che avviene attraverso una sequenza di reazioni chiamate beta-ossidazione.

$C_{18}H_{34}O_2 + 16H_2O \rightarrow 9CH_3COOH + 15H_2$

(Acido oleico ad Acido acetico)

$C_{16}H_{32}O_2 + 14H_2O \rightarrow 8CH_3COOH + 14H_2$

(Acido palmitico ad Acido acetico)

Una particolarità importante di queste stechiometrie è che non generano CO_2, il che significa che tutto il carbonio presente nel substrato, durante la digestione anaerobica viene convertito in prodotti utili e inoltre con gli acidi grassi si ha un elevata resa in idrogeno, infatti nel caso dell'acido palmitico, circa il 10% della sua massa viene trasformato in idrogeno e questo valore è più alto di 6 punti percentuali rispetto all'idrogeno che si ottiene dalla fermentazione del glucosio (fermentato ad acido acetico).

Tutto ciò che è stato descritto sopra ci fa capire come da un lato sia fondamentale conoscere la natura chimica del substrato in quanto da essa dipendono fortemente i tipi di prodotto e le stechiometrie e dall'altro come sia possibile ottenere una vasta gamma di prodotti finali, che sono quelli intermedi nella digestione anaerobica.

In ambiente anaerobico e in presenza colture miste, altri tipi di reazione possono avvenire, come la conversione di acido butirrico in acido acetico (acetogenesi):

$CH_3CH_2CH_2COOH + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2H_2$

Oppure l'etanolo in acido acetico :

$CH_3CH_2OH + H_2O \rightarrow CH_3COOH + 2H_2$

Infine l'ultima reazione possibile in condizione anaerobiche è quella della conversione dell'acido acetico e dell'idrogeno in metano, reazione che però è indesiderata e va inibita se si vogliono ottenere tutta la serie di prodotti intermedi sopradescritti :

$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$

$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$ [3]

2.2.1 Fonti di biomassa organica per la fermentazione

Si è visto come la composizione della biomassa è fondamentale in quanto influenza i prodotti e la stechiometria della reazione. Sicuramente la scelta più ecologica per quanta riguarda il substrato nella fermentazione anaerobica con colture miste, in etanolo, acidi organici e idrogeno ricade sui rifiuti organici biodegradabili. In Tabella 2.1 sono riportati alcuni esempi di rifiuti organici biodegradabili.

	Produzione (milioni di tonnellate per anno)	Massa secca (% della massa totale)	Composizione (% di massa secca)						Riferimenti
			Lignina	Carboidrati			Proteine	Grassi	
				Cellulosa ed emicellulosa	Amido	Zuccheri			
Residui dei campi coltivati - paglia di riso, paglia di grano, steli di mais	1500 [2]	20 - 40	10 - 20	60 - 80					
Residui di legno della silvicoltura (campo e lavorazione)	155 [2]	50 - 90	20 - 30	50 - 70					
Rifiuti solidi urbani	1300 [3]	17 - 37	8 - 26 [a]		10 - 19	1 - 10	10 - 18	10 - 18	
Letame di bovini e suini	1100 [4]	3 - 12	3 - 10	15 - 45	10 - 30 [b]		13 - 29	3 - 12	
Rifiuti di frutta e verdura	58 [1]	10 - 35	1 - 30	8 - 50		6 - 64	7 - 24	1 - 11	
Acque reflue del frantoio	8 [5]	7 - 25				40	10	1	
Grani esauriti del birrificio	5 [6]	20	7 - 28	40 - 60			6 - 24	2 - 10	
Siero di latte	160 [3]	6 - 7				70	10 - 15		
Fanghi di depurazione [7]	1,5 (come solidi secchi)	-	9 - 14	18 - 49		0 - 2	13 - 20	5 - 10	

[a] Somma di lignina, cellulosa ed emicellulosa

[b] Somma di amido e zuccheri

[1] India, Cina, Filippine, Malesia, Tailandia e USA; [2] Asia; [3] A livello mondiale; [4] UE; [5] Regione Mediterranea; [6] UE e Brasile; [7] UK

Tabella 2.1 Esempi di produzione e composizione di rifiuti organici. Tratto da [3] con modifiche.

Rifiuti come paglia di riso e paglia di mais sono composti principalmente da lignina e cellulosa e sono tra i rifiuti più altamente prodotti. L'uso dei substrati lignocellulosici per la fermentazione anaerobica, nonostante sia considerata molto lenta, è una tipologia di biomassa molto interessante per i grandi volumi prodotti e per il fatto che la fermentazione dei carboidrati può avere come prodotto l'etanolo che tra i prodotti della fermentazione anaerobica (idrogeno, etanolo ed acidi organici), non considerando il metano, è la sostanza più prodotta al mondo in termini di quantità. Anche i rifiuti solidi urbani sono una fonte di materia organica prodotta in elevate quantità e per quanto riguarda la loro composizione chimica, questa è molto varia e quindi può portare ad un numero di prodotti intermedi della digestione anaerobica più elevato. Alcuni di questi rifiuti vengono già utilizzati a livello industriale, infatti per esempio molti rifiuti organici biodegradabili sono utilizzati nei digestori anaerobici per la produzione di metano e la frazione organica dei rifiuti solidi urbani viene utilizzata per produrre compost. Dall'altra parte invece, nonostante le tecnologie presenti e il potenziale uso, una buona frazione di rifiuti organici viene inviata in discarica. Per esempio in Scozia, dei 2 milioni di tonnellate all'anno di rifiuti solidi urbani che vengono depositati in discarica, il 63 % circa è biodegradabile [3].

2.2.1.1 Analisi economica

È possibile fare un confronto economico semplice, ma sicuramente non esaustivo, tra le due principali possibilità della fermentazione anaerobica : produzione di etanolo, acidi organici e idrogeno oppure produzione di metano. La seguente analisi è basata esclusivamente sui ricavi ottenuti dai singoli prodotti, senza considerare i costi del processo, utilizzando i prezzi riportati nella Tabella 1 ai quali va aggiunto il prezzo di mercato del metano che qui viene preso pari a 0,17 US$/kg [3]. Per avere un confronto paragonabile, viene preso il glucosio come substrato comune e di seguito sono riportate le stechiometrie della conversione a metano e di quella del glucosio in etanolo, acido acetico e idrogeno (supponendo che il 50 % del glucosio sia usato per l'etanolo e il 50 % per l'acido acetico (e quindi idrogeno) :

$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3CH_4 + 3CO_2$

$C_6H_{12}O_6 + H_2O \rightarrow CH_3CH_2OH + CH_3COOH + 2H_2 + 2CO_2$

La prima genera un valore del prodotto pari a 45 US$/1000 kg di glucosio mentre la seconda circa 600 US$/1000 kg di glucosio e quindi un guadagno nettamente maggiore che può essere spiegato dal fatto che sostante chimiche come etanolo, acido acetico e idrogeno sono utilizzabili in molti più settori rispetto al metano. Quest'ultimo infatti viene utilizzato solamente per la produzione di energia, a differenza degli altri 3 che vengono sfruttati sia come prodotti chimici sia come vettori energetici. Ovviamente se in futuro la quantità di questi ultimi, prodotti però attraverso la fermentazione, aumenterà, sicuramente il prezzo sarà minore e quindi di conseguenza anche il guadagno.

2.2.2 Possibile processo di coltura mista per la produzione di etanolo, idrogeno e acidi organici da risorse rinnovabili e confronto critico con i processi attuali

In questa sezione si vuole mostrare un possibile schema di processo (Figura 2.2) proposto da [3] per la contemporanea produzione di etanolo, idrogeno e acidi organici utilizzando rifiuti organici biodegradabili come substrato.

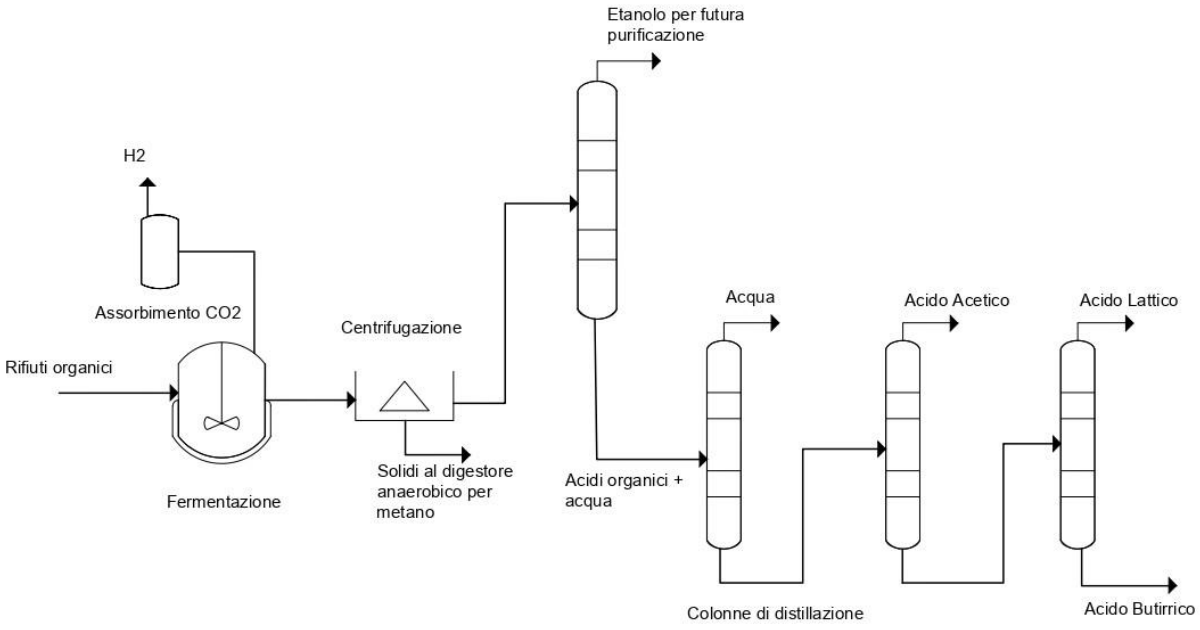


Figura 2.2 Schema di processo ipotizzato per la produzione simultanea di etanolo, acidi organici e idrogeno da rifiuti organici. Tratto da [3] con modifiche.

Quello che si fa ovviamente è controllare la fermentazione dei rifiuti organici nel reattore anaerobico in modo da produrre gli intermedi e non arrivare fino alla produzione di metano. La fase gassosa sarà costituita da idrogeno e anidride carbonica, quest'ultima sarà separata con processi convenzionali di assorbimento e l'idrogeno ottenuto può essere ovviamente utilizzato o come prodotto chimico o come combustibile. Il fermentato è sottoposto ad una separazione solido-liquido in cui la prima fase contiene i microrganismi prodotti e tutti quei solidi che non hanno idrolizzato, mentre la seconda è costituita da acqua, etanolo e acidi organici. I solidi ottenuti dalla separazione possono essere mandati in un ulteriore stadio di fermentazione per ottenere metano, mentre la fase liquida va mandata in uno step di distillazione al fine di per separare i diversi elementi presenti. Tutto questo teoricamente è possibile in quando a pressione atmosferica le diverse specie presenti hanno punti di ebollizione diversi e pari a 78, 100, 118, 122,e 163 °C per etanolo, acqua, acido acetico, lattico e butirrico rispettivamente. Una cosa molto interessante che si può osservare è che dei prodotti ottenuti in Figura 2.2, oltre alla possibile vendita dell'etanolo, data la sua alta richiesta mondiale, due si essi (idrogeno e acido acetico) sono molto utilizzati nell'industria chimica e quindi con un processo di questo tipo si avrebbe la possibilità, tra le varie possibili, di integrarla con un impianto chimico convenzionale per la produzione di fertilizzanti (idrogeno) e plastiche (acido acetico), con il grande vantaggio che la materia prima non deriva più da combustibili fossili, bensì da rifiuti organici. In base al processo in Figura 2.2 e ad alcuni dati in letterature sull'uso delle colture miste per la produzione di idrogeno, acidi organi ed etanolo, [3] ha riportato una serie di vantaggi e svantaggi rispetto al metodo classico di produzione:

• *Materia prima*: Sicuramente il fatto che la materia prima utilizzata per produrre idrogeno, acido acetico, acido butirrico non derivi da petrolio e gas come nei processi convenzionali, è un enorme punto a favore della produzione con colture miste. Inoltre, si migliora anche il discorso dello smaltimento dei rifiuti. In questo modo quindi le riserve di

combustibili fossili non verrebbero depauperate ulteriormente e non si influenzerebbe l'aumento dell'anidride carbonica nell'atmosfera. Invece riguardo l'etanolo, rispetto all'attuale metodo di produzione, si eviterebbe la competizione cibo – carburante soprattutto nei casi in cui le coltivazioni di canna da zucchero e mais vengono dedicate solamente per produrre substrato;

• *Condizioni di processo*: Le produzioni convenzionali utilizzano alta temperatura (per l'idrogeno per esempio si arriva fino a 900 °C) e alta pressione (fino a 60 atm per l'acido acetico), mentre le condizioni che ci sarebbero nei processi di fermentazione con colture miste sono molto più blande risparmiando così sui costi energetici (e quindi consumando meno combustibile non rinnovabile) e su quelli dei materiali utilizzati per la costruzione dell'intero processo;

• *Tassi di produzione*: Questo è uno degli svantaggi delle colture miste. Infatti per esempio, considerando la produzione di etanolo come riferimento, sono stati riportati tassi di produzione molto più elevanti nel caso di colture pure, con valori nell'intervallo 25-74 kg/m^3/giorno fino ad arrivare a 300 kg/m^3/giorno nel caso di configurazioni reattoristiche particolari. Valori più bassi sono stati riportati per colture miste;

• *Uso di metalli pesanti*: I metalli pesanti non sono rinnovabili e nei processi tradizionali vengono utilizzati catalizzatori a base nichel e rodio a differenza della fermentazione con coltura mista, la quale non richiedendo questo tipo di catalizzatori porta complessivamente ad un vantaggio economico ed ambientale;

• *Purezza dei prodotti di reazione*: Questo è uno degli svantaggi principali per le fermentazioni a coltura mista. Infatti, tutti i prodotti ottenuti in fase liquida dopo la fermentazione si trovano come miscela e non come prodotto puro. Questo comporta un necessario step di separazione a valle della fermentazione che è sicuramente più costoso e più impegnativo rispetto al caso di colture pure. Infatti anche in alcuni processi attuali come quello della produzione di acido acetico è necessario questo step è necessario e in quest'ultimo caso citato sono necessarie almeno due colonne di distillazione al fine di ottenere il prodotto desiderato, separato da acqua, sottoprodotti e ioduro di metile;

• *Fattibilità del bioprocesso integrato* : Una delle grandi possibilità che ha l'uso delle colture miste, è quello di ottenere i prodotti attraverso una conversione in un "singolo step" anche di substrati complessi, grazie alla presenza di diversi microrganismi ognuno responsabile di una determinata fase, assemblando all'interno del consorzio microbico adeguate capacità idrolitiche e fermentative. Differenti invece sono le colture pure, dove l'assemblaggio all'interno di un singolo chassis cellulare (ad esempio con tecniche genetiche) delle capacità richieste può essere molto impegnativo se non impossibile. Un caso in cui quest'ultima cosa accade e quello della produzione industriale di etanolo dal mais in sui si utilizzano *Saccharomyces Cerevisiae*. Proprio "a causa" di dell'utilizzo di questo singolo specifico lievito, il substrato necessita di diverse fasi di pre-trattamento al fine di idrolizzare l'amido in glucosio in quanto i S. Cerevisiae non sono in gradi di idrolizzare l'amido.

2.2.2.1 Considerazioni economiche ed ambientali

Anche in questo caso in maniera grossolana, possono esser fatte alcune considerazione economiche ed ambientali. Come detto nel Paragrafo 1.1.2 il fattore che influenza maggiormente il costo di produzione attuale è il prezzo della materia prima (60% per l'etanolo e 30% per l'acido acetico). Invece, nella fermentazione con colture miste, l'utilizzo di rifiuti come materia prima, comporta un costo nullo o molto basso (se si considerano i costi che si risparmierebbero nel non dover trattare i rifiuti). Inoltre, ad

aumentare la lista delle convenienze economiche, si aggiungono anche il non utilizzo dei catalizzatori e base di metalli nobili e l'assenza di sterilizzazione (la quale richiede alte temperature). Mentre un aspetto economicamente svantaggioso per le colture miste sono probabilmente i costi maggiori per quanto riguarda la separazione. A livello ambientale, sicuramente uno dei primi vantaggi sta nel fatto che fermentare con colture miste, utilizzando rifiuti organici, riduce drasticamente la quantità di rifiuti da smaltire in discarica. Inoltre l'utilizzo di questo tipo di substrato per produrre etanolo, by-passa il problema della competizione "*human food*". In conclusione quindi, un processo biologico come questo, che utilizza come materia prima risorse rinnovabili, almeno da questo punto di vista sarebbe più sostenibili dei processi di produzione tradizionali, considerando anche il non utilizzo dei metalli pesanti e l'uso di condizioni di processo molto più blande. Dall'altro lato però ci sono ancora problemi da risolvere come quello dell'utilizzo del digestato finale, i consumi legati ai processi di separazione e l'impatto ambientale che si avrebbe con il trasporto dei rifiuti.

3 Kefir d'acqua

Il kefir d'acqua (*water kefir*, WK) è una bevanda prodotta da fermentazione naturale, leggermente acida, frizzantina e alcune volte anche leggermente alcolica. Questo tipo di bevanda è simile al kefir di latte il quale viene prodotto tipicamente con latte bovino e grani di kefir di latte come inoculo, ma presentano alcune differenze, riportate in Tabella 3.1. Questa viene prodotta dalla fermentazione di una soluzione di saccarosio inoculata con grani di kefir d'acqua [17] i quali sono traslucidi, costituiti da una struttura pressoché fragile, sono insolubili in acqua e contengono circa il 14% di esopolisaccaridi (EPS) destrani [18]. Al sistema di fermentazione alcune volte viene aggiunto anche frutta secca [17] e la durata della fermentazione anaerobica è di 2-4 giorni, in certi casi anche 7-10 giorni. Durante questo processo i grani vengono lasciati fermentare per tutto il tempo fino alla fine della fermentazione, dove i grani vengono separati dal surnatante mediante setacciatura e successivamente riutilizzati per il successivo step di fermentazione attraverso una procedura chiamata *backslopping* [19]. L'inoculo utilizzato appunto sono i grani di kefir d'acqua i quali sono costituiti della matrice EPS, la quale incorpora una coltura simbiotica di batteri e lieviti. Durante la fermentazione, i microrganismi presenti nei grani, vengono rilasciati in fase acquosa, fornendo così l'inoculo per il brodo di saccarosio. I principali microrganismi presenti sono i batteri lattici, batteri acetici e lieviti, prevalentemente *Saccharomyces*. Ovviamente questa tipologia di batteri produce gli acidi corrispondenti e oltre a questo, i batteri dell'acido lattico sono ritenuti i responsabili della produzione della matrice di EPS da cui si forma il grano di kefir [17]. Questi microrganismi presenti metabolizzano il saccarosio facendo aumentare la massa dei grani di kefir grazie alla produzione di EPS e biomassa dei grani di kefir d'acqua, e ovviamente producono anche i metaboliti finali come etanolo (lieviti), anidride carbonica, acido lattico (LAB), acido acetico (LAB, lieviti e AAB) e diversi composti aromatici [19]. È stato visto che le specie predominanti all'interno dei grani dipende fortemente dall'origine geografica del grano, dal substrato e dalle condizioni di fermentazione e inoltre questi fattori sono importanti anche perché influenzano la bevanda prodotta sotto il punto di vista dell'aroma e del sapore [17].

Tabella 3.1 Confronto tra kefir d'acqua e kefir di latte. Tratto da [17] con modifiche.

Kefir d'acqua	**Kefir di latte**
Prodotto con grani di kefir d'acqua	Prodotto con kefir di latte
Il substrato principale è una soluzione di saccarosio a cui viene aggiunta frutta secca o estratti di frutta	Il substrato principale è il latte di un mammifero bovino, ad esempio latte di mucca o di capra
Una maggiore diversità di substrati può essere fermentata	La diversità in termini di diversi substrati che possono essere fermentati è inferiore
I grani sono trasparenti, mucillaginosi e meno resilienti	I grani sono bianchi o color crema e più resilienti
L'esopolisaccaride dei grani è principalmente composto da α-glucani	L'esopolisaccaride del grano è composto principalmente da kefiran
Specie di batteri dell'acido acetico più prevalente	Specie di batteri dell'acido acetico meno prevalenti
Le specie di lievito *Saccharomyces* sono dominanti	Le specie di lievito *Saccharomyces* sono una componente minore componente
Le specie batteriche *Lactococcus* sono raramente presenti	Le specie batteriche *Lactococcus* sono più dominanti

Specie di lievito Candida raramente presente	Specie di lievito Candida più probabilmente presente
Adatto ai consumatori che sono vegani o intolleranti al lattosio	Non molto consigliabile ai consumatori che sono vegani o intolleranti al lattosio

3.1 Produzione

In Figura 3.1 viene mostrato il processo più comune per la produzione di kefir d'acqua. Come già accennato, la fermentazione avviene spontaneamente, tra i 21 e i 30 °C anche fino a 10 giorni, i grani di kefir d'acqua vengono usati come inoculo in un mezzo di saccarosio con o senza aggiunta di frutta secca. I grani possono essere recuperati alla fine di ogni backslopping e riutilizzati idealmente infinite volte. Tipicamente questa bevanda è prodotta a livello domestico in condizioni minime o addirittura nulle di sterilità, utilizzando zucchero da tavola o zucchero di canna (saccarosio) come fonte di carbonio, mentre la frutta secca usata come fonte di azoto, non viene aggiunta sempre [17]. Nel caso in cui si volesse ridurre la crescita dei grani di kefir d'acqua durante la fermentazione, si può parzialmente sostituire il saccarosio con glucosio e/o fruttosio in quanto come già accennato in precedenza, il saccarosio è il responsabile della produzione di EPS [18]. Riguardo i parametri che vengono monitorati su scala di laboratorio o semi-industriale, tipicamente ci sono pH, solidi totali, acidità e concentrazione di zucchero residuo [17]. La fermentazione del kefir d'acqua viene effettuata di solito in condizioni aerobiche, ma può essere eseguita anche in condizioni anaerobiche. Nel primo caso, il fatto che sia presente ossigeno tende ad essere associato ad un arricchimento della cultura in AAB dopo diversi step di backslopping, il che porta ad un maggior titolo di acido acetico [18]. Nell'ultimo caso, quello anaerobico, il recipiente nel quale avviene la fermentazione è separato dall'ambiente circostante da chiusure che permettono il blocco dell'ossigeno in ingresso e il rilascio di anidride carbonica al fine di evitare un accumulo di pressione all'interno. Quindi il processo di fermentazione dei grani di kefir d'acqua avviene inizialmente in condizioni aerobiche e diventa gradualmente anaerobico in quanto l'ossigeno presente in partenza viene consumato e viene rilasciata la CO_2 prodotta [20].

A livello industriale ad oggi, solo piccole aziende producono kefir d'acqua, il quale viene venduto principalmente nei negozi di salute come integratore. Il motivo principale della limitata produzione su scala industriale è che il processo di fermentazione del kefir d'acqua è instabile e il prodotto che si ottiene, la bevanda, non ha una costanza a livello di qualità, ma è molto variabile. Oltre a questo fatto [19], c'è il problema della limitata crescita dei grani che può portare al blocco delle fasi di backslopping e allo scale-up del processo di produzione.

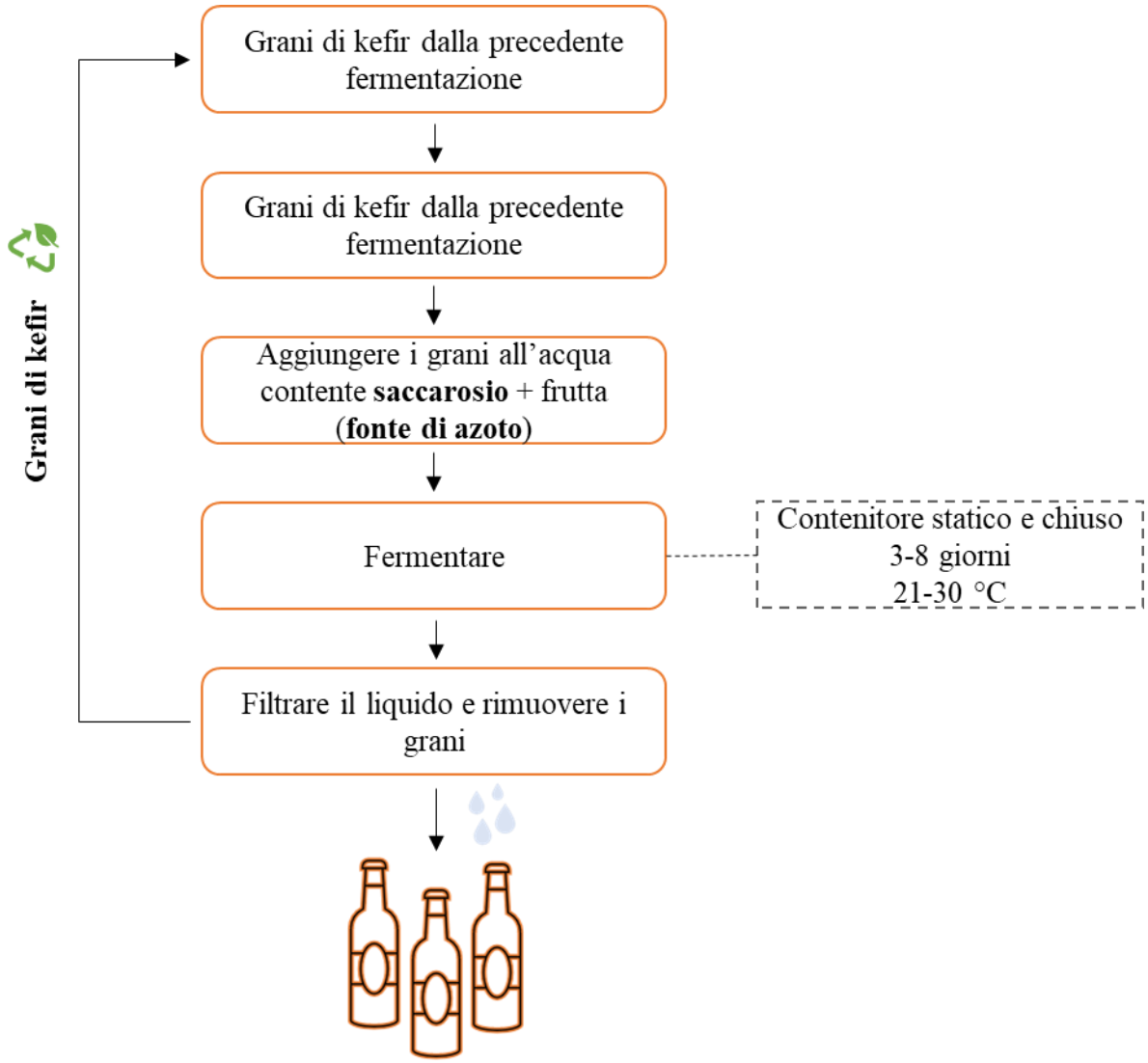


Figura 3.1 Fasi della produzione del kefir d'acqua tradizionale. Tratto da [17] con modifiche.

3.2 Substrati e fattori che influenzano le caratteristiche di fermentazione

I grani di kefir d'acqua hanno bisogno principalmente di due fonti durante la fermentazione : carbonio e azoto. In Figura 3.2 sono riportate le potenziali fonti, alternative al semplice saccarosio. Tra le diverse fonti rappresentate i fichi freschi o secchi sono quelli più comunemente utilizzati anche se non è chiaro il motivo di questa popolarità. Si è osservato però che la presenza di questi permette una fermentazione più ottimale rispetto all'utilizzo di altri frutti, mentre l'assenza dei fichi ha portato ad un rallentamento del consumo di glucosio e quindi del tasso di fermentazione. Riguardo il pH invece, un valore intorno a 3,0 – 3.6 ha come conseguenza un forte stress acido, il quale porta ad una bassissima crescita dei grani e ad una inibizione dell'attività dei LAB [17].

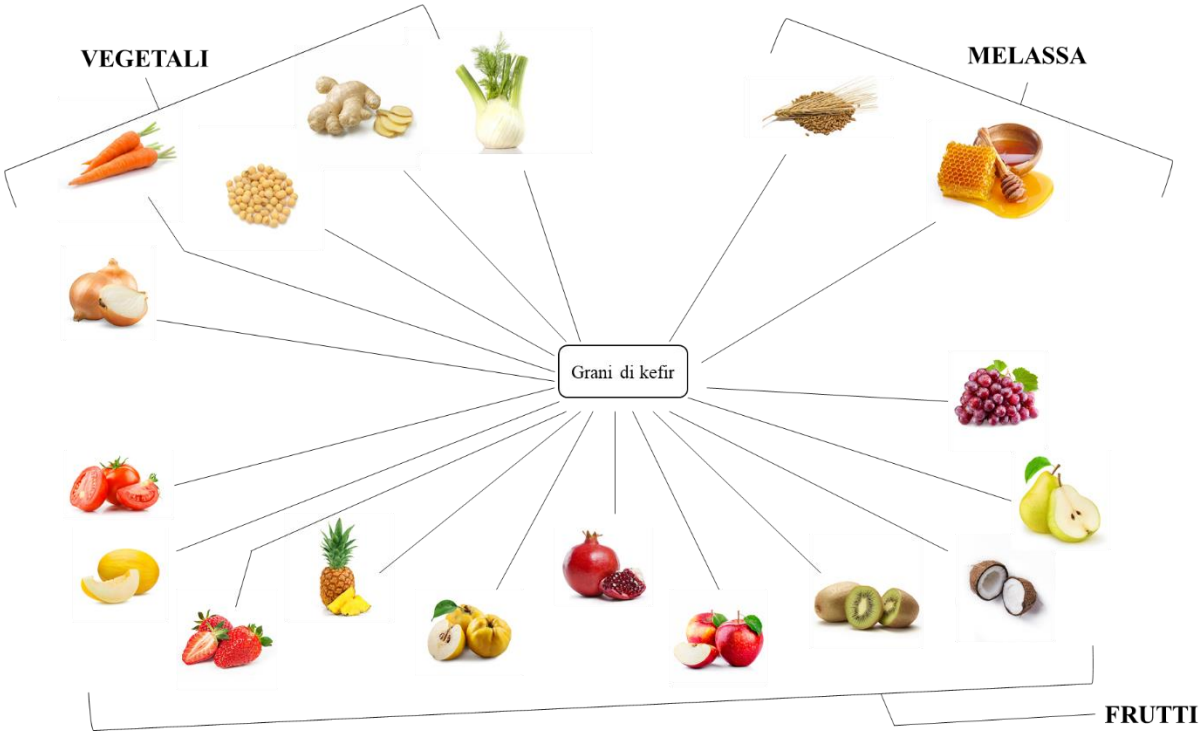


Figura 3.2 Alcuni substrati atipici che possono essere utilizzati nella preparazione del kefir d'acqua [17].

Un'altra cosa che è stata vista è che la presenza del calcio ha un importante effetto tampone e non a caso i fichi secchi hanno il più alto contenuto di calcio (Tabella 3.2). Quindi anche l'acqua da utilizzare deve avere una buona presenza di calcio e magnesio. Quindi in conclusione, il substrato utilizzato e l'origine dei grani (come già accennato in precedenza), possono avere una forte influenza sulla diversità dei ceppi dominanti presenti durante la fermentazione. Alte concentrazioni di nutrienti possono portare ad una proliferazione dei lieviti, in particolare di *Saccharomyces Cerevisiae*. Quindi, prima di iniziare con i diversi cicli di fermentazioni, bisogna considerare attentamente tutti questi aspetti in base al risultato finale che si vuole ottenere [17].

Tabella 3.2 Contenuto di calcio di vari potenziali substrati di kefir d'acqua [17].

Prodotto	Calcio (mg/100 g)
Fico, secco, non cotto	162
Fichi, crudi	35
Uvetta	50
Albicocca, secca, non cotta	55
Banana, cruda	5
Mela, cruda	6
Prugna, cruda	6
Patate crude con la buccia	30
Carote, crude	33
Succo d'uva, 100%	11

3.3 Diversità microbica

È stato sì osservato che le specie dominanti nei grani sembrano essere dipendenti dall'origine geografica di questi ultimi e dalla tipologia di substrato utilizzato, ma in tutti i casi i principali ceppi microbici dei grani di kefir d'acqua sono i batteri dell'acido lattico del genere *Lactobacillus*, batteri dell'acido acetico del genere *Acetobacter* e i lieviti del genere *Saccharomyces Cerevisiae* [17].

Purtroppo, gli studi effettuati sono ancora pochi e questo ci fa ipotizzare che la totale e vera diversità dei grani di kefir d'acqua e dei microrganismi all'interno, non è stata ancora ben studiata e caratterizzata [17].

3.3.1 Batteri dell'acido lattico

Da diversi studi trovati in letteratura, facendo riferimento a 17 di essi, in tutti, indipendentemente dall'origine geografica dei grani, sono state identificate specie del *Lactobacillus*, ma nessuna specie in particolare era predominante in tutti i grani studiati. Quelle identificate più di frequente sono state *Lb. hilgardii* (9/17 studi) e *Lb. nagelii* (8/17), seguite da *Lb. casei* (7/17) e *Lb. paracasei* (6/17). *Lb. hilgardii* e *Lb. nagelii* sembrano essere le specie chiave del genere *Lactobacillus* per i grani in quanto sono i maggior produttori di EPS. Altri Lattobacilli sono stati trovati, e tra questi ci sono *Lb. hordei* (5/17) e *Lb. satsumensis* (4/17). *Lb. hordei* sono stati rilevanti principalmente in grani Europei, mentre *Lb. satsumensis* in grani Brasiliani, Tedeschi e Belgi [17].

Nel gruppo dei LAB presenti nei grani di kefir d'acqua, sono stati trovati anche il genere *Leuconostoc* (7/17), in particolare le specie *Leuc. mesenteroides* e *Leuc. Citreum* e solo per la tipologia Belga anche i *Leuc. Pseudomesenteroides*. Occasionalmente sono stati trovati anche ceppi del genere *Bifidobacterium* e *Oenococcus* [17].

3.3.2 Batteri dell'acido acetico

Oltre ai LAB di cui si è parlato precedentemente, un'altra tipologia di batteri che è stata sempre rilevata nei grani di kefir d'acqua, sono i batteri dell'acido acetico (AAB), in particolare il genere *Acetobacter* (7/17). Le specie più rilevate sono state A. lovaniensis e A. fabarum, subito dopo A. orientalis e infine *A. tropicalis*, *A. indonesiensis* e *A. okenawensis* rilevati il minor numero di volte [17].

3.3.3 Altri batteri

Nonostante ciò che è stato scritto precedentemente, in alcuni studi condotti dallo stesso gruppo ma su diverse tipologie di kefir d'acqua per quanto riguarda l'origine geografica, il batterio dominante trovato è stato del genere *Zymomonas*, una tipologia aerotollerante anaerobo. Questa batterio è conosciuto per la sua produzione di etanolo in quantità teorica simile a quella della specie *Saccharomyces Cerevisiae*. Di questa tipologia di batterio, quello rilevato in maggior quantità è la specie *Zymomonas mobilis* [17].

3.3.4 Lieviti

Per quanto riguarda i lieviti, questi sembrano essere, in generale, in minor quantità rispetto ai batteri. Delle diverse specie esistenti, la più comunemente trovata nei diversi studi è stata quella della specie *Saccharomyces Cerevisiae*, mentre più raramente sono state identificate altre specie, tra cui *S. florentinus*, *S. pretoriensis*. Invece la specie *Brettanomyces* è stata la seconda più trovata, anche se essendo stata trovata sempre dallo

stesso gruppo di ricerca, c'è il rischio che questa percentuale di presenza sia falsata dalla mancanza di diversità geografiche studiate, come già accennato per i LAB [17].

In conclusione, sempre da letteratura è emerso che in generale i livelli microbici nei grani di kefir d'acqua sono pari a 10^8 *Lactobacilli*, da 10^6 a 10^8 *Acetobacter* e da 10^6 a 10^7 lieviti per grammo di granulo di kefir. Quindi principalmente sono presenti LAB, in quantità maggiori di 10 o 100 volte rispetto ai lieviti, seguiti da AAB in numero simile o leggermente inferiore in base alla presenza di ossigeno, come discusso precedentemente [17].

3.4 Interazioni metaboliche e metaboliti

In Figura 3.3 sono riportate le principali interazioni metaboliche tra la fase biotica del kefir d'acqua e il mezzo di fermentazione. Ovviamente qui sono raffigurate solamente le interazioni e i percorsi che sono ad oggi conosciuti, ma sicuramente ci saranno altri tipi di percorsi, così come altri tipi di prodotti, non ancora identificati e studiati. La chiave fondamentale per il metabolismo e la crescita dei grani di kefir d'acqua sono sicuramente la fonte di carbonio (tipicamente saccarosio o glucosio) e la fonte di azoto (tipicamente frutta fresca o secca), ma non meno importante, sono le interazioni trofiche e cooperative e lo scambio di metaboliti tra i diversi microrganismi dei grani.

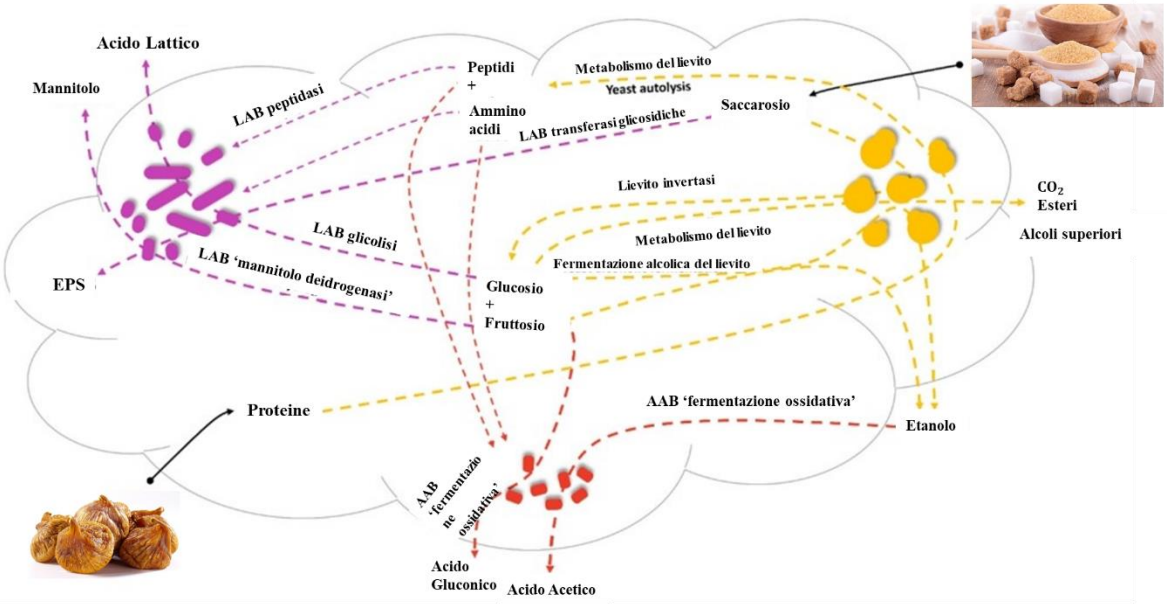


Figura 3.3 Metaboliti primari e interazione tra il microbiota del kefir d'acqua. Tratta da [17] con modifiche.

3.4.1 Il metabolismo del saccarosio e l'azione del lievito

Ipotizzando l'uso diretto del saccarosio e non del glucosio, le specie di lievito presenti (principalmente genere *Saccharomyces*) idrolizzano il saccarosio tramite un enzima, l'invertasi, scomponendolo in glucosio e fruttosio i quali poi possono essere più facilmente assunti dalla cellula. Il lievito attraverso questi monosaccaridi produce etanolo e anidride carbonica e rende ovviamente disponibile il resto dello zucchero ai batteri presenti [17].

Si è visto che tutte le specie LAB sono in grado di produrre acidi dal saccarosio il quale inoltre è il substrato utile alla produzione di destrano, un EPS (un esopolisaccaride α-glucano), principale componente della struttura dei grani di kefir [17].

3.5 Possibile scale-up della produzione di kefir d'acqua

Lo scale-up della produzione di kefir d'acqua è uno dei problemi che ha come conseguenza la limitazione alla produzione industriale di questa bevanda. Questo a causa di processi di fermentazione instabili con conseguente variabilità della bevanda risultante e spesso una bassa crescita dei grani di kefir. In letteratura si trova un solo studio riguardante la produzione a livello semi-industriale (6 litri). Questa presentava diversi problemi, tra cui l'instabilità di fermentazione, la limitata crescita dei grani i quali tra l'altro erano più piccoli e più danneggiati rispetto agli stessi fermentati a livello domestico. Veniva poi usata acqua demineralizzata, la quale essendo priva di ioni, mancava di effetto tampone e questo portava ad un livello di acidi prodotti inferiore a quello previsto, nonostante la diminuzione del pH. L'uso di questa acqua ha portato con se anche un altro problema, e cioè quello della mancanza di calcio (che, come detto in precedenza, si è visto avere un effetto tampone). Anche il glucosio residuo è risultato essere maggiore [17].

Nonostante questo però, la quantità e il rapporto dei lieviti e dei LAB era simile ai valori riportati nei paragrafi precedenti, mentre gli AAB erano maggiori in quanto la fermentazione avveniva in modo aerobico [17].

4 Spore forming bacteria

È stato visto che i batteri che appartengono al genere *Clostridium* sono i principali produttori di H_2. Questi sono anaerobi obbligati, Gram-positivi e hanno una forma caratteristica a bastone (Figura 4.1 (b)). I *Clostridium spp.* sono caratterizzati da particolari caratteristiche fisiologiche non molto diffusa in altre tipologie di batteri: sono in grado di subire il processo di sporulazione in condizioni di forte stress. Queste condizioni ambientali non favorevoli alla loro crescita batterica possono essere, alte temperature, presenza di ossigeno, congelamento, essiccazione, uso di solventi e molte altre. La formazione di spore induce profondi cambiamenti fisiologici che consentono loro di preservare le proprie informazioni genetiche sotto forma di spore resistenti che possono maturare nuovamente in cellule vegetative pienamente attive quando le condizioni ambientali ne favoriscono nuovamente la crescita. Questa tipologia di batteri che formano endospore, il loro ciclo vita può essere diviso essenzialmente in 2 fasi: cellule vegetative e (endo)spore. In uno studio effettuato da [2] durante una DF, essi hanno monitorato la morfologia della fase biotica attraverso la FC (citometria a flusso). Integrando i diagrammi di densità FSC/SSC con gli istogrammi corrispondenti è stata analizzata la morfologia di interesse e incrociando il tutto con le osservazioni tramite microscopia ottica è stata ottenuta la Figura 4.1 nella quale è rappresentata (a) la morfologia delle spore libere non ancora germinate, (b) le cellule vegetative caratterizzate dalla loro classica forma a bastone e (c) le endospore formate prima della lisi della membrana esterna (prima di essere rilasciate come spore libere).

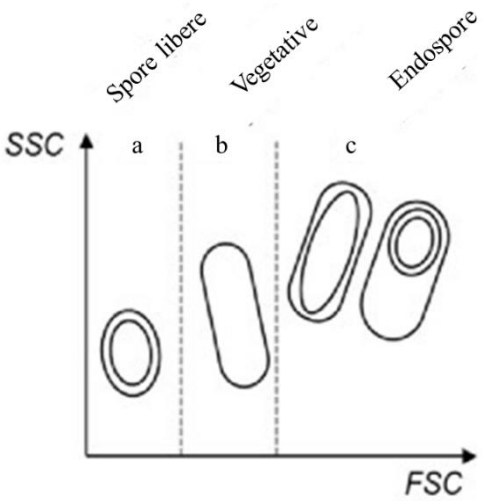


Figura 4.1 Analisi della cultura DF: accoppiamento di cluster virtuali (FC) e morfologie osservate. Tratto da [2] con modifiche.

Quest'ultime una volta che le condizioni ambientali tornano ad essere favorevoli alla vita, germinano nuovamente in cellule vegetative vive le quali possono riprendere a crescere e prosperare. Sempre per quanto riguarda le endospore, esse sono caratterizzate da una forte resistenza e dalla non facile distruzione anche in condizioni estremamente sfavorevoli, a differenza di quanto invece accade per i metanigeni (HCB), la cui resistenza allo shear stress e la tolleranza all'ossigeno è piuttosto bassa. Non appena poi si ritorna in condizioni favorevoli, in presenza di nutrienti e in condizioni anaerobiche, questi come già detto germinano e ripartono con i processi metabolici in modo da poter produrre idrogeno e altri prodotti metabolici.

Questi, chiamati HPB differiscono dagli HCB, i quali negli ambienti anaerobici producono metano attraverso la rimozione dell'idrogeno in eccesso e degli altri prodotti di fermentazione (per lo più acidi) e inoltre in presenza di condizioni sfavorevoli come l'aerobiosità essi muoiono. Le principali differenze tra HPB e HCB sono :

- I metanigeni hanno un intervallo ottimale di pH (circa 7-8) molto più ristretto rispetto agli HPB (circa 4,5-7);
- La cinetica di crescita degli HPC e molto più rapida degli HCB;
- Grazie alla formazione delle endospore, gli HPB possono resistere in condizioni non ottimali, cosa che invece non è possibile agli HCB [14].

In conclusione, dopo aver parlato di diverse tipologie di batteri e lieviti, in Figura 4.2 sono riportate diverse possibili vie metaboliche.

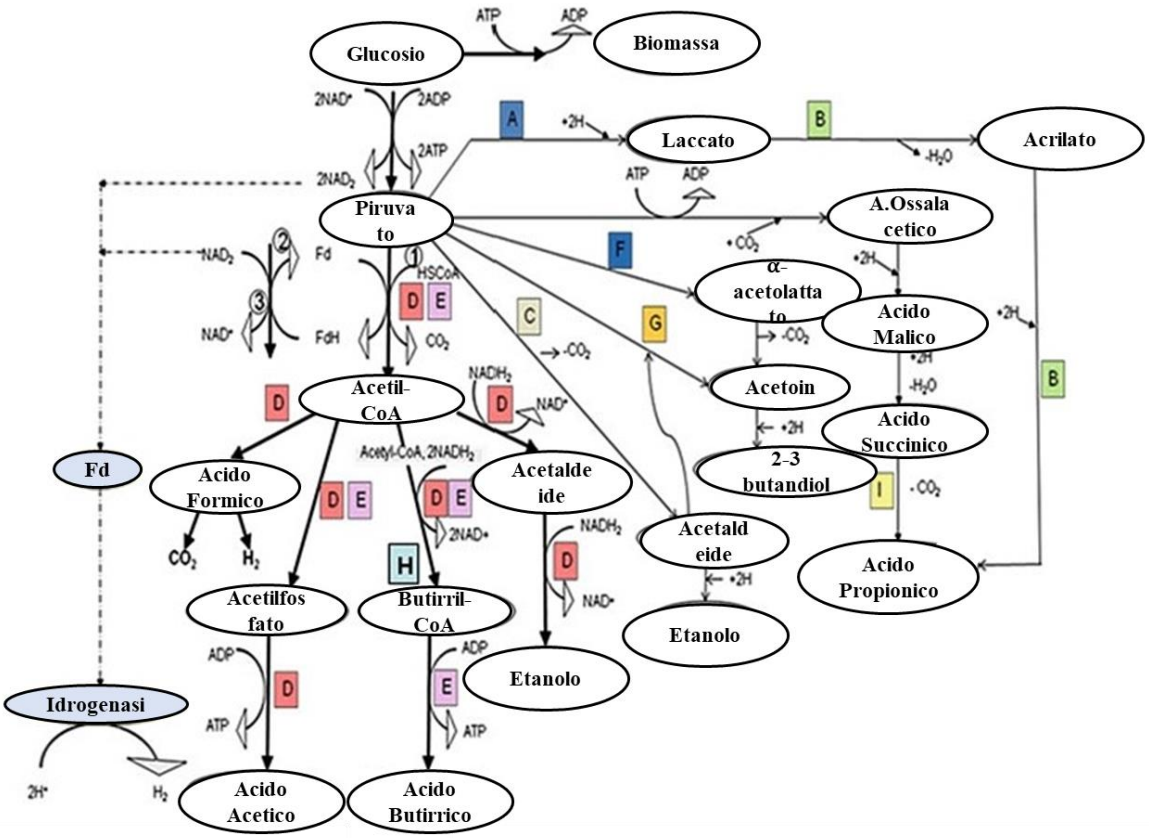


Figura 4.2 Via metabolica del glucosio da parte di HPB in condizioni anaerobiche. ① Piruvato ferredossina ossidoreduttasi (PFOR); ② Idrogenasi; ③ NADH ferredossina ossidoreduttasi. Le lettere indicano gli organismi che conducono queste reazioni come segue: A Batteri dell'acido lattico (*Streptococcus, Lactobacillus*); B *Clostridium propionicum*; C Lieviti, Acetobacter, *Zymomonas, Sarcina ventriculi, Erwinia amylovora*; D *Enterobacteriaceae* (coli-aerogeni); E, Clostridia; F *Aerobacter*; G Lievito; H Clostridia (organismi butirrici e butirrici); I Batteri dell'acido propionico. Tratto da [14] con modifiche.

PARTE 2: Fase sperimentale

5 Obiettivi, materiali e metodi, procedure sperimentali

Dopo una panoramica generale nella prima parte, utile per comprendere i diversi aspetti della fase sperimentale, da qui in avanti verranno presentati tutti gli aspetti di questa fase.

5.1 Obiettivi

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è in realtà un duplice obiettivo. La principale ipotesi di ricerca che motiva questo lavoro è la scansione di soluzioni biotecnologiche per la produzione di idrogeno, etanolo ed acidi organici alternativa ai loro attuali metodi di produzione. In particolare, viene data attenzione all'utilizzo di colture microbiche miste, testando la fattibilità di formulazioni di inoculi per fermentazioni industriali, partendo da una coltura indigena di kefir d'acqua (il cui uso primario storico sono state le fermentazioni casalinghe di probiotici) e dai Clostridium spp. (SFB) ottenuti dallo *slurry* del letame bovino. Sono state eseguite prove di fermentazione, atti a verificare l'effettiva efficacia del microbioma misto, utilizzando del pane raffermo come substrato. In particolare le diverse fasi di questo lavoro, prevedono :

- Ricerca delle condizioni di fermentazione per i grani di kefir d'acqua (WK) al fine di massimizza la quantità di microrganismi nel surnatante e monitorare, attraverso parametri di processo macroscopici, la riproducibilità dei diversi batch;
- Scelta del pre-trattamento da effettuare sullo slurry bovino, con l'obiettivo di selezionare solamente i batteri utili al fine della lavoro (per i spore-forming bacteria, SFB);
- Scelta del pre-trattamento da effettuare nel substrato (pane) attraverso il monitoraggio di diversi parametri come la spettroscopia UV/VIS e i gradi Brix, il tutto in aggiunta ad un'analisi di immagini attraverso la microscopia ottica;
- Prove sperimentali di fermentazione nell'unità AMPTS II (Bioprocess Control, Sweden AB). Queste prove sono state eseguite in condizioni anaerobiche; i sistemi sono stati inoculati con entrambi gli inoculi separatamente (WK e SFB) e insieme (WK+SFB) per determinare se c'è un effetto sinergico quando si combinano entrambi i consorzi microbici. Alla fine è stata analizzata la fase liquida per determinare la quantità di acidi organici ed etanolo prodotti.

5.2 Materiali e metodi analitici

In questa sezione verranno illustrati i diversi metodi analitici impiegati, con i rispettivi materiali utilizzati, al fine di comprendere meglio le prove sperimentali effettuate e contestualizzare i risultati ottenuti.

5.2.1 Misura di solidi volatili (VS) e solidi totali (TS)

La procedura per determinare i valori di TS e VS per un generico campione è stata eseguita secondo il Metodo Standard APHA - 1999 [21].

5.2.1.1 Misura solidi totali (TS)

Un campione di 5 mL viene prelevato, mediante cilindro graduato o siringa, in base al campione da prelevate, e viene inserito all'interno di un crogiolo di materiale refrattario (Figura 5.2 (b)) del quale si conosce la massa (tara, T), al fine di poter poi effettuare la misura. Il peso del crogiolo con all'interno il campione viene misurato attraverso una bilancia analitica (Figura 5.1) modello E42S (Gibertini Elettronica, Novate Milanese, Italia).

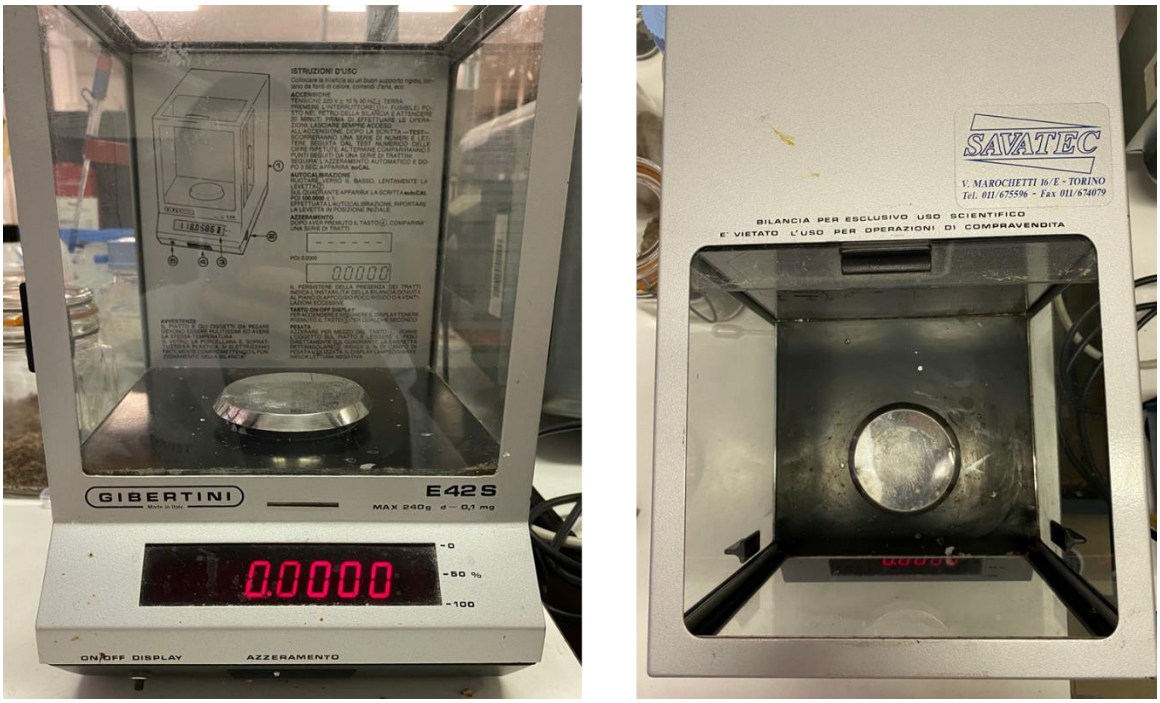


Figura 5.1 Fotografia della **b**ilancia analitica, modello E42S (Gibertini Elettronica, Novate Milanese, Italia).

Una volte registrate le misure , il tutto viene posto in stufa *Isco 9000* (Figura 5.2 (a)) alla temperatura di 105°C per 24 ore oppure fino al raggiungimento per il singolo crogiolo più il campione all'interno, di un peso costante. Una volta passate le 24 ore o arrivati ad un peso costante, il campione viene prelavato dalla stufa e inserito in un essiccatore per raffreddare (Figura 5.3); una volta raggiunta la temperatura ambiente, si passa nuovamente alla misura del campione e se ne prende la misura (P1). Infine si può calcolare la quantità di TS espressi in g/L :

$$TS\left[\frac{g}{L}\right] = \frac{P_1\,[g] - T\,[g]}{Volume\ del\ campione\ [mL]} * 1000$$

a b

Figura 5.3 (a) Fotografia della stufa modello Isco 1900 e (b) crogioli all'interno della stufa.

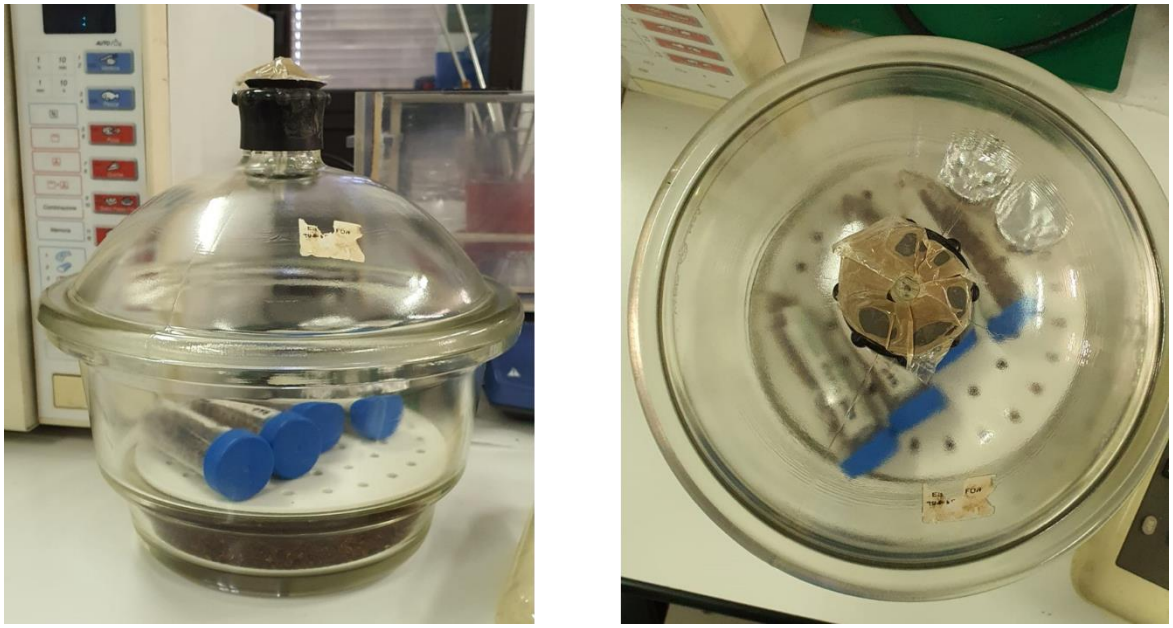


Figura 5.2 Fotografia dell'essiccatore da laboratorio.

5.2.1.2 Misura solidi volatili (VS)

Il campione quindi, una volta misurato per la determinazione dei solidi totali (TS), viene messo in muffola (Figura 5.4) per 6 ore alla temperatura di 550 °C al fine di valutare la quantità di solidi volatili e ceneri (VS). Anche in questo caso, il campione una volta prelevato dalla muffola viene posto in un essiccatore per raffreddare; una volta raggiunta la temperatura ambiente, il tutto viene nuovamente pesato, tramite la stessa bilancia analitica, e si misura così il valore P2. Si calcola quindi il valore dei VS espressi in g/L:

$$VS\left[\frac{g}{L}\right] = \frac{P_1\,[g] - P_2\,[g]}{Volume\ del\ campione\ [mL]} * 1000$$

Figura 5.4 Fotografia della muffola analitica.

5.2.2 Acidità titolabile

L'acidità titolabile (TA) è una misura dell'acidità totale come valore approssimativo. Significa che l'acidità titolabile fornisce la somma di protoni liberi e acidi non dissociati in una soluzione. Ma è un'approssimazione dell'acidità totale perché non può misurare tutte le specie acide nella soluzione e infatti questa viene espressa tramite solamente una specie. Per questo l'unità di misura di questo parametro è grammi equivalenti di una specie acida (A) di riferimento per litro (g_A_eq/L). Inoltre, questa acidità dà la concentrazione totale di protoni in una soluzione che può reagire con una base forte per neutralizzare la base.

La misura è effettuata nel seguente modo : si preleva una campione di 5 mL tramite cilindro graduato o siringa e si inserisce all'interno di una beuta insieme ad un quantitativo di acqua deionizzata pari a 25 mL (l'aggiunta di acqua serve solamente ad apprezzare meglio il viraggio di pH), infine vengono aggiunti anche 100 µL di Fenolftaleina (1 g/100 mL di etanolo al 60 % *v/v*). Una volta preparato il campione sul quale effettuare la misura, questo viene posto al di sotto di una buretta dal volume di 50 mL riempita con NaOH 0,1 N. A questo punto inizia la titolazione vera e propria, facendo cadere una goccia di NaOH per volta fino a quando tutto il campione ha cambiato colore. Questo accade in quando Fenolftaleina è un indicatore di pH in quanto si tratta di un composto alacromico, ovvero in grado di cambiare colore al verificarsi di determinate condizioni chimiche (in questo caso di pH). L'intervallo di viraggio, ovvero l'intervallo di pH in cui l'indicatore agisce e dunque cambia colore, è compreso tra 8,2 e 9,8. Questo significa che, una volta disciolta nella soluzione ideale, la Fenolftaleina rimane completamente incolore (quindi non si assiste ad alcun cambiamento) a valori inferiori ad un pH 8,2 mentre per valori superiori, inizia ad assume la classica colorazione porpora [22]. Una volta effettuate queste operazioni, il quantitativo di acido equivalente viene espresso nel seguente modo:

$$TA\left[\frac{g}{L}\right] = \frac{V_{NaOH} * N_{NaOH} * \ MM_{Acido}}{Volume\ del\ campione\ [ml]} * 1000$$

Dove :

- V_{NaOH} è la quantità utilizzata per ottenere il viraggio (mL);
- N_{NaOH} è la Normalità della base utilizzata (N);
- MM_{Acido} è la massa molare dell'acido sul quale si vuol far riferimento per la totale misura (g_A/mol);
- $Volume\ del\ campione$ è il volume prelevato del campione che si vuole analizzare (mL)

5.2.3 Gradi Brix (°Bx)

I gradi Brix vengono utilizzati per la misurazione del rapporto di peso dello zucchero (saccarosio e glucosio) e dell'acqua (o comunque il liquido in cui viene disciolto) nella quale è stata disciolta la data quantità di zucchero , in base alle diverse proprietà di rifrazione del mezzo di sospensione e del soluto [23]. La misurazione è stata effettuata con il rifrattometro mostrato in Figura 5.5 (a) (*LAISS,* Apparecchiature Scientifiche, Torino). Una soluzione cha ha come risultato per esempio 25 °Bx significa che è presente circa una quantità di zucchero pari a 25 g/L. Altre sostanze eventualmente presenti come l'etanolo, possono interferire con la misura.

La misura viene effettuata attraverso il posizionamento di una goccia sul prisma, sulla quale poi viene adagiato delicatamente il coperchio in modo che il liquido si espanda su tutta la superficie del prisma e infine tramite l'oculare si guarda la scala con la relativa misurazione (Figura 5.4 (b)).

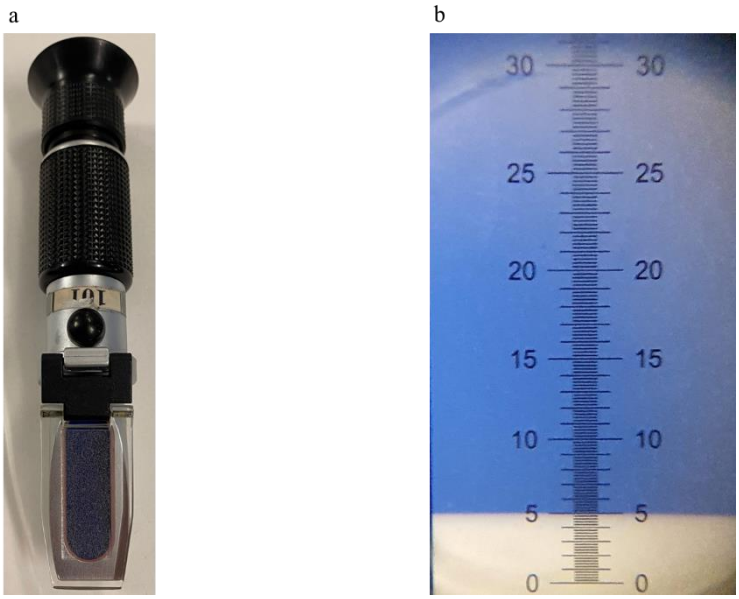


Figura 5.5 Fotografie di: (a) Refrattometro Laiss e (b) visualizzazione interna di una misura.

5.2.4 Conducibilità

La conducibilità elettrica (anche detta conduttanza elettrica) di un corpo misura la facilità con cui delle cariche elettriche riescono a scorrere all'interno di un materiale. Nel

sistema internazionale viene misurata come Siemens su metro (S/m), ma si può esprimere anche in ppm, i quali ci indicano la quantità di sostante presenti (approssimando a una specie di riferimento). La misura viene effettuata attraverso un apposito strumento (Figura 5.6) il quale una volta inserito all'interno del campione tal quale (circa 5 mL) mostra la misura sullo schermo.

Figura 5.6 Misuratore Conducibilità.

5.2.5 Misura di pH

La misura del pH è stata effettuata in 3 diversi modi, in base alla prova che si stava effettuando. Una, durante la fermentazione dei grani di kefir d'acqua nel *Minifors I* (Infors HT, Bottmingen, Svizzera), in continuo attraverso un misuratore esterno modello Steiel S503 (Didacta Italia Srl, Torino, Italia) mostrato in Figura 5.7 (a) e un elettrodo modello 405-DPAS-SC-K8S/225 (Mettler Toledo SpA, Novate Milanese, Italia). Per misure in discontinuo durante le prime fermentazioni dei grani nelle bottiglie da 500 mL, è stato utilizzato uno strumento portatile Figura 5.7 (b) il quale una volta inserito all'interno del campione tal quale (bastano circa 5 mL) mostra la misura sullo schermo. Sempre per misure in discontinuo, in questo caso durante la preparazione del substrato o per i brodi fermentati, è stato utilizzato un pH-metro modello Micro-pH 2001 (*Crison Instruments SA*, Barcellona, Spagna) mostrato in Figura 5.7 (c) con un elettrodo della casa *Hamilton* (Bonaduz, Svizzera).

Figura 5.7 Fotografie di: (a) pH-metro Steiel, (b) pH-metro portatile e (c) pH-metro Crison.

5.2.6 Misura del potenziale redox (ORP)

La misura del potenziale Red-Ox viene effettuata in continuo attraverso un misuratore Red-Ox modello M99220 (Infors HT, Bottmingen, Svizzera, FIGURA), mostrato in Figura 5.8, munito di elettrodo Pt4805-SC-DPAS-K8S/225 (Mettler Toledo SpA, Novate Milanese, Italia).

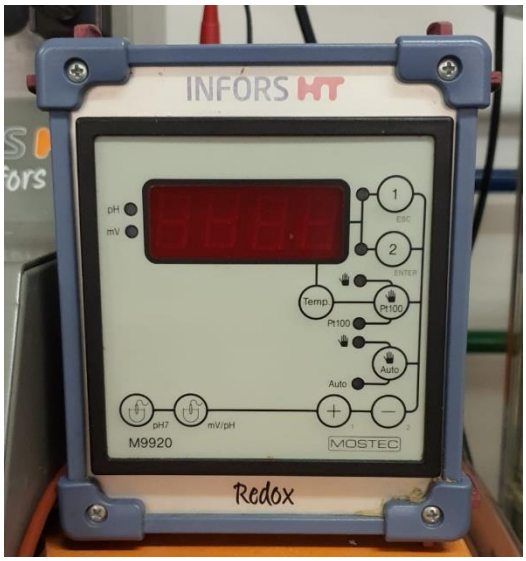


Figura 5.8 Fotografia del misuratore Red-Ox modello M99220.

5.2.7 Analisi dei brodi fermentati

Una volta finite le prove sperimentali di fermentazione nell' *AMPTS II*, i loro brodi sono stati analizzati tramite cromatografica liquida, attraverso un HPLC (*Kontron Instruments*, Figura 5.9) al fine di valutare le specie presenti al suo interno.

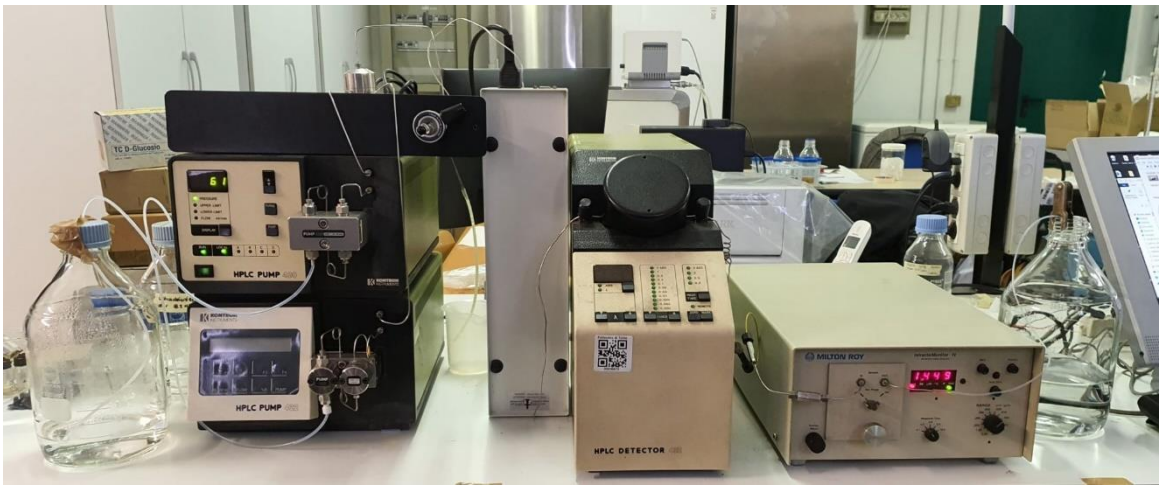


Figura 5.9 HPLC Kontron Instruments.

Una campione di brodo (8 mL) è stato prelevato da ognuno dei test, è stato centrifugato con una centrifuga modello *IEC CL30* (Figura 5.10 (a) e (b)) a 4000 rpm per 20 minuti. Il surnatante successivamente è stato filtrato con un filtro di Acetato di Cellulosa a 0,45 µm e infine diluito 1:1 con acqua deionizzata. L'eluizione isocratica è stata eseguita utilizzando una soluzione di H_2SO_4 5mM ad una velocità di 0,8 mL/min. Il campione da analizzare così ottenuto viene passato attraverso una Colonna Aminex HPX-87H inserita all'interno di un termostato *IGLOO 560* (Figura 5.10 (c)) a temperatura di 55 °C. Il segnale di risposta viene visualizzato attraverso un PC. La percentuale dei prodotti trovati, è stata

poi calcolata a seguito delle calibrazioni effettuate per i diversi prodotti t.q. a diverse concentrazioni.

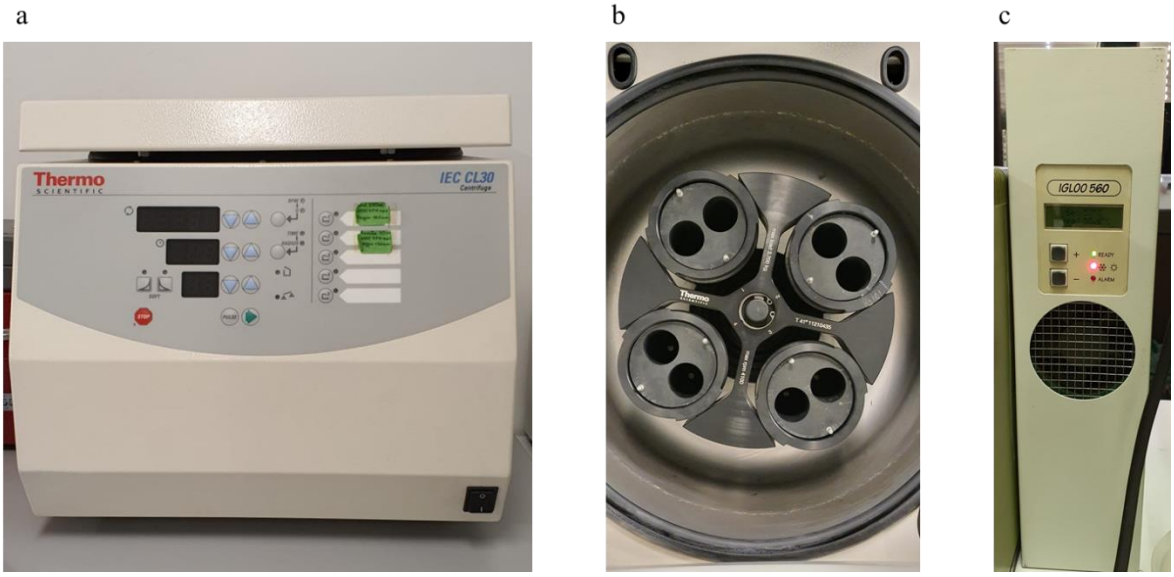


Figura 5.10 Fotografia di: (a) Centrifuga modello IEC CL30 con una sua foto interna (b). La (c) invece raffigura il termostato modello IGLOO 560 dell'HPLC.

5.2.8 Spettroscopia

La misura di densità ottica, usata per diverse tipologie di prove durante tutto il lavoro, viene effettuata attraverso uno spettroscopio UV/VIS (PerkinElmer, PDA, UV-VIS, Lambda 465, Figura 5.11). La quantità massima da poter inserire nelle cuvette è di 3 mL. Ogni campione da analizzare viene precedentemente diluito in un rapporto tale da avere una misura sensata nell'intervallo di validità della legge Lambert-Beer.

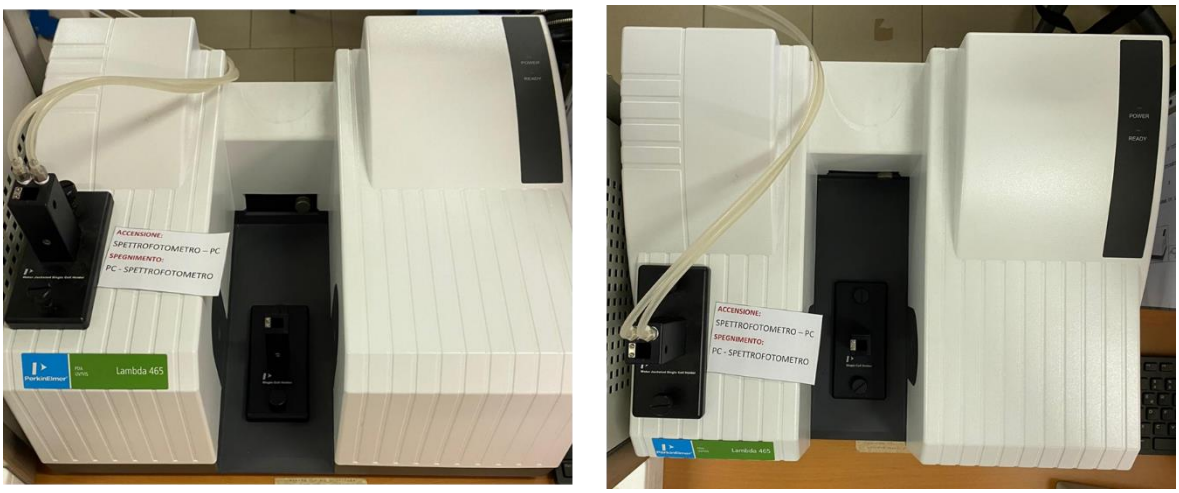


Figura 5.11 Spettroscopio UV/VIS (PerkinElmer, PDA, UV-VIS, Lambda 465).

5.2.9 Misura del gas prodotto

La misura del gas prodotto viene fatta in continuo mediante il sistema AMPTS II permette la lettura online in continuo di gas prodotto. Questa apparecchiatura, insieme alla

possibilità di lettura, permette di misurare il volume di gas prodotto e la tasso di produzione. Le caratteristiche di questa apparecchiatura sono le seguenti:

- Intervallo di misurazione per la portata istantanea del gas: da 10 a 120 mL al min;
- Capacità di rilevamento: fino a 13 L di gas cumulativo per canale per ogni test in batch;
- Risoluzione di misura: 10 mL;
- Accuratezza: 5%.

Il sistema è composto da un bagno termostatico, all'interno del quale vengono inserite le bottiglie da 500 mL nelle quali vengono effettuate le prove di fermentazione. Queste, dotate di un motore, sono collegate ad una seconda apparecchiatura (Figura 5.12 (a) - (b)) che rileva la produzione di gas (Figura 5.12 (c)). Tra queste due però, le uscite dalle bottiglie vengono prima collegate ad un sistema di assorbimento composto da una soluzione di NaOH 3M, la quale assorbe la CO_2 al fine di monitorare la produzione di idrogeno, e una soluzione di acqua acida che fa passare tutto il gas prodotto senza assorbire la CO_2 (Figura 5.26 – Unità di assorbimento).

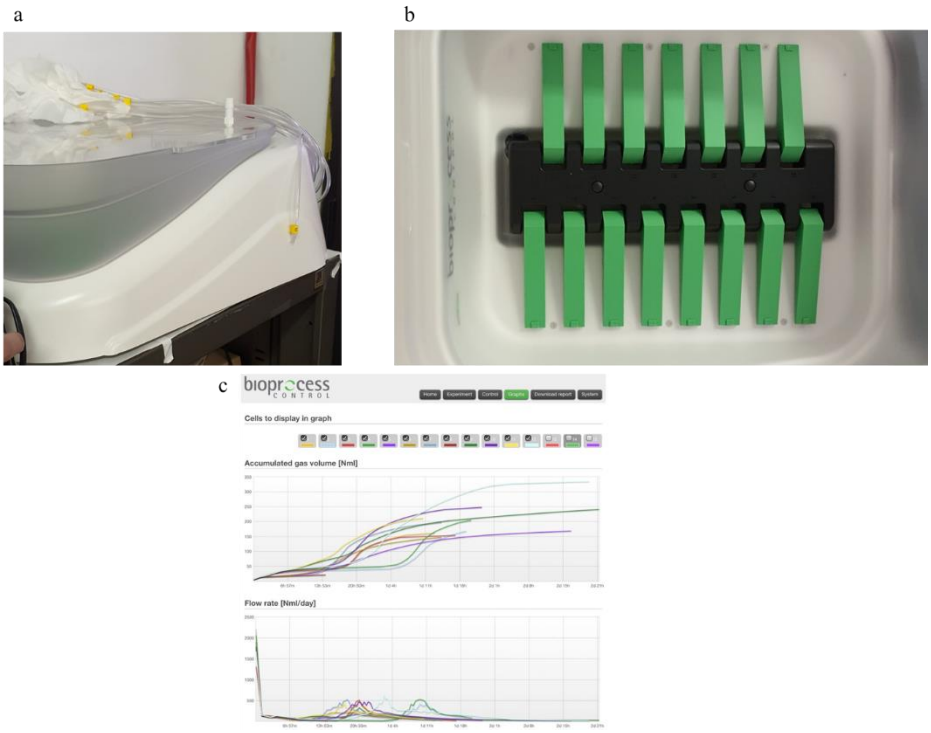


Figura 5.12 Fotografia di: (a) Apparecchiatura per la rilevazione di gas con un particolare (b) sull'interno. (c) Esempio live della interfaccia dove si riportano le curve relative alla produzione di gas.

5.2.10 Analisi di immagini

L'osservazione dei grani di kefir d'acqua, dei surnatanti post fermentazione, del substrato e delle diverse tipologie di pellet ottenute dopo centrifugazione è stata effettuata attraverso un microscopio ottico *Olympus BH-2* (Olympus Italia S.r.l, Segrate, Italia) (Figura 5.13) con il quale si sono effettuate diverse fotografie tramite il software open-source *Koppace-View*. Per il post-processing delle foto, sono stati utilizzati Adobe *Photoshop 2021* e un altro software open-source, *ImageJ*.

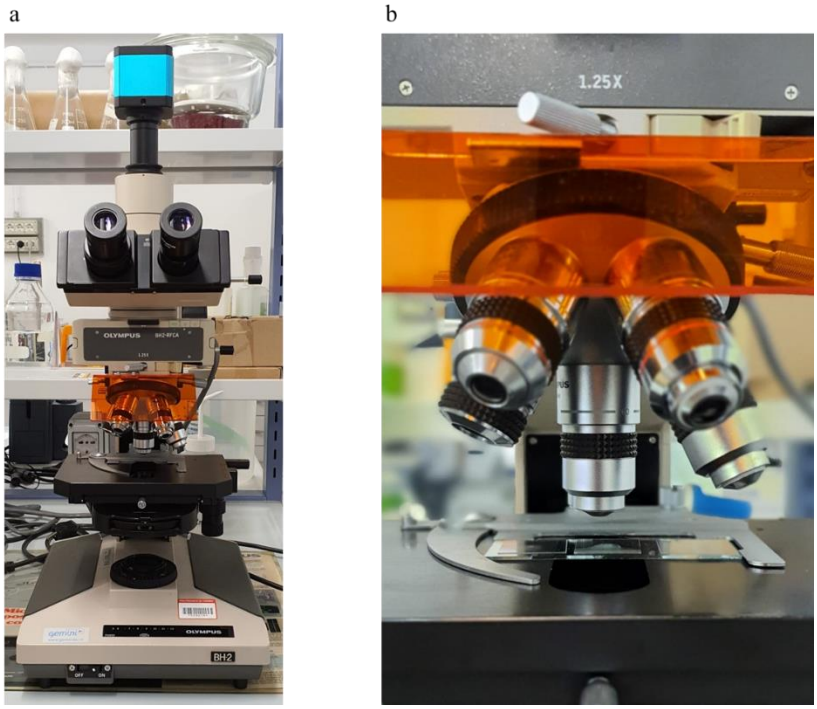


Figura 5.13 Fotografie del (a) Microscopio Olympus BH-2 con un particolare sugli obbiettivi (b).

5.2.11 Trattamento dei dati sperimentali

Una volta ottenuti tutti i dati dalle prove sperimentali, questi sono stati trattati grazie a diverse equazioni, le quali sono riportate di seguito.

5.2.11.1 Analisi delle curve risultanti dall'analisi del gas

Le curve relative alla dinamica della produzione di gas sono di tipo saturativo, per questa ragione è stato deciso di utilizzare l'equazione di Gompertz per analizzarle in quanto questa descrive molto bene le curve di tipo saturativo. Tale equazione ha la seguente forma:

$$G\ (t) = G_{max} * e^{-e^{\left[\frac{R_{max}}{G_{max}}(\lambda - t) + 1\right]}}$$

Dove:

- G è la produzione di gas [NL/L];
- G_{max} è la produzione massima di biogas [NL/L];
- R_{max} è la velocità di produzione massima [NL/L*h];
- λ è la durata della fase di latenza [h], ossia la parte della curva antecedente al tratto esponenziale;
- t è il tempo di avanzamento della prova [h];

Tale equazione può trovarsi anche scritta in forma parametrica come segue:

$$y = a * e^{-e^{\left[\frac{(x - x_0)}{b}\right]}}$$

Dove:

- G = y [NL/L];
- G_{max} = a [NL/L];
- $R_{max} = \frac{a}{(\exp(1)*b)}$ [NL/L*h];
- $\lambda = x_0$-b [h].

5.2.11.2 Analisi statistica dei dati

I parametri statistici utilizzati durante i calcoli per l'analisi dei dati sperimentali sono i seguenti:

- *Calcolo della media*: data una serie di dati {xi} con i=1…N, la media di tali valori è definita come segue:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^{N} x_i}{N}$$

- *Calcolo della deviazione standard*: la varianza di una misura è definita nel seguente modo:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N}(x_i - \bar{x})^2}{N}}$$

5.3 Procedure sperimentali

Da qui in avanti verranno riportate tutte le procedure sperimentali, con le rispettive caratteristiche e condizioni operative, di tutte le prove effettuate. I risultati e i commenti verranno riportati nei capitoli successivi in modo da avere una quadro generale dei risultati, tutti raggruppati in un solo capitolo.

5.3.1 Inoculi

Come già accennato in precedenza, gli inoculi utilizzati in questo lavoro sono stati di due diverse tipologie, WK e SFB, al fine di testare la loro compatibilità per il nuovo microbioma misto. Di seguito verranno descritte le prove effettuate per ottenerli.

5.3.1.1 Inoculo "Water Kefir"

La prima tipologia, innovativa rispetto al suo comune utilizzo come probiotico, è quella del water kefir. Per ottenere questo primo inoculo si è partito con l'individuare le migliori condizioni di fermentazione da utilizzare, in base ad esperienze personali di persone che fermentano kefir da anni e alle condizioni trovate in letteratura.

Le prime prove sono state effettuate usando dei grani di kefir casalinghi (Torino, Italia). Le prove sperimentali di fermentazione sono state eseguite in condizione aerobica aperta, utilizzando bottiglie con un volume totale di 500 ml e un volume di riempimento, con una soluzione 60 g/L di glucosio, di 200 mL (Figura 5.14).

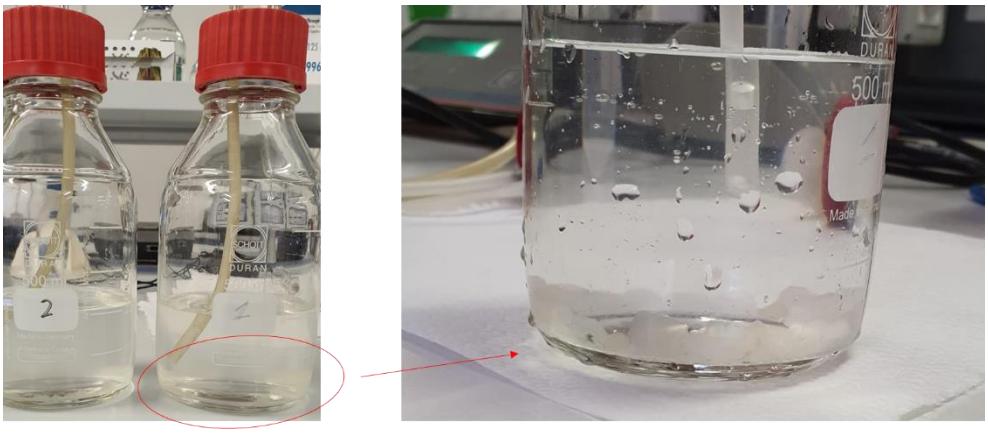


Figura 5.14 Bottiglie utilizzate per la prima prova di fermentazione dei grani di kefir d'acqua con un particolare volto a mostrare i grani all'interno della soluzione.

Le condizioni di fermentazione aerobica aperta sono state create con l'inserimento di due tubicini nel tappo di chiusura delle bottiglie, uno chiuso con una pinza Hoffman e l'altro lasciato aperto ma con una filtro in acetato di cellulosa di 0,45 µm, il tutto è mostrato in Figura 5.15) Quest'ultimo tubicino è stato utilizzato per effettuare prelievi (attraverso un altro tubicino posto internamente alla bottiglia e collegato a quello esterno) del surnatante al fine di monitorare il corso della fermentazione. I sistemi sono stati inoculati con circa 2 grammi di grani ognuno, quindi con un rapporto dell' 1% *m/v*. Prima di inserirli all'interno del bagno termostatico a temperatura controllata di 21,5 °C, questi sono stati portati a pH circa pari a 5,0 (4,92±0,05 per il numero 1 e 4,8±0,05 per il numero 2) con un buffer fosfato (pH 7,4). Questa prova è andata avanti per una settimana, campionando costantemente e misurando il pH (Figura 5.7 (b)), la conducibilità, i gradi Brix, la massa umida dei grani (con la bilancia in Figura 5.1) e analizzando le immagini al microscopio.

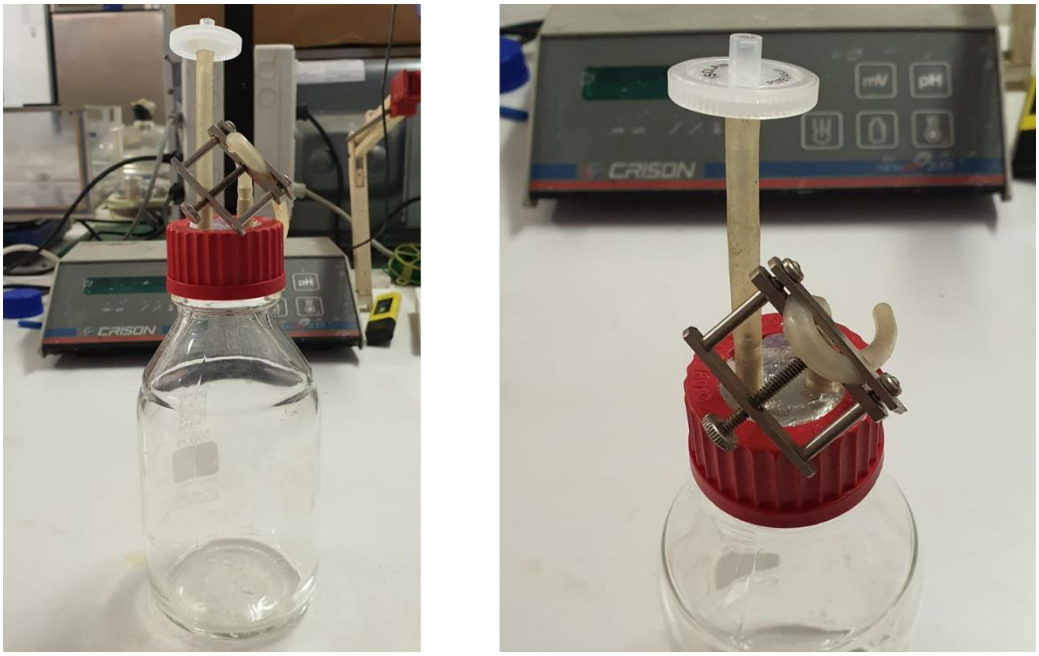


Figura 5.15 Chiusura utilizzata nelle bottiglie per creare le condizioni di non totale anaerobiosità.

Avendo osservato una crescita lenta della massa umida dei grani, un pH pressoché costante (quindi probabile titoli molto bassi di acidi organici), una conducibilità anch'essa costante e i gradi Brix in aumento (teoricamente, essendo il glucosio metabolizzato, dovrebbero diminuire), si è deciso di procedere con un'altra prove con le stesse condizioni precedenti, ma in questo caso la soluzione di glucosio è stata preparata di 40 g/L, e con un rapporto di inoculo pari al 2% *m/v*. Sono stati misurati gli stessi parametri, in aggiunta anche al potenziale Red-OX.

Anche dopo questa nuova prova i risultati non sono stati soddisfacenti e quindi è stato deciso di provare un inoculo indigeno fresco, raccolto da un utilizzatore casalingo (differente dal primo fornitore a Torino, Italia. Questo inoculo ha una storia precedente diversa, e quindi condizioni operative diverse sono state selezionate per la sua crescita in laboratorio. La ricetta che è stata seguita si basa in particolare in riferimento a [24]. Da questo riferimento, sono state scelte :

- Soluzione di zucchero 50 g/L, suddivisa però in una soluzione 25 g/L di glucosio con aggiunta di zucchero di canna, in quantità tale (in base alla quantità di soluzione di glucosio utilizzata) da avere una concentrazione di 25 g/L anche per esso;
- Temperatura di 22 °C;
- Inoculato al 10% *m/v*;
- pH di partenza (tramite un buffer fosfato a pH 7,4) compreso tra 5,5 e 6,0;
- Condizioni di fermentazione aerobica aperta.

Questa volta però le prove di fermentazione sono state effettuate non più nelle bottiglie da 500 mL (in realtà i grani usati in precedenza nelle prime 2 prove, sono stati utilizzati ancora per fermentazioni in bottiglia, ma solamente per 6 *backslopping*), bensì nel Minifors I (Infors HT, Bottmingen, Svizzera) come mostrato in Figura 5.16. Sono stati monitorati i stessi parametri precedenti, con la differenza che il pH è stato misurato tramite il pH-metro Steiel S503 mostrato in Figura 5.7 (a) e in aggiunta sono stati misurati anche i TS, i VS e la TA per tutte le otto differenti fasi di *backslopping* e per il sesto, settimo e ottavo, è stata misurata anche la densità ottica (OD).

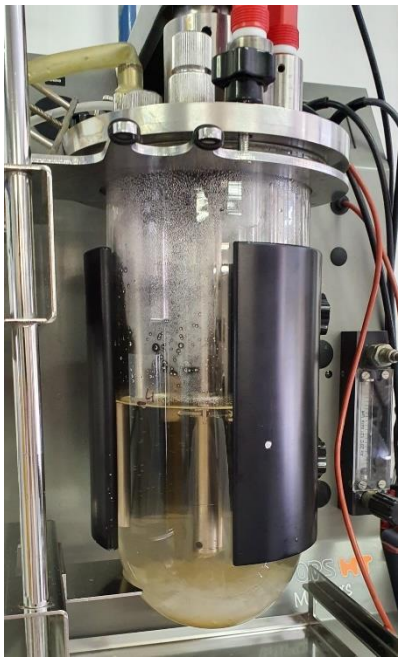


Figura 5.16 Fermentazione dei grani di kefir d'acqua nel Minifors I.

Dopo tutte le fasi di backslopping ne è risultato un brodo arricchito di microrganismi (Figura 5.17), utilizzato poi come inoculo per le prove di fermentazione. Per analizzare le immagini, si preleva un campione di 20 mL di surnatante il quale poi una volta inserito in una Falcon con un volume totale di 50 mL, viene centrifugato (Figura 5.10 (a) – (b)) a 4000 rpm per 20 minuti. Di quello che sedimenta (Figura 5.18) se ne preleva una minima parte che poi va analizzata al microscopio (Figura 5.13)

Figura 5.17 Micrografia della miscela di lieviti e batteri nell'inoculo WK (x60).

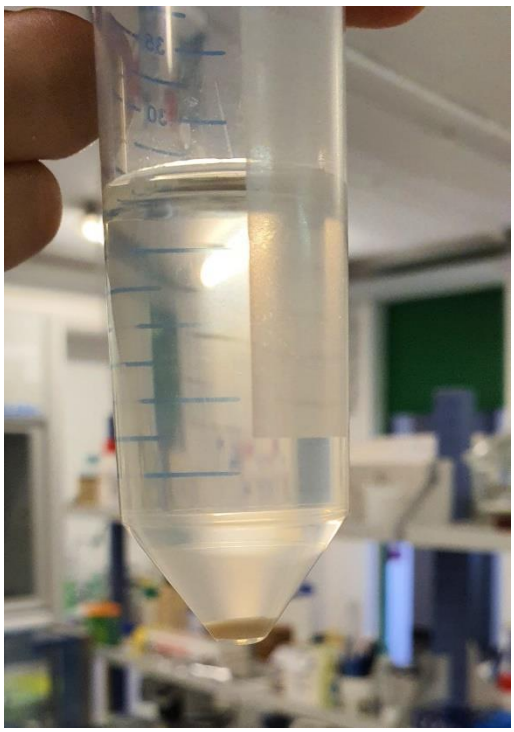


Figura 5.18 Pellet ottenuto post centrifuga.

5.3.1.2 Inoculo "Spore Forming Bacteria" - Clostridium

Come seconda tipologia di inoculo invece è stato utilizzato un consorzio di SFB, che presumibilmente contiene *Clostridium spp.* dato il microbioma da cui sono selezionati chiamati anche HPB ossia *Hydrogen Producing Bacteria*. Questo è stato ottenuto partendo dalla preparazione di uno *slurry* (Figura 5.19) da letame bovino solido. A tal proposito, 200 g di letame t.q. sono stati pesati su una bilancia tecnica 2200P (Tecnovetro, Monza Italia) e diluiti con acqua del rubinetto in rapporto 1:1 (*m/m*).

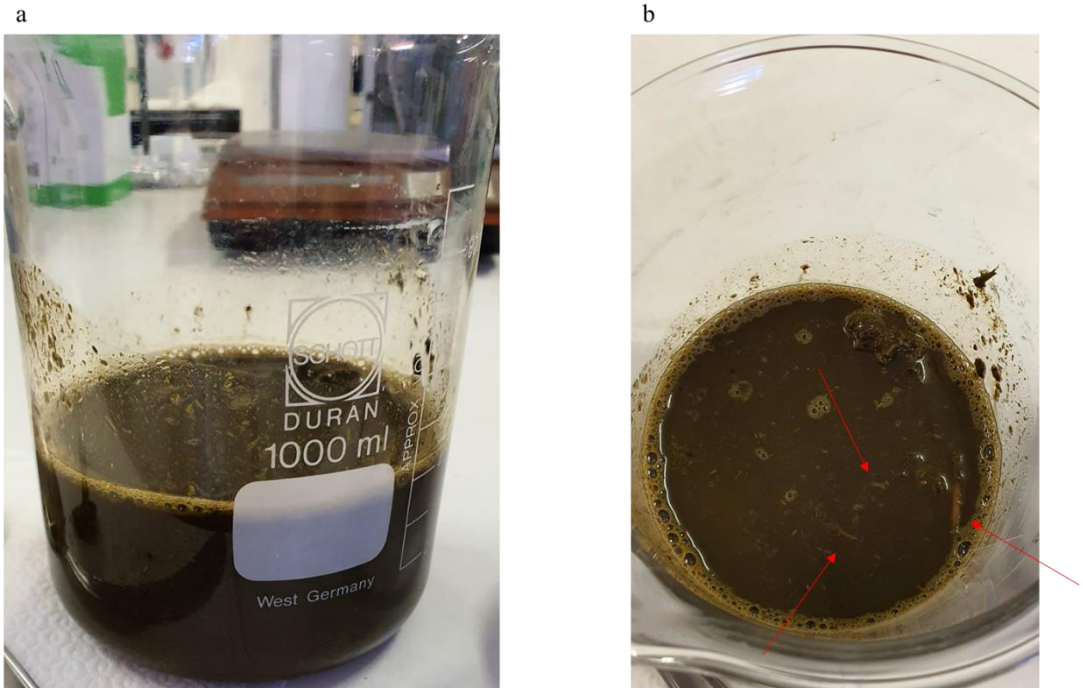


Figura 5.19 (a) Slurry da letame bovino solido, 1:1 (*m/m*) con un particolare (b) sulla paglia.

Questo è stato mantenuto in agitazione tramite un motore (*IKA*, RW20 digital) mostrato in Figura 5.20, a 250 rpm per 2 ore, al fine di omogenizzare lo slurry e ossigenare il sistema per avviare l'inibizione dei metanigeni (strettamente anaerobici).

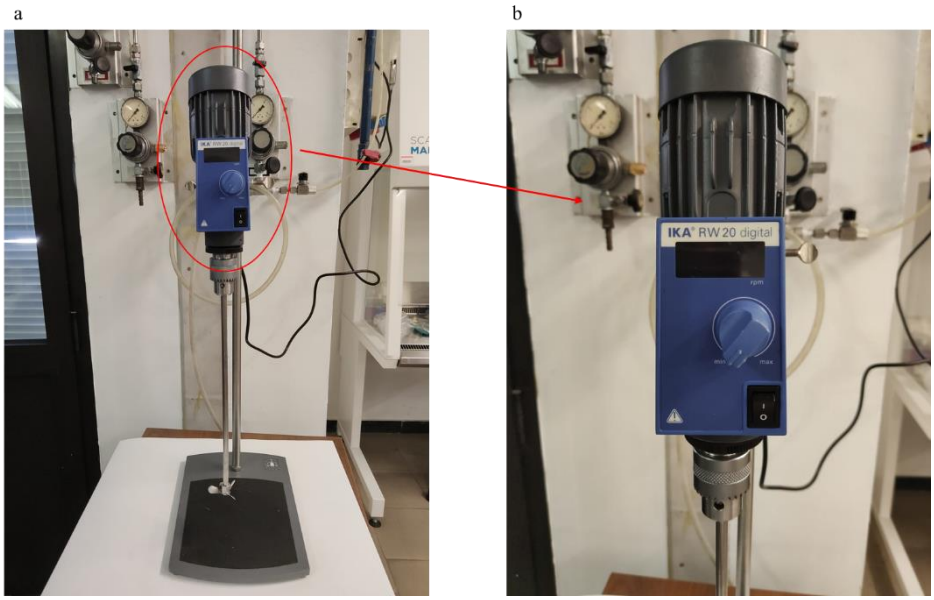


Figura 5.20 (a) Sistema completo di agitazione con un particolare (b) sul motore.

Prima di poter utilizzare tale inoculo nelle prove di fermentazione, questo richiede inizialmente uno step di pulizia che ha il fine di eliminare i residui di paglia (Figura 5.18 (b)) presenti nel letame bovino derivanti dal processo di digestione. Lo slurry che si ottiene quindi, viene fatto passare all'interno di un setaccio di acciaio con maglie di c. 2 mm allo scopo di eliminare la paglia in sospensione. Questa operazione è stata ripetuta per 3 volte. Successivamente il liquame è stato filtrato ulteriormente con un filtro millipore a vuoto con un filtro in estere di cellulosa a 0,45 µm. Il filtrato poi, per essere preparato ad un ambiente finale di fermentazione dove uno degli obiettivi è la produzione di etanolo insieme all'idrogeno, è stato applicato un trattamento, come suggerito da [25], ad alta concentrazione di etanolo (55 % *v/v*) per 24 h, al fine appunto di isolare gli SFB (sfruttando la loro capacità di resistere a condizioni di stress mediante sporulazione), inibire ulteriormente i metanigeni residui.

In Figura 5.21 è riportata una foto di spora batterica nell'inoculo, dopo il pre-trattamento con etanolo.

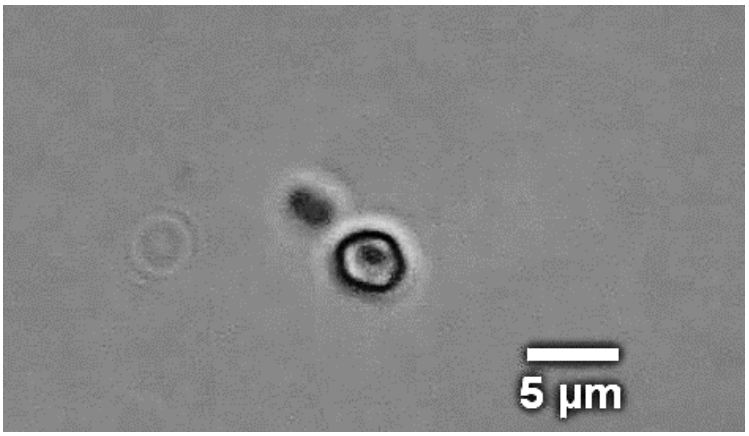


Figura 5.21 Micrografia di uno Spore Forming Bacteria (x60).

5.3.2 Substrato

Come substrato è stato utilizzato del pane raffermo commerciale (marchio "Buongiorno Natura"), del quale nel seguito si riportano i valori nutrizionali medi riportate sull'imballaggio :

	Per 100 g	AR* % (100 g)
• Energia :	1491 kJ – 352 kcal	(18%)
• Grassi :	1,1 g	(2%)
di cui acidi grassi saturi :	0,2 g	(1%)
• Carboidrati :	74,0 g	(28%)
di cui zuccheri :	0,9 g	(7%)
• Fibre :	3,2 g	(-)
• Proteine :	9,8 g	(20%)
• Sale :	1,9 g	(32%)

Come prima cosa il pane raffermo è stato caratterizzato in modo tale che poi in fase di preparazione della soluzione di substrato, conoscendo la percentuale di TS presenti, si riesce a prepararla in modo corretto rispetto alla percentuale si TS che si vuole ottenere. Di seguito (Figura 5.22) sono riportati i risultati della caratterizzazione del pane raffermo t.q.:

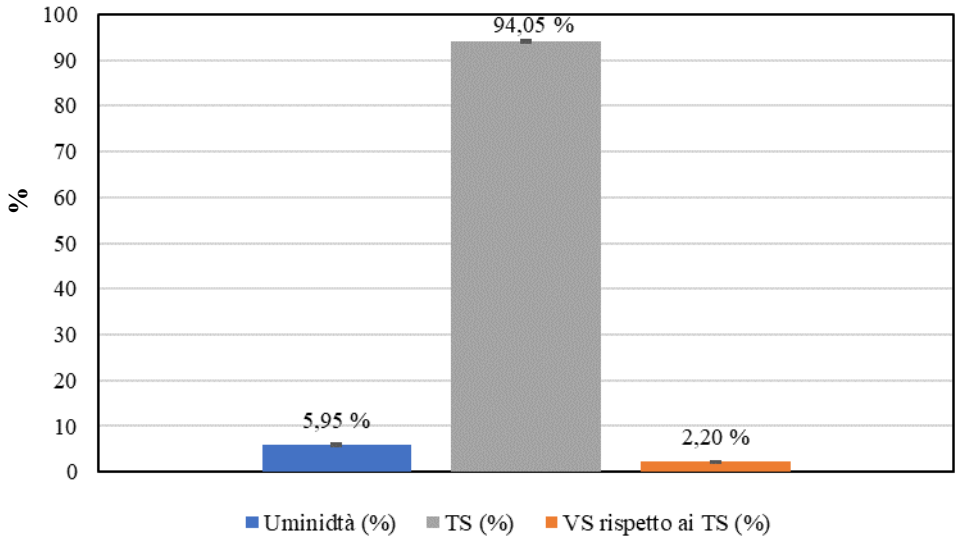


Figura 5.22 Risultati della caratterizzazione del pane raffermo t.q.

Successivamente una volta conosciuta la quantità totale di TS e di umidità, è stata preparata prima una soluzione al 6% di solidi totali, usata poi per la prima prova di fermentazione, e successivamente una soluzione al 10% di TS usata per il resto delle prove. È stata scelta questa percentuale, dopo aver studiato le differenze tra 5,10 e 20% di TS attraverso diversi parametri.

Facendo riferimento alla soluzione di al 10% di TS, per prepararla sono stati misurati 266 g di pane raffermo su una bilancia tecnica 2200P (Tecnovetro, Monza Italia), dei quali 250 g (il 94%) sono TS e il restante è acqua, e sono stati miscelati con 2484 mL di acqua deionizzata, ottenendo così 2,5 L di substrato al 10% di TS (Figura 5.23).

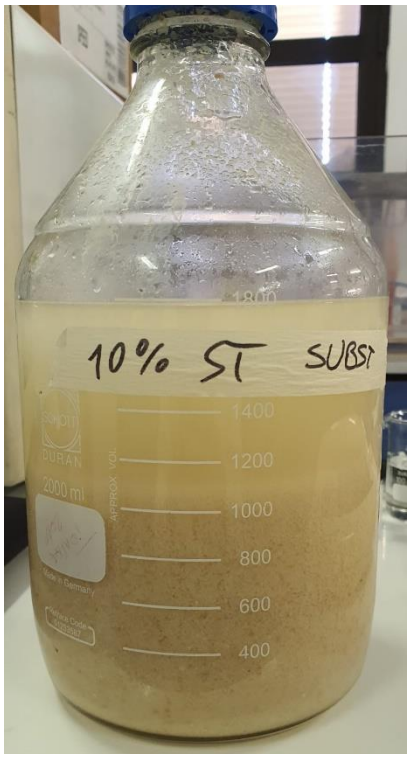


Figura 5.23 Substrato al 10% di TS.

5.3.2.1 Pre-trattamenti

Il substrato così ottenuto non è ancora utilizzabile per le prove di fermentazione, ma necessità di un pre-trattamento con lo scopo di idrolizzare il pane raffermo. Come mostrato nella caratterizzazione dei residui di pane, la percentuale di carboidrati è elevata, ma la proporzione di zuccheri piuttosto molto bassa. Quindi la fase di pretrattamento è finalizzata alla degradazione degli carboidrati complessi all'interno del substrato per renderli disponibili per i microrganismi. Trovando spunto in letteratura, come per esempio in [26], sono state testate diverse tipologie di trattamenti, cercando però di scegliere quelle con la minor spesa energetica possibile. Di seguito le diverse tipologie:

- Pre-trattamento Basico (BP);
- Pre-trattamento Acido (AP);
- Pre-trattamento con Sale (SP);
- Pre-trattamento Enzimatico (EP) a diverse concentrazioni;
- Pre-trattamento Enzimatico con Sale (ESP).

Tutti i test sono stati eseguiti, in duplicato. Per quanto riguarda il *BP*, per ognuno dei due test sono stati utilizzati 50 mL di substrato al 10% di TS con l'aggiunta di 21 mL di NaOH 0,1 M, ossia fino al raggiungimento di un pH pari a 11,80 per una e 11,72 per l'altra.

Per l'*AP* invece, utilizzando sempre 50 mL dello stesso substrato, sono stati aggiunti in tutti e due i campioni, 0,6 mL di HCl 1 M, con un pH di 2,07 per il primo e 2,30 per il secondo.

Per l'*SP* sono stati utilizzati 22,5 mL di CaCl2 1 M sempre su 50 mL di campione [27].

Per quanto riguarda invece l'*EP*, è stato utilizzato un mix enzimatico (Solgar Italia S.p.A., Padova, Italia) sia all' 1% *m/m* (peso secco dei 50 mL al 10% di TS/peso secco mix enzimatico) che al 10% *m/m*. Dopo aver calcolato la quantità del mix enzimatico da introdurre, questa è stata miscelata direttamente nei campioni.

Infine l'ultimo test, l'*ESP* è stato preparato all'1% *m/m* del mix di enzimi, con aggiunta del 20% *m/m* di CaCl2 1 M (peso di CaCl2/peso secco mix enzimatico).

Tutte i test sono stati poi messi in agitazione per 3 ore su una multi-piastra modello Velp Scientifica (Figura 5.24) a velocità 5,5. Alla fine delle ore prestabilite, sono state

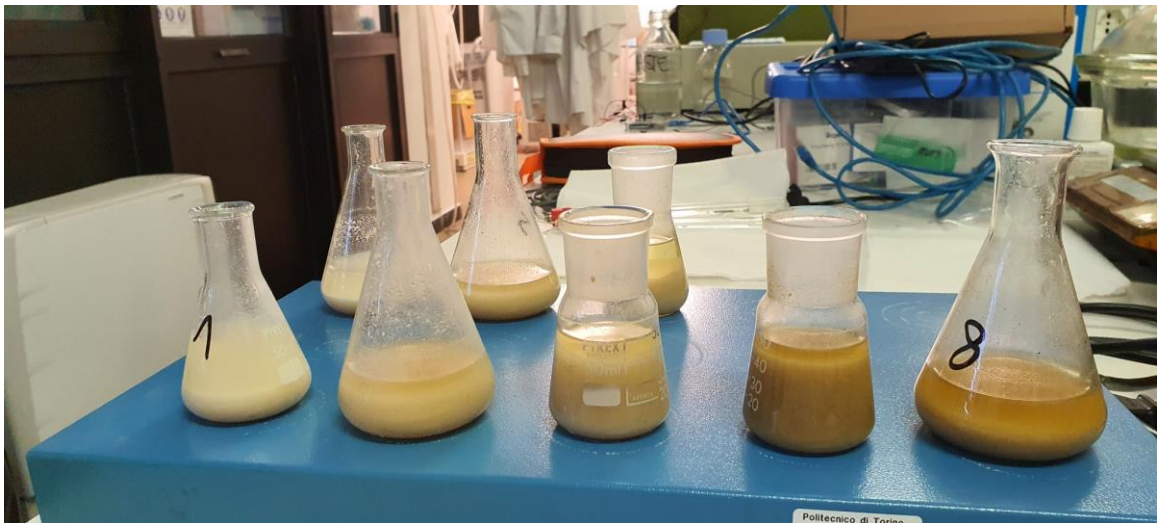


Figura 5.24 Test per la scelta del pre-trattamento in agitazione.

utilizzate misure di densità ottica, gradi Brix e analisi al microscopio per scegliere il pre-trattamento più adeguato, avendo come obiettivo quello di massimizzare l'idrolisi dell'amido. Prima di procedere con le misure, sono stati prelevati 8 mL di campione per ognuno dei test, è stato centrifugato con una centrifuga modello IEC CL30 (Figura 5.6 (a) e (b)) a 4000 rpm per 30 minuti. Del surnatante, una parte è stata usata per l'analisi al microscopio, mentre un'altra è stata filtrata con un filtro in acetato di cellulosa a 0,45 μm e poi il filtrato è stato diluito per lo spettrofotometro e invece usato t.q. per i gradi Brix. Nella sezione Risultati, verranno poi riportati, le diluizioni e anche i target che sono stati presi in considerazione in sede di scelta.

Un ulteriore test è stato portato avanti durante lo studio dei pre-trattamenti. Infatti dopo avere scelto quello basico, si è voluto monitorare, tramite le stesse misure e in aggiunta utilizzando un'analisi con HPLC (per questa la diluizione del filtrato è stata di 1:1 con acqua deionizzata), come queste variavano dal tempo zero fino alle 24 ore, utilizzando però in questo caso NaOH t.q. (aggiungendone sempre poco alla volta fino al raggiungimento del valore di pH pari a 12 circa) evitando così consumo di acqua per preparare la soluzione di NaOH.

Per la preparazione del substrato utilizzato poi nei test di fermentazione, sono stati utilizzati 14 g di NaOH t.q. (arrivando ad un pH di 11,59) per 2,5 L di substrato al 10% di TS.

5.3.3 Prove di fermentazione

Una volta che tutte le precedenti prove sono state concluse, è iniziata la fase finale del lavoro che mira a testare la capacità degli inoculi indigeni di produrre idrogeno e gli effetti della loro combinazione nei test di fermentazione utilizzando substrati di scarto.

Sono state quindi eseguite prove sperimentali di fermentazione nell'unità AMPTS II. Di queste prove ne sono state eseguite 4, la prima con il substrato grezzo (senza pre-trattamento) e con due tipologie di test :

- Sistemi inoculati con un rapporto del 5% v/v per inoculo SFB;
- Sistemi inoculati con un rapporto del 10% v/v per inoculo WK+SFB (5%+5%) per determinare se c'è un effetto sinergico quando si combinano entrambi i consorzi microbici.

E con le seguenti condizioni operative :

- 200 mL di substrato al 6% di TS;
- Temperatura del bagno termostatico di 25 °C;
- Agitazione alternata a 5 min ON/OFF e a una velocità di 100 rpm;
- Per il sistema di assorbimento, sia per la soluzione di NaOH che per l'acqua acida, sono stati utilizzati 80 mL in bottiglie con un volume totale di 100 mL.

Dopo i risultati non soddisfacenti del primo test, nel secondo si è deciso di cambiare le condizioni operative, ma anche le tipologie di test da eseguire :

- Sistemi inoculati con un rapporto del 10% v/v per inoculo WK;
- Sistemi inoculati con un rapporto del 10% v/v per inoculo SFB;
- Sistemi inoculati con un rapporto del 10% v/v per inoculo WK+SFB (5%+5%) per determinare se c'è un effetto sinergico quando si combinano entrambi i consorzi microbici;
- 200 mL di substrato al 60% di TS, pre-trattato per 24 ore con NaOH;
- Temperatura del bagno termostatico di 30 °C;

- Agitazione alternata a 5 min ON/OFF e a una velocità di 150 rpm;
- Per il sistema di assorbimento, sia per la soluzione di NaOH che per l'acqua acida, sono stati utilizzati 80 mL in bottiglie con un volume totale di 100 mL.

Queste condizioni operative sono state poi mantenute per tutte le seguenti prove, le quali però sono state inoculate con il corrispondente test della prova precedente (sistema 1.1 → sistema 1.2 → sistema 1.3; sistema 2.1 → sistema 2.2 → sistema 2.3 e così via), in quanto in questo modo c'è stata un'acclimatizzazione dei microrganismi presenti in ogni sistema. Le operazioni eseguite sono state le medesime per tutte le prove, ad eccezione ovviamente dell'inoculo inserito nella bottiglia e dallo step di ristabilizzazione del pH per il substrato pre-trattato il quale non è avvenuto nella prima prova.

Una volta passate le 24 ore di pre-trattamento per il substrato, a questo è stato ristabilizzato il pH (circa 5,5 per la prima prova e circa 6,5/7 per le altre) utilizzando 35 mL di HCl 10 M. Una volta preparato, tramite un cilindro graduato sono stati prelevati 200 mL e inseriti all'interno di una bottiglia con un volume totale di 500 mL. Nella prima prova, considerando che: gli inoculi da testare erano 2, che per ognuno bisognava monitorare la produzione di gas totale e quella di idrogeno, il tutto in duplicato, le bottiglie usate sono state 8. Mentre nelle altre prove, essendo gli inoculi da testare pari 3, le bottiglie totali utilizzate sono state 12. Una volta che ogni bottiglia è stata riempita con il substrato, questa è stata poi inoculata con la percentuale precedentemente scelta. Per l'inculo WK della prima prova è stato utilizzato il surnatante del sesto backslopping t.q. senza nessuna operazione antecedente, mentre per la seconda prova è stato utilizzato l'ottavo e dalla terza in poi, come già detto in precedenza, si è proceduto ad inoculare con il corrispondente test della prova precedente. Tutte le bottiglie sono state chiuse con una chiusura specifica fornita dalla casa produttrice dell'AMPTS 2, la quale presenta un agitatore al quale va inserito l'albero del motore in modo da permettere l'agitazione (Figura 5.25). Inoltre questa tipologia di chiusura permette di scegliere se operare in condizioni aerobiche o anaerobiche e in questo caso le prove sono state eseguite in condizioni anaerobiche. Per permettere queste condizioni, al tappo sono stati inseriti due tubicini, uno chiuso tramite una pinza e un altro chiuso con una Hoffman (Figura 5.25).

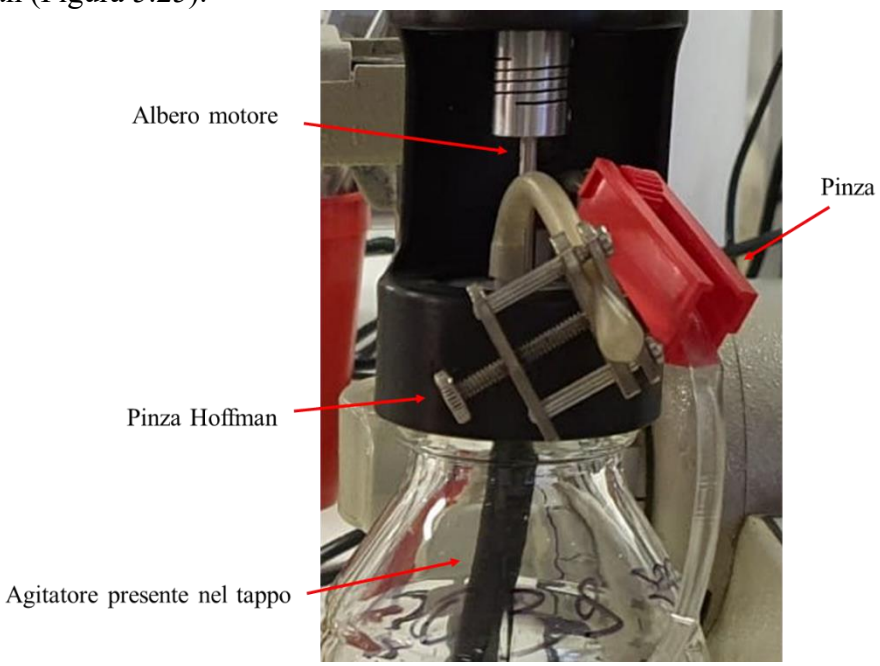


Figura 5.25 Chiusura delle bottiglie di fermentazione con particolari su Albero motore, Pinza, Pinza Hoffman e Agitatore presente nel tappo fornito dalla casa produttrice dell'AMPTS 2.

A questo punto le due pinze vengono aperte e si insuffla azoto per 4 minuti al fine di rimuovere tutto l'ossigeno presente. A questo punto, una volta richiuse le pinze e dopo l'inserimento del motore, tutte le bottiglie sono state immerse nel bagno termostatico e la prova è stata fatta partire online tramite PC grazie alla possibilità che l'unità AMPTS 2 ha e cioè quella di poter essere collegata alla rete (ovviamente la stessa del PC). Le prove sono state fatte durare per minimo di 48 ore ed un massimo di 141,5 ore. Per ognuna di queste sono state eseguite caratterizzazioni pre e post fermentazione tramite diverse misure come i TS, i VS, pH, la TA, OD, analisi tramite HPLC e analisi di immagine tramite microscopio.

In Figura 5.26 viene riportata una fotografia dell'apparato completo di lavoro dell'unità AMPTS 2 utilizzato per le prove di fermentazione.

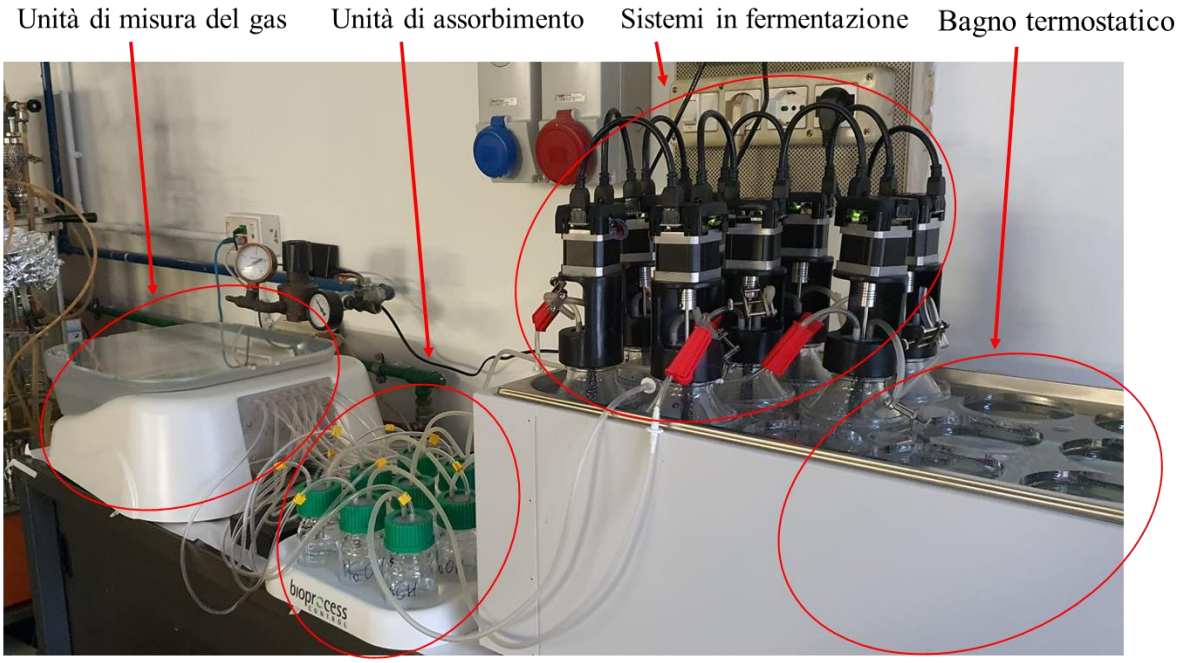


Figura 5.26 Vista completa dell'unità di lavoro dell'AMPTS 2.

6 Risultati delle prove sperimentali, considerazioni e commenti

Dopo aver descritto le procedure sperimentali attuate durante il mio lavoro di tesi, in questo capitolo verranno riportati tutti i risultati ottenuti durante le prove, con alcune considerazioni e commenti al fine di comprendere meglio il lavoro.

6.1 Inoculo "Water Kefir"

Come già scritto nel paragrafo 5.3.1.1 sono state utilizzate 2 diverse tipologie di grani di kefir d'acqua, provenienti da due diverse linee di fermentazioni casalinghe, per entrambi è stata fatta una caratterizzare dei grani sotto il punto di vista dell'umidità e dei TS. In Figura 6.1 è riportata quella dei primi grani utilizzati (fermentazioni in bottiglia)

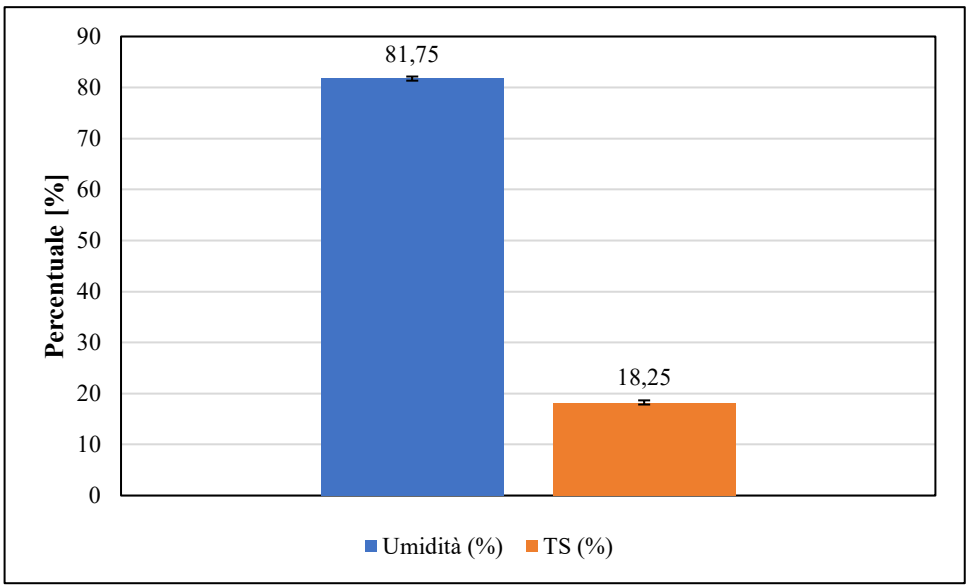


Figura 6.1 Caratterizzazione dei primi grani di kefir d'acqua utilizzati.

e nella Figura 6.2 quella dei grani utilizzati per le fermentazioni nel Minifors 1.

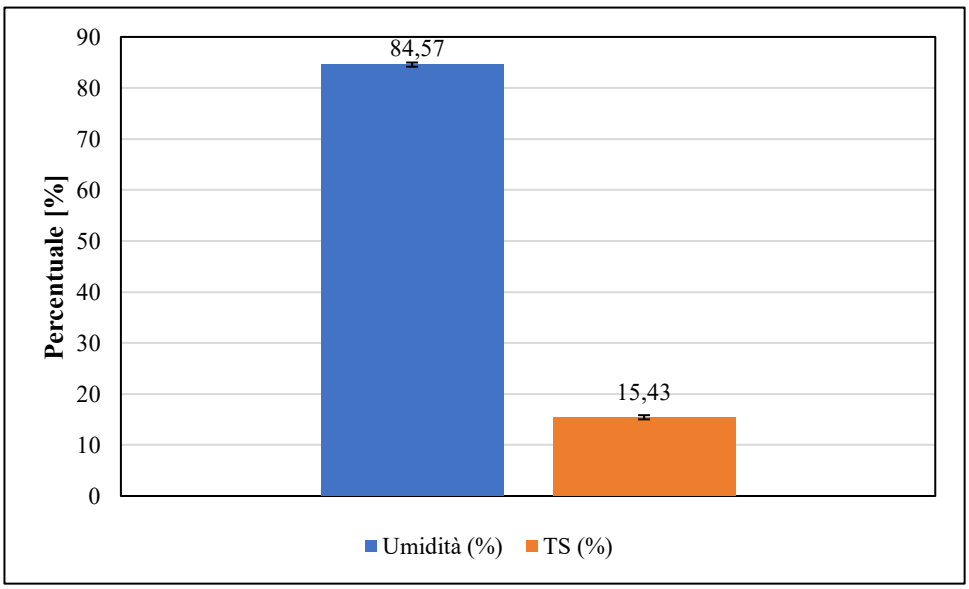


Figura 6.2 Caratterizzazione dei secondi grani di kefir d'acqua utilizzati.

Di seguito verranno riportarti i risultati, ottenuti attraverso il monitoraggio dei parametri e dell'analisi di immagini, solo delle 8 fasi di backslopping effettuate nel Minifors 1 con la seconda tipologia di grani utilizzata. Per quanto riguarda gli altri, questi verranno poi mostrati nell'Appendice A.

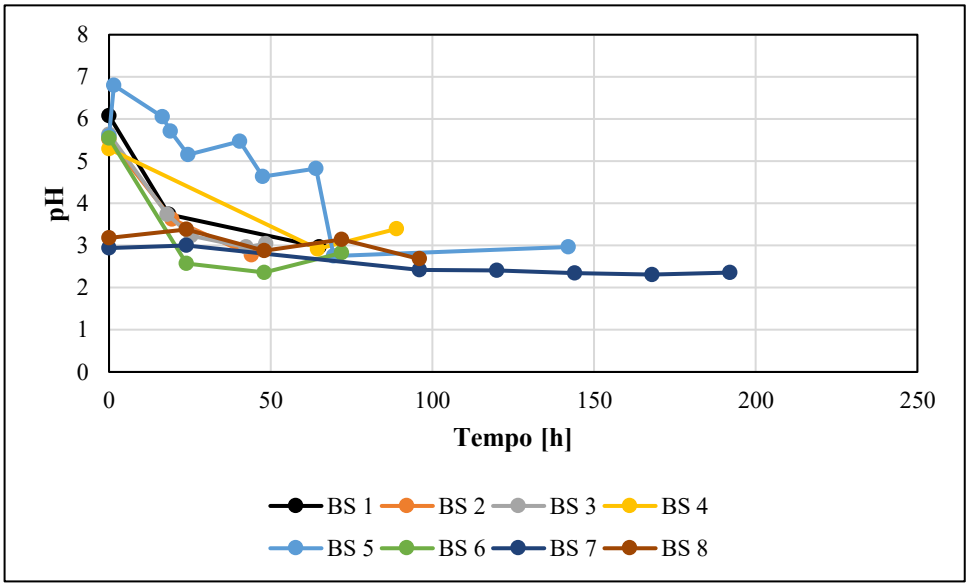


Figura 6.3 Variazione del pH nel tempo.

Dalla Figura 6.3 si nota come il pH, indipendentemente dal valore di partenza, decresce sempre durante la fermentazione, fino a valori compresi tra circa 2,6 e 3,0. Questo è dato dal fatto che, come già accennato nel Capitolo 3, il metabolismo dei microrganismi presenti nei grani presenta la produzione di acidi organici. Questo infatti si è potuto anche riscontrare nella misura degli acidi titolabili alla fine di ogni backslopping (Figura 6.4) e di come questi aumentino durante la fermentazione per gli ultimi 4 BS (Figura 6.5). Per gli ultimi 2 backslopping (7 e 8), si osserva che il pH misurato all'inizio era già acido, e che nel tempo il valore diminuisce leggermente. Per questi lotti si può ipotizzare che i grani si siano acidificati nel tempo, a causa dei successivi utilizzi e dello stoccaggio in frigorifero senza alcuna soluzione tampone. Tuttavia, questi sistemi potrebbero essere considerati metabolicamente attivi poiché è stata osservata un'elevata produzione di acido (Figura 6.4)

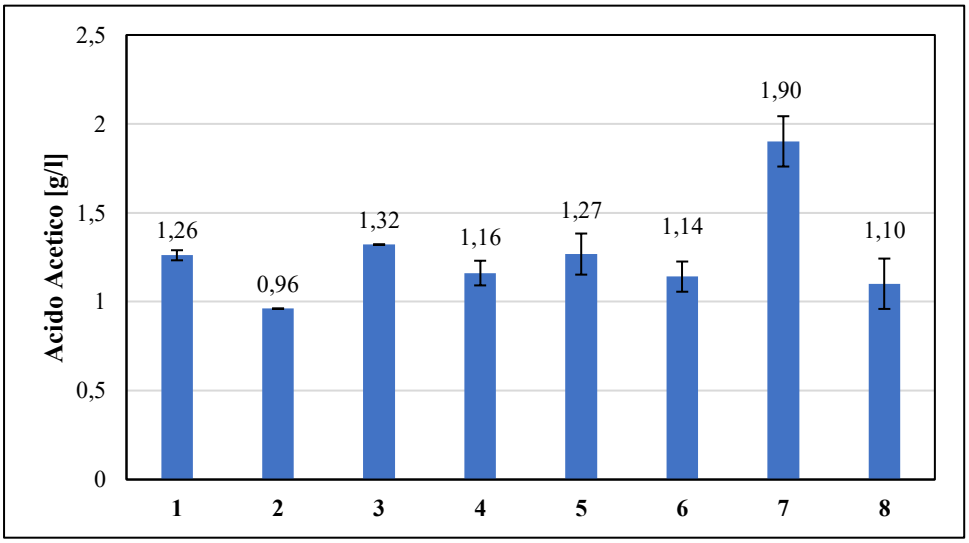


Figura 6.4 Concentrazione totale di acido acetico (g/L) alla fine degli 8 backslopping.

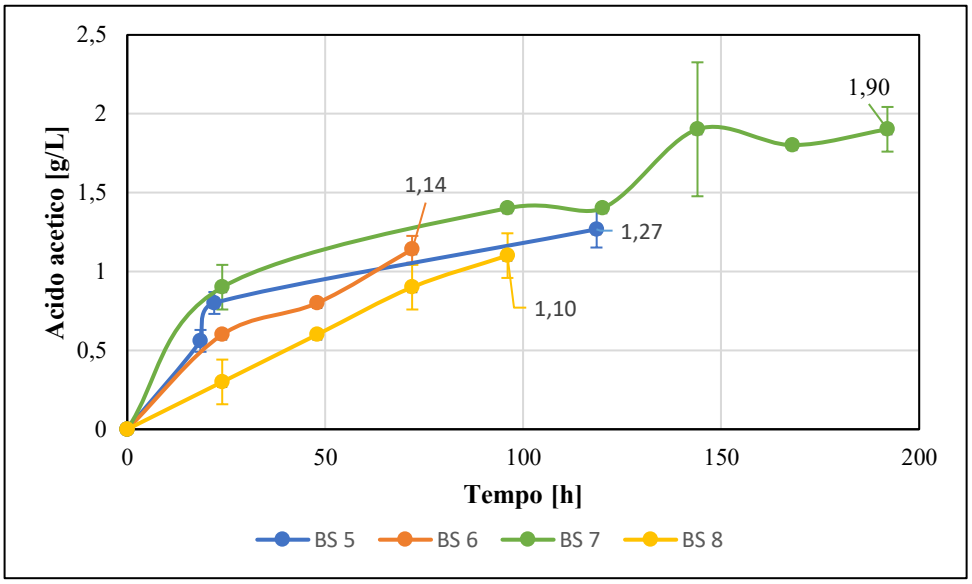


Figura 6.5 Variazione della concentrazione dell'acido acetico (g/L) nel tempo per i BS 5, 6, 7 e 8.

Nella Figura 6.6 è riportato l'andamento dell'ORP. L'ORP è un altro parametro chiave, insieme al pH, che serve a caratterizzare la dinamica della fermentazione del kefir nel tempo. Poiché le BS sono state eseguite in condizioni aerobiche aperte, non è stato fornito flusso di ossigeno al sistema né miscelazione durante la fermentazione (statica). Quindi l'ORP è partito da valori positivi, tipicamente da acqua atmosfericamente aerata (c. 300 mV) ed è stata osservata una diminuzione nel tempo probabilmente dovuta al consumo di ossigeno da parte di microrganismi aerobici e facoltativi nel consorzio. Si nota come nei primi 4 backslopping c'è ancora una fase di adattamento, sotto il punto di vista della anaerobiosità, della biomassa presente. Mentre per gli ultimi 4 si può notare come in questi il valore di ORP scenda al di sotto dello zero e quindi in condizioni di anaerobiosi, il che è stato un risultato positivo per il lavoro, in quanto successivamente le prove di fermentazione sono state condotte in condizioni di totale anaerobiosità.

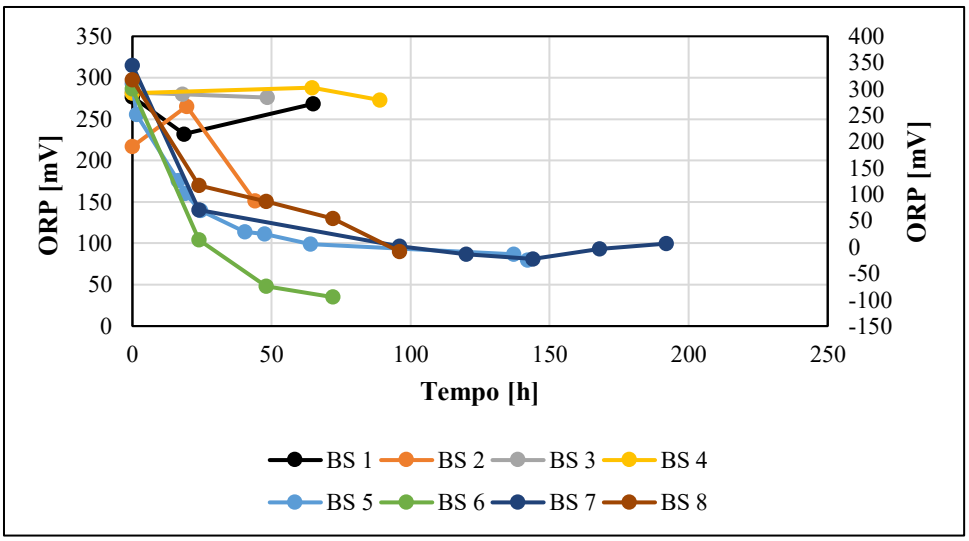


Figura 6.6 Variazione dell'ORP nel tempo (i BS 5, 6, 7 e 8 fanno riferimento all'asse delle ordinate di destra).

Nella Tabella 6.1 sono riportati i diversi range di valori di ORP in corrispondenza delle condizioni di ossigeno presente.

Tabella 6.1 Valori di ORP per le respirazioni cellulari [28].

Tipo di respirazione	Potenziale RedOx (ORP)
Aerobica	> +50
Anaerobica (Denitrificazione)	Compresa tra +50 e -50
Anaerobica (Fermentazione)	< -100
Anaerobica (Metanazione)	< -300

La Figura 6.7 riporta la variazione dei gradi Brix durante il tempo . Le misure di °Brix sembrano non avere un andamento uniforme per tutte i BS (Figura 6.7). Sebbene questo parametro serva principalmente a valutare la presenza (e il consumo) di zuccheri, purtroppo i titoli di altri metaboliti (acidi organici ed etanolo) influenzano le misurazioni in quanto hanno anche un indice di rifrazione diverso nel range di sensitività che può cambiare le letture.

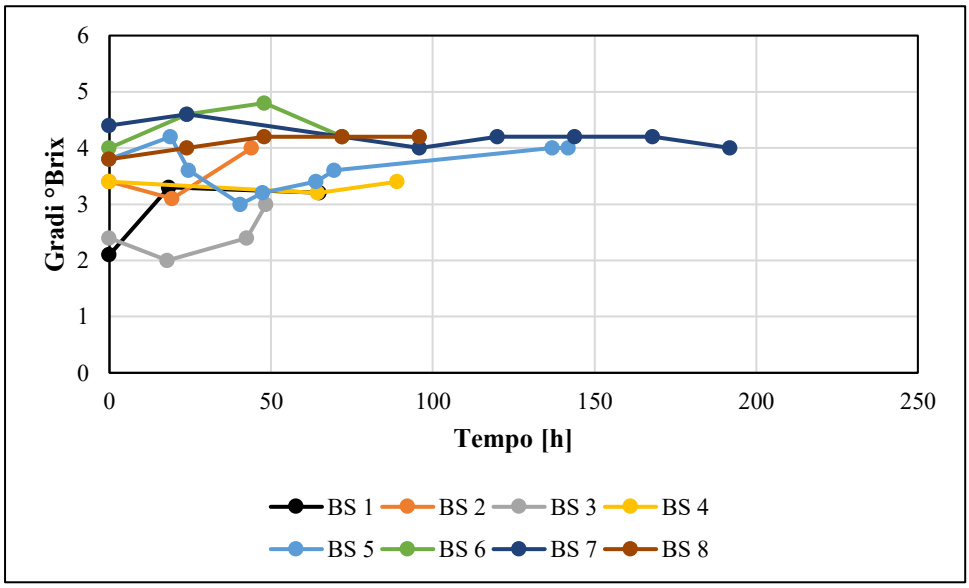


Figura 6.7 Variazione dei gradi °Brix nel tempo.

Queste prove avevano come obiettivo quello di arricchire sempre di più con microrganismi il surnatante di fermentazione al fine di poterlo utilizzare poi come inoculo. Questo obiettivo è stato raggiunto, come si può notare dalla Figura 6.9 nella quale si può notare la maggior presenza di biomassa rispetto alla Figura 6.8.

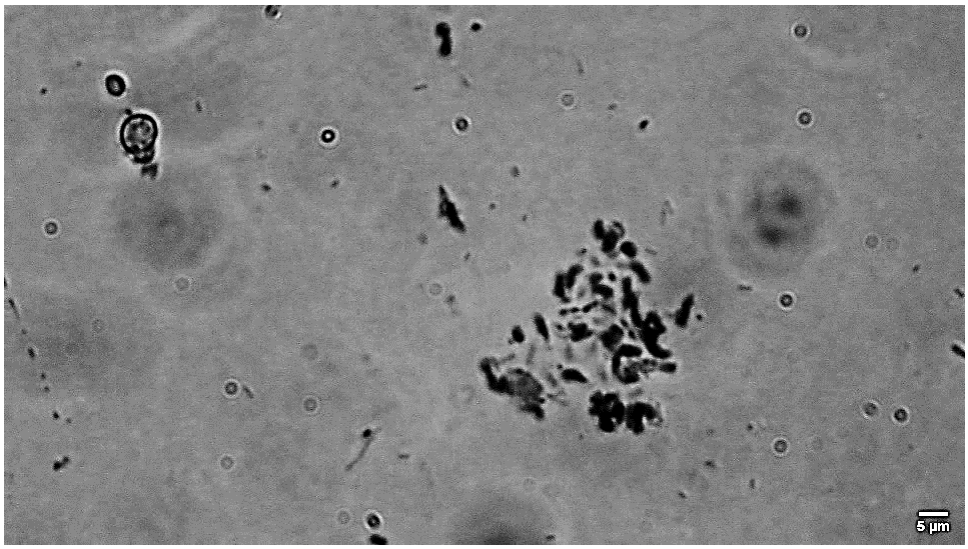


Figura 6.8 Micrografia della miscela di lieviti e batteri durante la fermentazione dei primi grani di WK (x60). Il blu di metilene è stato utilizzato per colorare i microrganismi presenti

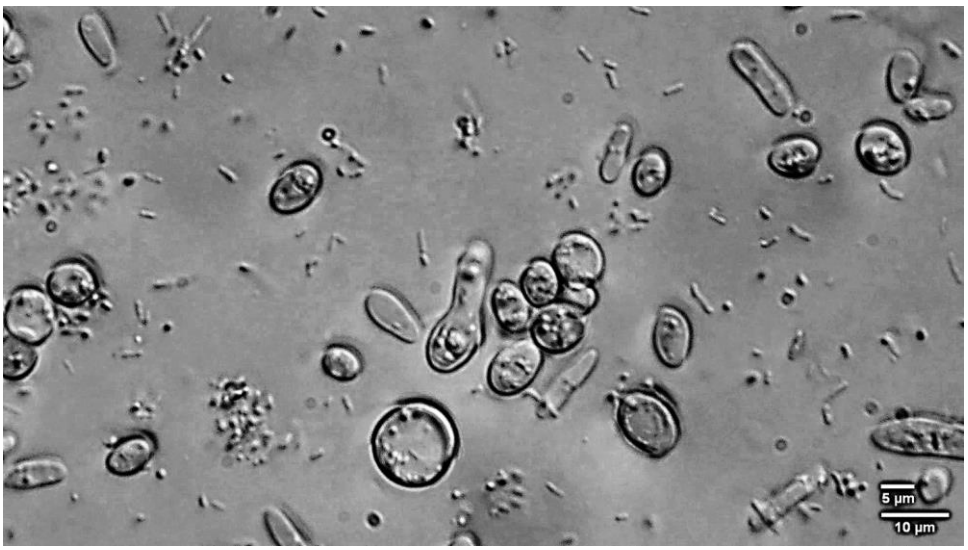


Figura 6.9 Micrografia della miscela di lieviti e batteri nell'inoculo WK (x60). I batteri sono i microrganismi più piccoli, i lieviti quelli più grandi.

Questa cosa può essere messa in relazione alla misura della conducibilità, la quale come mostrato nella Figura 6.10 è aumentata nel tempo in tutti gli 8 i BS. La conduttività elettrica (Figura 6.10) ha inoltre fornito approfondimenti sul corso della fermentazione nei sistemi studiati. Tipicamente, è considerato un parametro che fornisce informazioni sulle specie ioniche in soluzione. Per questo caso, poiché ogni BS subisce acidificazione (produzione di ioni H+), è coerente il trend di crescita osservato nella figura 6.5. Per i sistemi 5-6-7-8, le cui curve di pH non hanno avuto una marcata diminuzione del pH, si può

osservare che la conduttività suggerisce effettivamente un'elevata attività microbica e potrebbe essere interessante da utilizzare come *probe parameter* nei sistemi di kefir d'acqua [29].

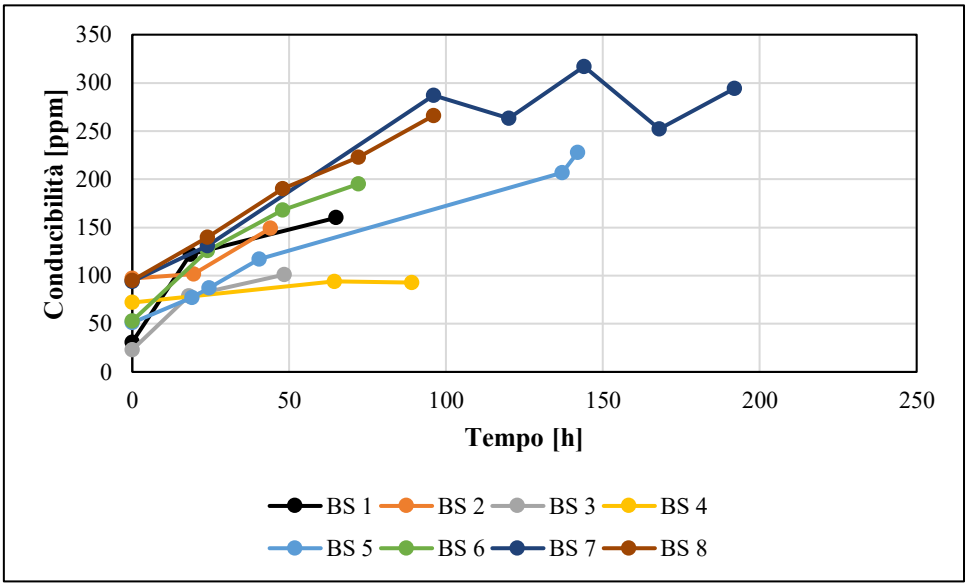


Figura 6.10 Variazione della conducibilità [ppm] nel tempo.

Infine, per quanto riguarda l'aumento della massa dell'EPS+Inoculo nei grani (in questo caso monitorata attraverso il peso della massa umida dei grani) questa ha avuto un tasso di crescita molto alto nelle prime 168 ore (0,28 g/h) e cioè nei primi 4 backslopping, mentre questo è diminuito fino quasi ad annullarsi durante gli altri 4 backslopping (per un totale di 838 ore per tutti gli 8 backslopping) e ad arrivare ad un tasso complessivo di crescita di 0,0090 g/h (Figura 6.11). Questa variazione del tasso di crescita molto probabilmente è avvenuta a causa della capacità di adattamento del kefir (inteso come la totalità dell'EPS più i microrganismi presenti con esso) che ha portato ad una crescita maggiore quando la durata media di ogni backslopping è stata di circa 42 ore, mentre è diminuita drasticamente dal momento in cui ogni fermentazione ha avuto durata media di 167,5 ore. Nonostante questo però, la fase liquida si è sempre arricchita di microrganismi.

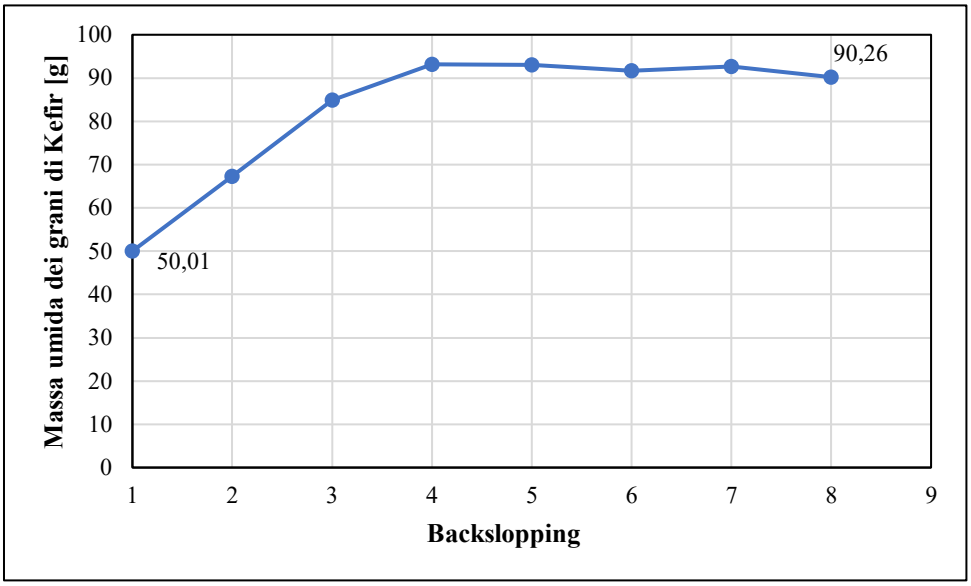


Figura 6.11 Variazione della massa umida dei grani negli 8 BS.

6.2 Pre-trattamenti

In questo paragrafo vengono riportati i risultati dei parametri utilizzati per la scelta del pre-trattamento da effettuare. Nella Tabella 6.2 sono riassunti tutte le caratteristiche dei diversi pre-trattamenti.

Tabella 6.2 Caratteristiche dei diversi pre-trattamenti.

Caratteristica	PT-BP	PT-AP	PT-SP	PT-EP	PT-ESP
Volume campione (mL)	50	50	50	50	50
%TS substrato	10	10	10	10	10
NaOH 0,1 M (mL)	21	-	-	-	-
HCl 1 M (mL)	-	0,6	-	-	-
$CaCl_2$ 1 M (mL)	-	-	22,5		20% m/m^a
Mix Enzimatico	-	-	-	1% m/m^b 10% m/m^b	1% m/m^c
Tempo di agitazione (h)	3	3	3	3	3

[a] l'unità di misura non è il volume (mL), bensì la percentuale di massa inserita rispetto al peso secco (in massa) del mix enzimatico;

[b] sono state effettuate due diverse prove con concentrazioni differenti. Inoltre l'unità di misura non è il volume (mL), bensì la percentuale di massa inserita rispetto al peso secco (in massa) del substrato;

[c] l'unità di misura non è il volume (mL), bensì la percentuale di massa inserita rispetto al peso secco (in massa) del substrato.

Una volta eseguite tutte le diverse prove di pre-trattamento, sono stati misurati i gradi Brix e la densità ottica allo spettrofotometro, per scegliere quello che meglio idrolizzasse l'amido presente nel substrato.

Per quanto riguarda i gradi Brix, si è ricercato il trattamento che desse il valore più alto, in quanto questo, come già detto nel Paragrafo 5.2.3, ci dà un'indicazione degli zuccheri presenti in soluzione. Mentre per la misura di densità ottica si è ricercato il trattamento che avesse il valore più alto nel range dei 440-460 nm in quanto è stato studiato da [30] che il glucosio ha il suo picco di assorbanza nel range di lunghezza d'onda 440-460 nm. Per conferma è stata eseguita una misura di OD per due soluzioni di glucosio a diverse concentrazioni, confermando che il picco massimo si ha nel range sopracitato (Figura 6.12).

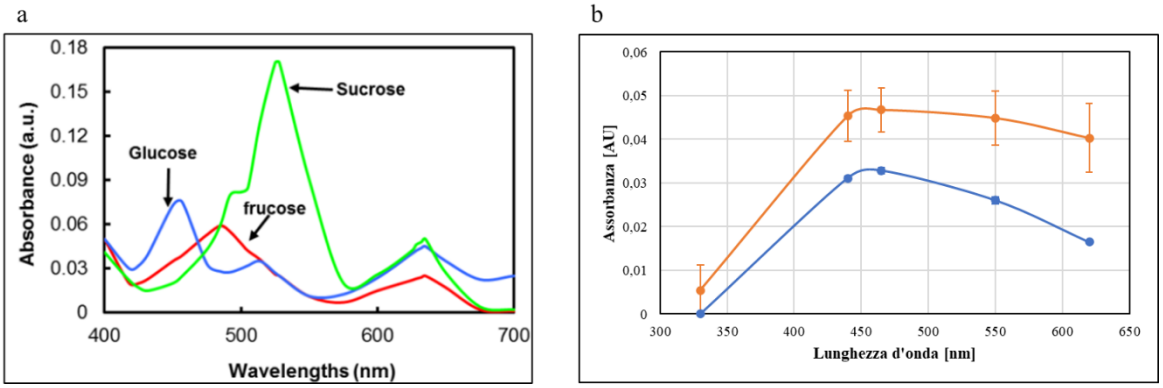


Figura 6.12 (a) Assorbanza del glucosio e di altri zuccheri studiati da [30]. (b) Misure di assorbanza di due soluzioni a diverse concentrazioni di glucosio.

Nelle Figure 6.13 e 6.15 sono riportate le misure di OD dei 6 test effettuati, mentre nelle Figure 6.14 e 6.16 i risultati dei gradi Brix.

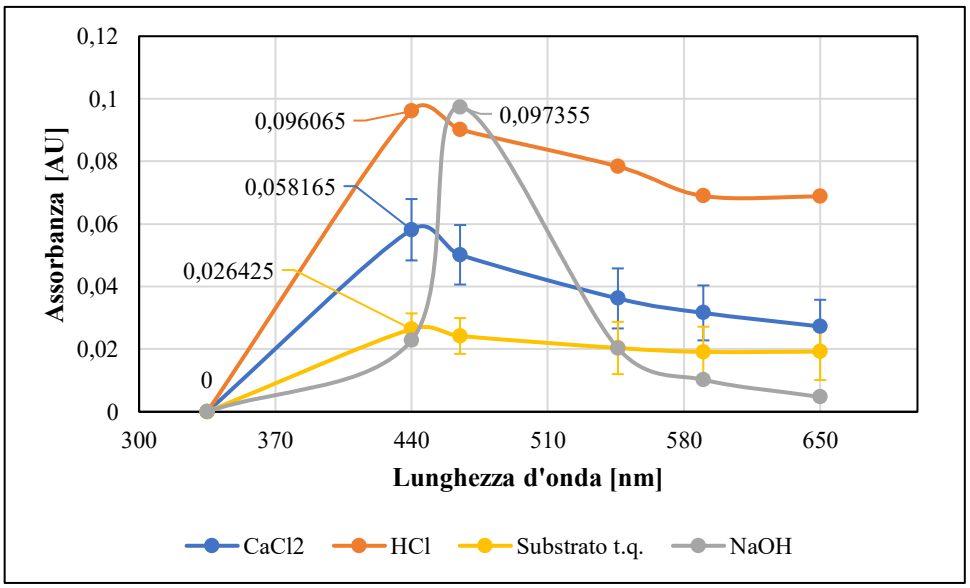


Figura 6.13 Misura dell'OD per 3 dei 6 test.

Da questa misura, il valore più alto nel range d'interesse, è risultato essere per il trattamento basico con NaOH.

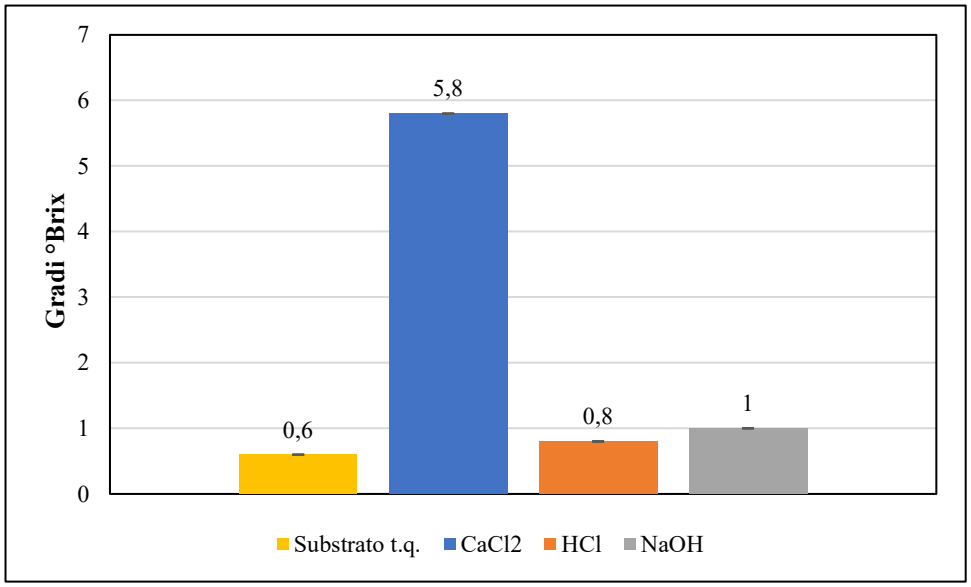


Figura 6.14 Misura dei Gradi °Brix per 3 dei 6 test.

Anche da questa misura, il valore che più è risultato essere alto è il trattamento basico con NaOH.

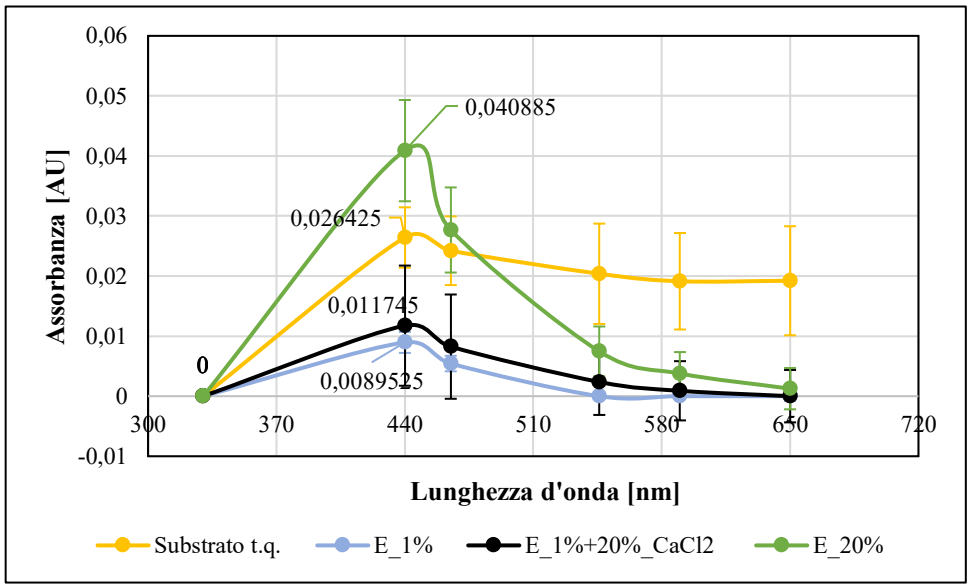


Figura 6.15 Misura dell'OD per 3 dei 6 test.

Per quanto riguarda invece le altre 3 tipologie di pre-trattamento, il valore più alto per l'OD nel range d'interesse, è stato per il trattamento enzimatico al 20 % *m/m*. Questo valore però è risultato inferiore a quello risultante dal trattamento basico con NaOH.

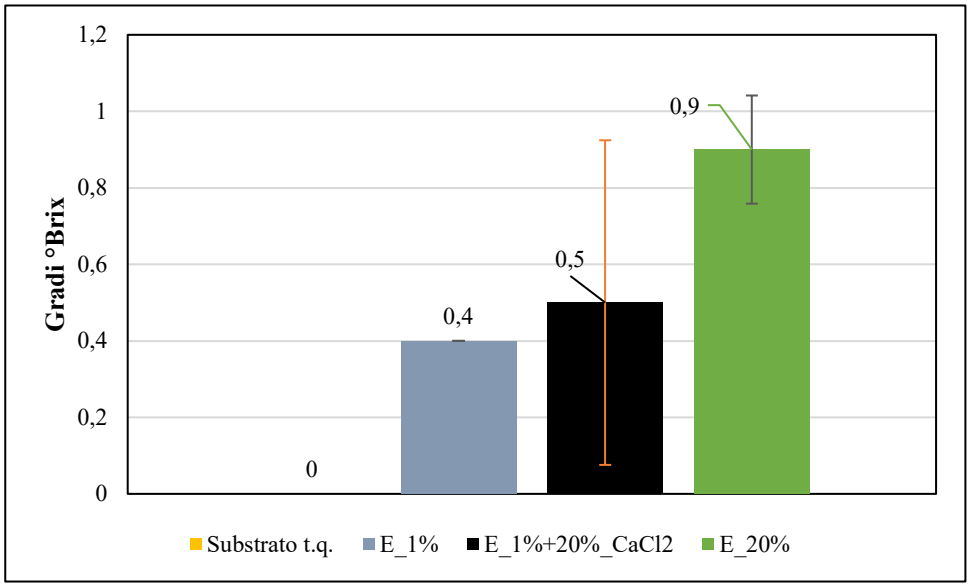


Figura 6.16 Misura dei Gradi °Brix per 3 dei 6 test.

Stesso discorso per i gradi Brix, per i quali il valore più alto ottenuto è stato per il trattamento basico.

Una volta scelto il trattamento basico, è stato poi effettuato un ulteriore studio per comprendere come questo avanzasse nelle 24 ore. È stato notato che il valore massimo di OD nel range 440-460 nm è risultato dopo 7 ore di pre-trattamento (Figura 6.17).

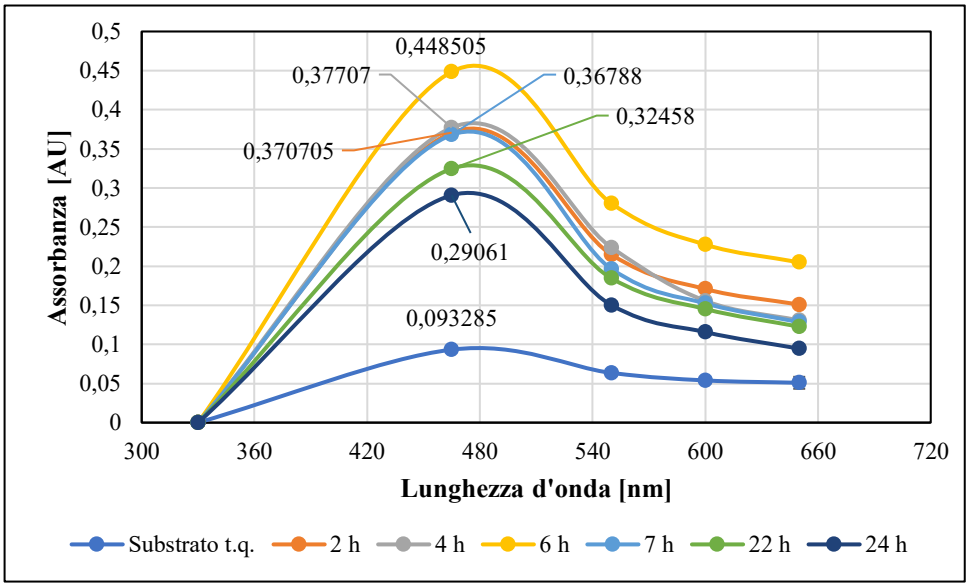


Figura 6.17 Variazione nel tempo della misura dell'OD durante le 24 ore di trattamento con NaOH.

Alle 24 ore invece, questo è stato leggermente inferiore, probabilmente a causa dell'effetto gelificante che la soda ha sull'amido (Figura 6.18) il quale effetto potrebbe portare a sedimentazione dell'amido e degli zuccheri.

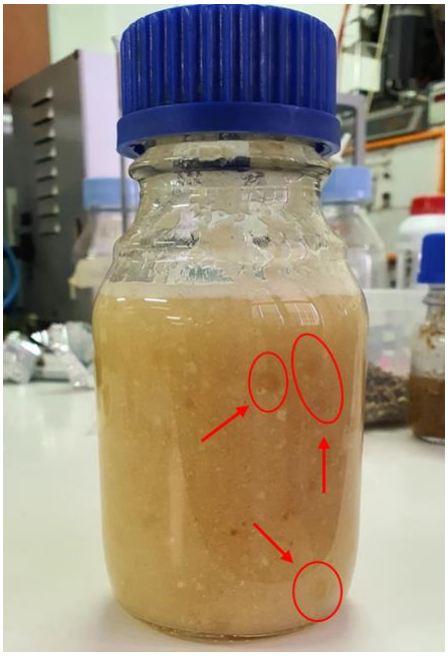


Figura 6.18 Substrato pre-trattato per 24 ore con NaOH. Si possono notare alcune parti gelificate.

La misura dei gradi Brix invece, riportata in Figura 6.19, è risultata costante dalle 2 ore di trattamento fino alle 24 ore.

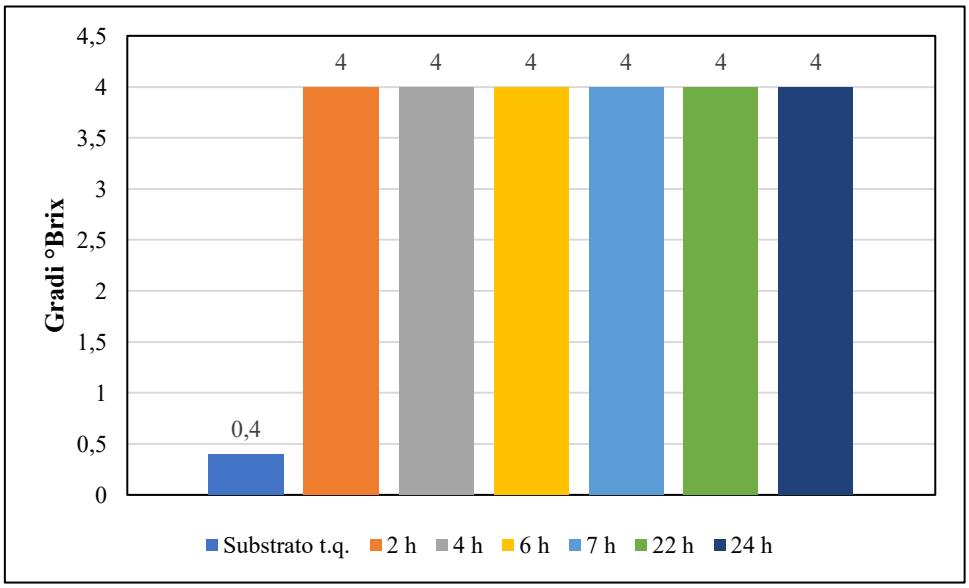


Figura 6.19 Variazione nel tempo della misura dei Gradi °Brix durante le 24 ore di trattamento con NaOH.

Qui di seguito infine, sono riportate due fotografie eseguite al microscopio. La figura 6.10 fa riferimento al substrato grezzo.

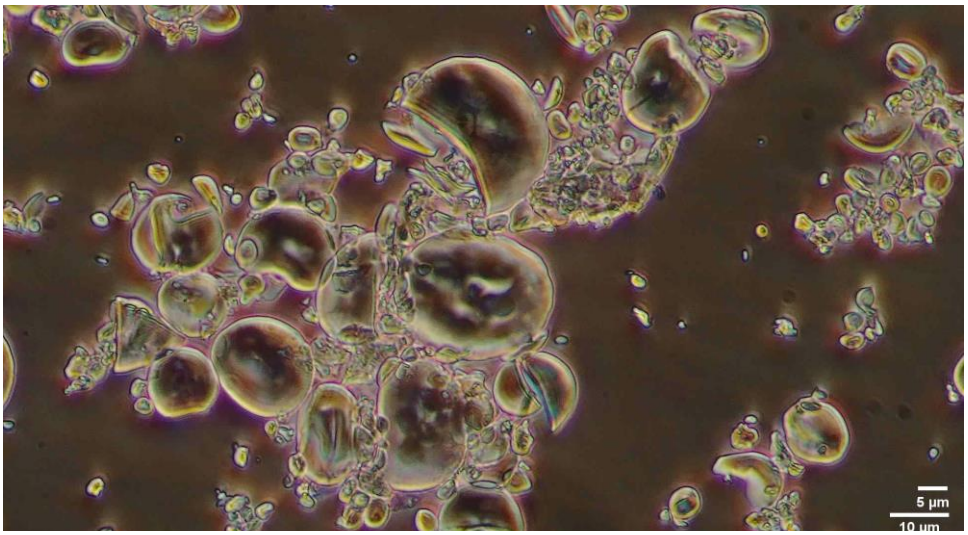


Figura 6.20 Micrografia del substrato t.q. (10% di TS) al tempo zero (x60).

Mentre la Figura 6.21 al substrato trattato con NaOH dopo 24 ore.

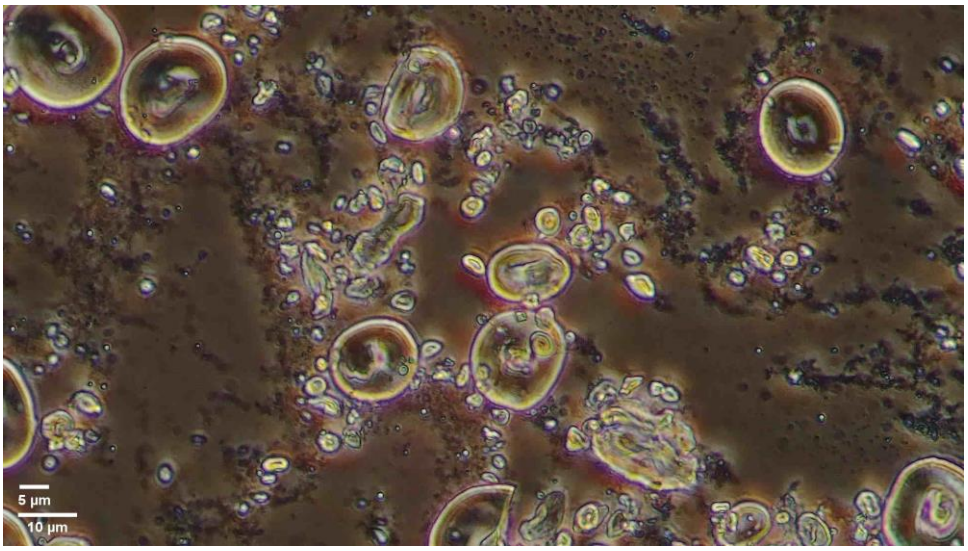


Figura 6.21 Micrografia del substrato (10% di TS) dopo 24 ore di trattamento con NaOH (x60).

Nonostante il risultato riportato in Figura 6.17, è stato scelto di pre-trattare il substrato per 24 ore. Questa scelta è stata anche dovuta al fatto che a seguito dell'analisi delle immagini dopo le 24 ore (Figura 6.21) è stato notato come la quantità di pezzi di amido con dimensione più piccola fosse maggiore rispetto al substrato al tempo zero (Figura 6.20), ed inoltre è stato interessante notare la presenza di una sorta di "vuoto" al centro dell'amido nel substrato pre-trattato per 24 ore (Figura 6.22).

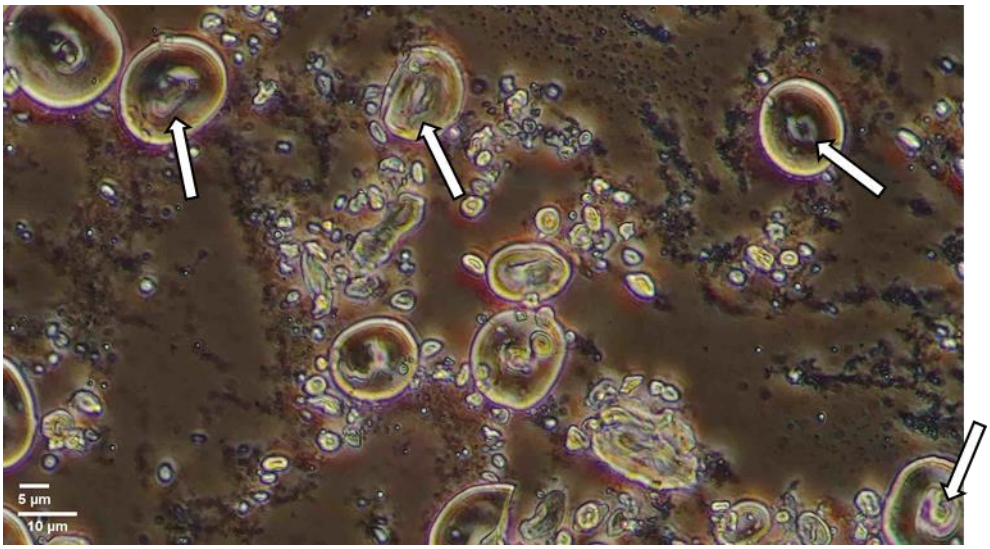


Figura 6.22 Micrografia del substrato (10% di TS) dopo 24 ore di trattamento con NaOH (x60) con indicati i "vuoti".

Questo "vuoto", è stato un ulteriore fattore di scelta per la durata del trattamento, in quanto dopo una ricerca in letteratura è stato ritrovato anche in alcune pubblicazioni.

In particolare, dalle analisi di immagini effettuate al SEM da [31], delle quali una viene riportata in Figura 6.23, si possono notate delle rotture al centro dell'amido, proprio in corrispondenza dei "vuoti" indicati in Figura 6.22 e visti con il microscopio ottico riportato in Figura 5.13.

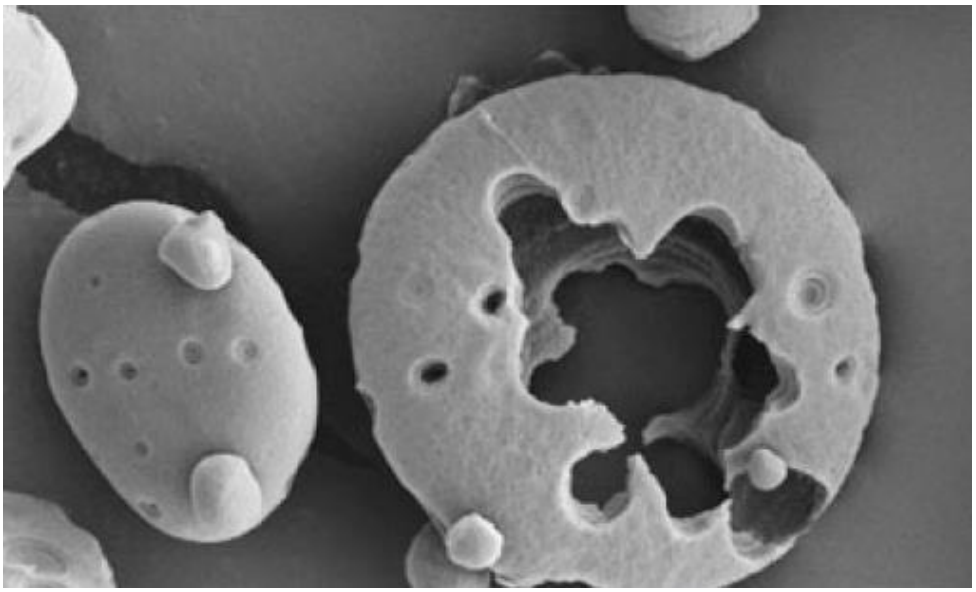


Figura 6.23 Grano idrolizzato trattato con NaOH. Tratto da [31].

6.3 Prove di fermentazione

In quest'ultimo paragrafo sono riportati i risultati dei test di fermentazione. Prima di procedere però con il mostrare i risultati, bisogna specificare che i test sono chiamati con ordine dall'uno al tre, senza considerare quindi quello effettuato senza il pre-trattamento dei substrato. Di questo verranno riportati i risultati nell'Appendice C. Inoltre ogni qual volta si riportano i risultati (per esempio dei TS iniziali) per un determinato inoculo, questi sono da considerarsi come una media dei test effettuati nelle stesse condizioni (come si è già accennato nel paragrafo 5.3.3 riguardo i duplici test effettuati nelle stesse condizioni). Infine, l'ultima cosa da precisare è che i dati riportati nel successive tabelle, fanno riferimento alle prime 48 ore di fermentazione in modo da confrontare il tutto sulle stesse ore di test. In Tabella 6.3 sono riportate le condizioni operative delle prove di fermentazione.

Tabella 6.3 Condizioni operative.

Parametri	Test WK	Test SFB	Test WK + SFB
Volume totale bottiglia (mL)	500	500	500
Volume totale del substrato (mL)	200	200	200
Inoculo (% *v/v*)	10	10	10 (5+5 per quanto riguarda la prima prova)
Velocità di agitazione (rpm)	150	150	150
Temperatura (°C)	30	30	30

In queste prove di fermentazione è stata utilizzata una concentrazione di substrato (100 g/L) intermedia rispetto tra quella utilizzata in media nelle fermentazioni di WK (40-60 g/L) e quella utilizzata nella produzione di bioetanolo (170-200 g/L) la quale sarebbe stata sicuramente troppo elevata per le prove effettuate, a causa delle difficoltà accorse nell'idrolizzare completamente il substrato. Infatti, proprio quest'ultimo punto, è stato un altro obiettivo del mio lavoro, ossia cercare di capire le capacità idrolitiche dei due inoculi utilizzati (separatamente e insieme) dopo il pre-trattamento basico con NaOH.

Infine, prima di procedere con la descrizione dei risultati ottenuti durante le prove, in Figura 6.24 è mostrata l'analisi effettuata tramite HPLC del substrato pre-trattato.

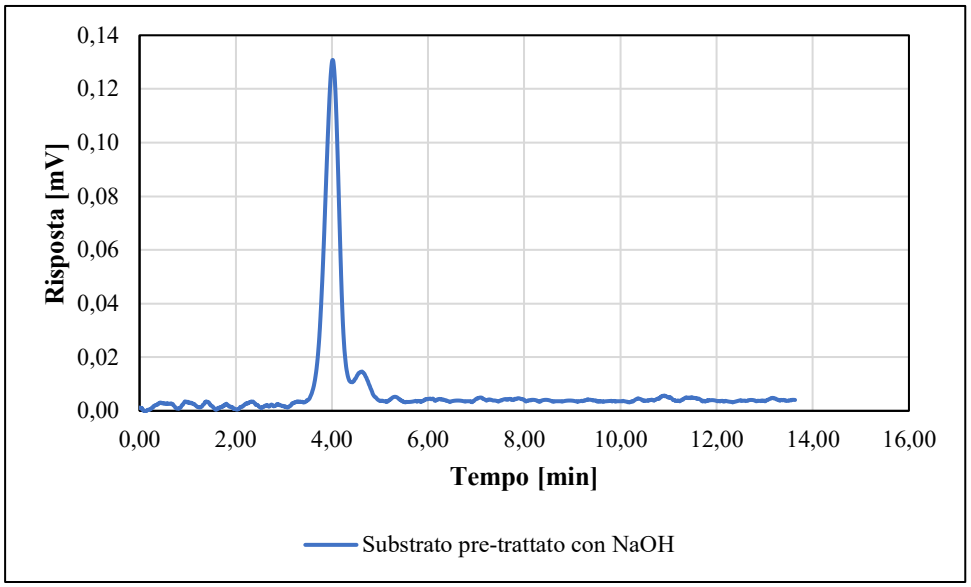


Figura 6.24 Risposta dell'analisi tramite HPLC del substrato pre-trattato.

Da questa analisi è risultato un percentuale di maltosio pari al 1,43%, come riportato in Tabelle 6.4. Percentuale che rappresenta quella ottenuta dalla sola idrolisi dopo il pre-trattamento basico.

Tabella 6.4 Percentuale maltosio nel substrato pre-trattato.

Prodotto	Substrato pre-trattato
Maltosio (%)	1,43 ± 0,11

6.3.1 Prima prova

Di seguito i risultati numerici e grafici della prima prova di fermentazione.

Tabella 6.5 Risultati della prima prova di fermentazione.

Parametri	Test WK	Test SFB	Test WK + SFB
pH inizio	5,16	5,16	5,16
pH fine	3,86	3,85	3,67
TS inizio (g/L)	84,55 ± 0,87	79,79 ± 0,85	82,11 ± 0,39
TS fine (g/L)	88,66 ± 2,17	86,88 ± 1,09	85,98 ± 3,64
g_NaOH/g_TS_iniziali (utilizzata)	0,32	0,32	0,32
Volume cumulativo di gas (mL)	99,50	168,87	130,28
% H_2 (*v/v*)	71,8	92,85	80,94
% CO_2 (*v/v*)	28,2	7,15	19,06
mL_H_2/mL_CO_2	2,55	13	4,25
mL_H_2/g_TS_iniziali	3,84	8,93	5,84
mL_CO_2/g_TS_iniziali	1,51	0,69	1,37

Con riferimento alla Tabella 6.5 si può notare come i TS finale siano maggiori dei TS iniziali. Questo effetto potrebbe essere causa della gelificazione accennata nel Paragrafo 6.8, insieme al fatto che nella prima prova i microrganismi non erano ancora adattati alle

condizioni operative e alla tipologia di substrato. Comunque si è rilevato all'interno dei sistemi produzione di acidi organici (dato che sarà riportato nell'Appendice C). Il comportamento dei TS durante i test potrebbe essere attribuito a queste cause, nonché a una errata calibrazione effettuata per la bilancia che richiede un'elevata sensibilità per queste misurazioni.

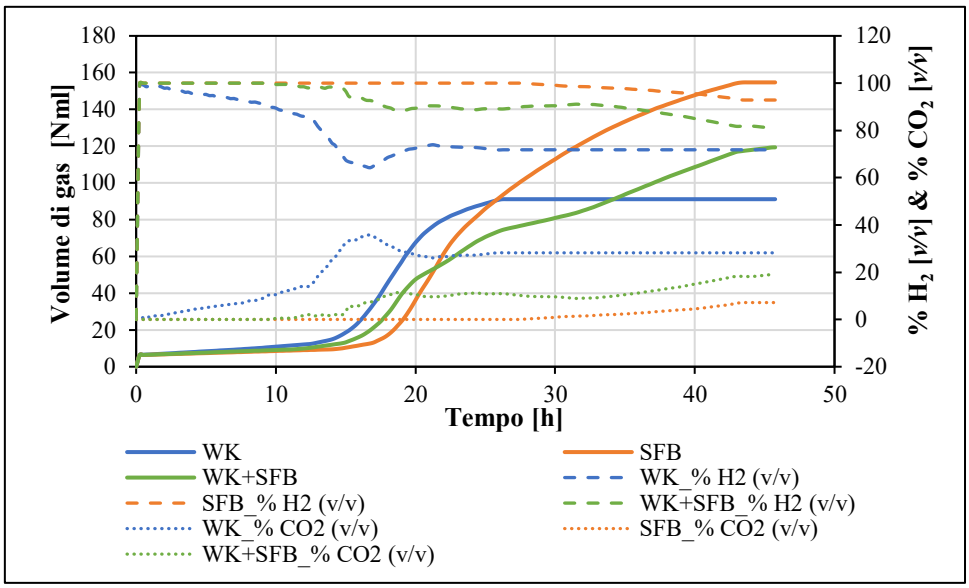


Figura 6.25 Evoluzione del gas e frazioni di idrogeno e anidride carbonica per ogni sistema nella prima prova.

Per quanto riguarda invece la produzione di gas, sia per quanto riguarda il volume cumulativo complessivo, sia per le percentuali di idrogeno e anidride carbonica, questi sono risultati essere sempre in un valore intermedio nella prova del microbioma (WK+SFB) rispetto alle prove con gli inoculi separati (Tabella 6.5 e Figura 6.25). In tutti e tre i casi però la percentuale di idrogeno è sempre stata molto più elevata rispetto alla CO_2 prodotta e su questo è stata fatta un'ipotesi: probabilmente nelle prime ore di fermentazione il metabolismo dei sistemi presenta tassi più elevati di deidrogenazione, che è associata ai primi metaboliti intermedi che vengono prodotti (es. piruvato), mentre nel tempo si attivano altre vie metaboliche che comprendono anche la produzione di CO_2. Anche se quest'ultima rimane soltanto un'ipotesi. In questa prima prova, per la produzione di gas e la percentuale di idrogeno non sembra esserci una miglioria del microbioma misto (WK+SFB), ma semplicemente si hanno risultati intermedi rispetto all'utilizzo dei singoli inoculi.

Tabella 6.6 Tempi di latenza delle 3 curve relative al volume totale di gas (prima prova).

Parametro	WK	SFB	WK+SFB
λ (h) – Tempo di latenza	13,14 ± 0,26	15,29 ± 0,30	10,56 ± 0,65

Questa cosa però non è stata osservata per il tempo di latenza (Tabella 6.6) che infatti è risultato più basso nel microbioma misto, portando così ad una prima ipotesi per la quale nel tempo di latenza questo microbioma ha apportato delle migliorie. Quest'ultimo fatto riflette probabilmente la ricchezza del microbioma, che per il WK+SFB comprende non

solo i batteri misti ma anche il ruolo dei lieviti (che rallentano il loro metabolismo a bassa temperatura ma non si arrestano). Purtroppo per questa prima prova non è stato possibile analizzare i brodi fermentati nell'HPLC e quindi le conclusioni e le ipotesi sull'efficienza del microbioma misto rispetto ai singoli inculi sia dal punto di vista della capacità idrolitica sia dal punto di vista della quantità di produzione di acidi organici ed etanolo, è stata limitata.

6.3.2 Seconda prova

Problema che non presente per la seconda prova, dove è stato possibile analizzare i brodi fermentati in modo da avere un quadro più generale sui risultati. Di seguito i risultati numerici e grafici della seconda prova di fermentazione.

Tabella 6.7 Risultati della seconda prova di fermentazione.

Parametri	Test WK	Test SFB	Test WK + SFB
pH inizio	6,80	6,80	6,80
pH fine	2,67	3,17	2,95
TS inizio (g/L)	98,73 ± 0,93	99,81 ± 1,50	101,96 ± 4,74
TS fine (g/L)	90,34 ± 2,34	91,23 ± 1,30	88,71 ± 8,44
g_NaOH/g_TS_iniziali (utilizzata)	0,28	0,28	0,28
Volume cumulativo di gas (mL)	196,37	217,11	290,80
% H_2 (*v/v*)	91,67	76,48	86,95
% CO_2 (*v/v*)	8,33	23,52	13,05
mL_H_2/mL_CO_2	11,00	3,25	6,66
mL_H_2/g_TS_iniziali	8,29	7,56	11,27
mL_CO_2/g_TS_iniziali	0,75	2,33	1,70

In questo caso i TS finali sono risultati essere minori rispetto a quelli iniziali (Tabella 6.7). Il consumo di TS è stato di circa l'8% per il WK, sempre dell'8% per lo SFB e del 13% per il microbioma WK+SFB. Il che è in linea con il fatto sopra menzionato riguardo alla presenza di lievito in quel microbioma. Già da questo dato si evince un primo valore aggiunto del microbioma misto rispetto all'utilizzo dei singoli inoculi.

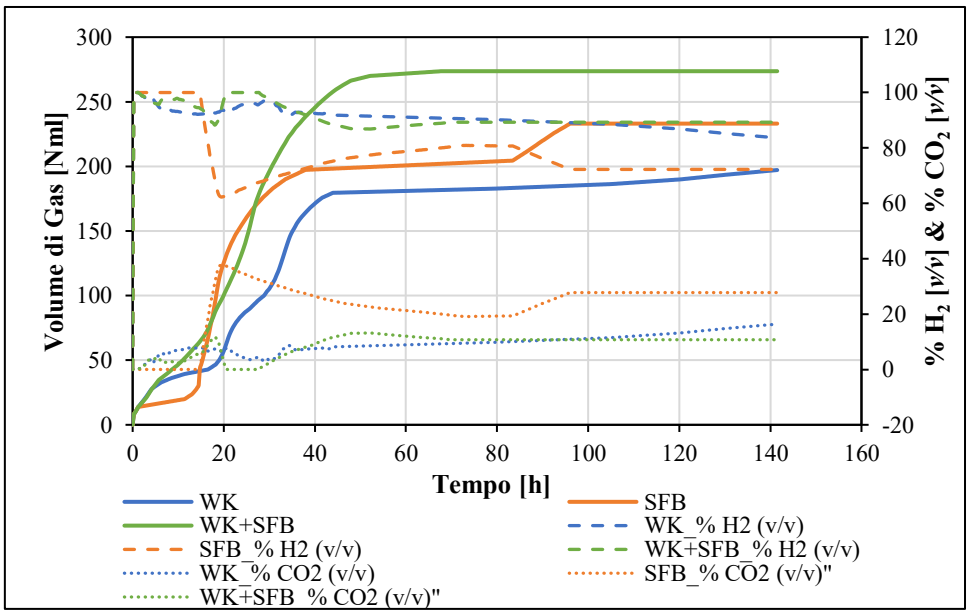


Figura 6.26 Evoluzione del gas e frazioni di idrogeno e anidride carbonica per ogni sistema nella seconda prova.

Valore aggiunto che è stato confermato anche per quanto riguarda la quantità totale di gas prodotto (Tabella 6.6 e Figura 6.26), maggiore nel caso del mix di inoculi. Mentre per quanto riguarda la percentuale di idrogeno, questa è risultata intermedia per il mix di inoculi.

Tabella 6.8 Tempi di latenza delle 3 curve relative al volume totale di gas (seconda prova).

Parametro	WK	SFB	WK+SFB
λ (h) – Tempo di latenza	6,58 ± 0,41	8,56 ± 0,42	7,30 ± 0,21

Per quanto riguarda il tempo di latenza (Tabella 6.8) esso è risultato intermedio nel caso del microbioma misto. Sebbene nel fitting di Gompertz, il parametro lambda (λ) sembri essere molto simile per i sistemi WK e WK+SFB, come osservato nella Figura 6.26, il sistema combinato sembra iniziare molto velocemente e la fase di ritardo sembra essere molto breve.

In Figura 6.27 sono riportati i 12 cromatogrammi dei sistemi fermentati.

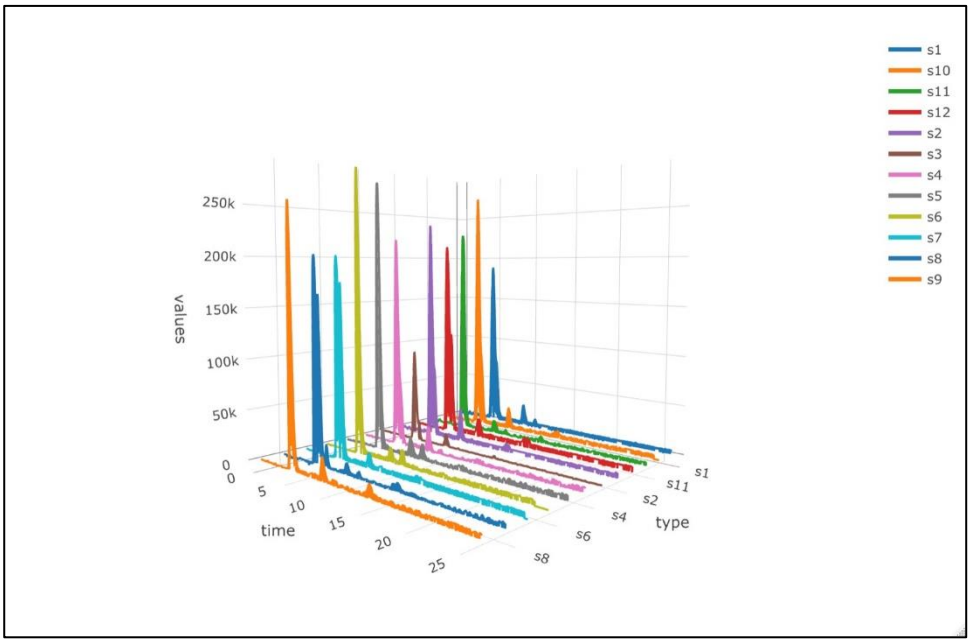


Figura 6.27 Cromatogramma dei 12 sistemi fermentati (seconda prova).

Di questi sistemi, si sono mediati i primi 4 (inoculo WK), i secondi 4 (SFB) e gli ultimi 4 (WK+SFB) ottenendo le percentuali di prodotti (rispetto a tutto il brodo di fermentazione) riportate in Tabella 6.9.

Tabella 6.9 Percentuale dei prodotti di fermentazione nella seconda prova di fermentazione.

Prodotto	WK	SFB	WK+SFB
Maltosio (%)	3,46 ± 1,27	4,9 ± 0,46	4,40 ± 0,52
Acido Lattico (%)	0,28 ± 0,16	0,20 ± 0,06	0,27 ± 0,07
Acido Acetico (%)	2,75 ± 0,39	5,84 ± 2,39	3,12 ± 0,08
Etanolo (%)	0,19 ± 0,06	0,34 ± 0,03	0,41 ± 0,07

La percentuale di etanolo medio presente nei brodi inoculati con il mix è risultata maggiore rispetto agli altri due casi. Probabilmente a causa della presenza di lieviti e SFB, questi ultimi forniscono capacità metaboliche per idrolizzare gli zuccheri e rendere disponibile il substrato per i lieviti.

Infine, per quanto riguarda la percentuale di acidi organici e di maltosio (Tabella 6.9), i risultati delle prove con il microbioma misto sono stati intermedi.

6.3.3 Terza prova

Prima di commentare quest'ultima prova, bisogna premettere che gli inoculi (quindi i 12 sistemi delle seconda prova) utilizzati sono stati stoccati per 45 giorni alla temperatura di 4°C e questo ha sicuramente influenzato i risultati in quanto basti pensare che a queste temperature i microrganismi del WK non sono nelle loro condizioni ottimali, problema presente anche per gli SFB che però a differenza dei primi hanno la capacità, come già scritto nel Capitolo 4, di sporulare quando si trovano in condizioni non ottimali.

Di seguito i risultati numerici e grafici della terza prova di fermentazione.

Tabella 6.10 Risultati della terza prova di fermentazione.

Parametri	Test WK	Test SFB	Test WK + SFB
pH inizio	7,45	7,45	7,45
pH fine	3,78	3,63	3,21
TS inizio (g/L)	92,04 ± 0,68	91,34 ± 0,43	91,14 ± 0,90
TS fine (g/L)	86,35 ± 1,20	84,22 ± 2,94	81,90 ± 2,23
g_NaOH/g_TS_iniziali (utilizzata)	0,46	0,46	0,46
Volume cumulativo di gas (mL)	114,83	251,50	170,01
% H_2 (*v/v*)	96,62	33,4	95,44
% CO_2 (*v/v*)	3,38	66,6	4,56
mL_H_2/mL_CO_2	26,63	0,50	20,94
mL_H_2/g_TS_iniziali	5,48	4,18	8,09
mL_CO_2/g_TS_iniziali	0,19	8,34	0,39

Dalla Tabella 6.10 si possono notate le prime conseguenze di quanto appena detto sono già evidenti nelle percentuali di consumo di TS iniziali: circa il 6% per il WK, 8% per lo SFB e del 11% per il microbioma misto WK+SFB. Questi valori percentuali possono iniziare a dare delle indicazioni sul problema posto ad inizio Paragrafo, infatti per il WK e il microbioma misto il tasso di consumo di TS è diminuito, mentre per gli SFB è rimasto circa uguale (sembra confermare il fatto che gli SFB possono resistere bene il riposo a 4°C per 45 giorni grazie alle loro condizioni fisiologiche, inclusa la capacità di formare spore).

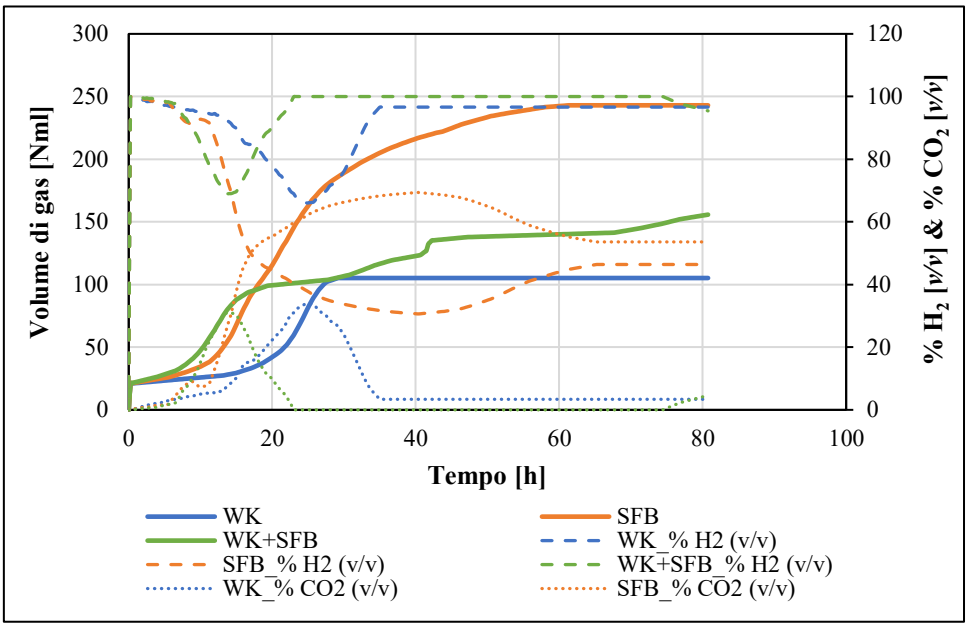


Figura 6.28 Evoluzione del gas e frazioni di idrogeno e anidride carbonica per ogni sistema nella terza prova.

Osservando la Tabella 6.10 e la Figura 6.28 si nota che anche le quantità totali di gas prodotto sono diminuite rispetto alla seconda prova e quella relativa al mix WK+SFB è tornata ad essere intermedia, come quantità massima, rispetto alle prove con i due singoli inoculi, mentre quella relativa al WK è diminuita di molto (probabilmente ancora a causa della premessa iniziale), anzi addirittura dopo circa 30 ore questi hanno smesso di produrre gas e il quantitativo finale cumulativo è risultato essere poco più alto della prima prova, dove però i microrganismi avevano ancora problemi di adattamento. Probabilmente se non ci fossero stati i 45 giorni di stoccaggio a 4°C, la prova con il mix avrebbe avuto ancora maggior produzione di gas. L'idrogeno invece, a differenza delle altre due prove non è stato prodotto in alta percentuale in tutti e 3 i casi, infatti nel caso del SFB è stato molto minore della media.

Tabella 6.11 Tempi di latenza delle 3 curve relative al volume totale di gas (terza prova).

Parametro	WK	SFB	WK+SFB
λ (h) – Tempo di latenza	5,48 ± 0,71	5,89 ± 0,21	4,16 ± 0,54

Per quanto riguarda il tempo di latenza invece (Tabella 6.11) esso è risultato minore nel caso del microbioma misto. Tuttavia, si osserva anche una capacità di adattamento a

lungo termine al substrato per tutti i sistemi, poiché le fasi di latenza diminuiscono costantemente lungo i cicli di fermentazione.

In Figura 6.29 sono riportati i 12 cromatogrammi dei sistemi fermentati.

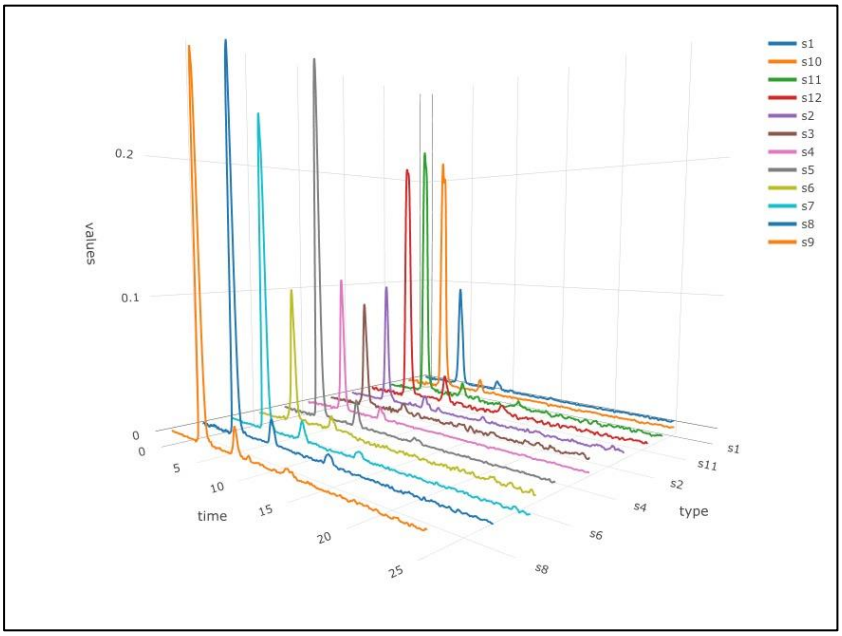


Figura 6.29 Cromatogramma dei 12 sistemi fermentati (terza prova).

Di questi sistemi si sono mediati i primi 4 (inoculo WK), i secondi 4 (SFB) e gli ultimi 4 (WK+SFB) ottenendo le percentuali di prodotti (rispetto a tutto il brodo di fermentazione) riportate in Tabella 6.12.

Tabella 6.12 Percentuale dei prodotti di fermentazione nella terza prova di fermentazione.

Prodotto	WK	SFB	WK+SFB
Maltosio (%)	1,55 ± 0,11	3,80 ± 0,31	4,16 ± 0,23
Acido Lattico (%)	0,10 ± 0,03	0,24 ± 0,06	0,24 ± 0,12
Acido Acetico (%)	1,76 ± 0,37	-	2,24 ± 1,16
Etanolo (%)	0,03 ± 0,02	0,23 ± 0,17	0,31 ± 0,16

In quest'ultima prova, nonostante il problema dello stoccaggio a 4°C per 45 giorni, la percentuale di etanolo medio presente nei brodi inoculati con il mix, così come quella degli acidi organici e del maltosio, è risultata maggiore rispetto all'utilizzo dei singoli inoculi.

7 Conclusioni

Nel corso di questo lavoro di tesi è stata quindi studiata la possibile formulazione di un nuovo microbioma (lieviti-batteri) e se questo differisse rispetto all'utilizzo dei singoli inoculi dal punto di vista dell'efficacia sull'attività idrolitica e sulla produzione di etanolo, idrogeno ed acidi organici.

A fronte dei risultati ottenuti nelle tre principali prove di fermentazione, è emerso che:

- Il tempo di latenza è stato ridotto nell'utilizzare il microbioma misto. Solo una volta su 3 invece sono state ottenute differenze marginali rispetto ad un singolo inoculo;
- Il consumo dei TS, non considerando la prima prova, nella quale questi sono risultati più alti alla fine, nelle altre due, indipendentemente dalla percentuale di consumo, questo è sempre stato maggiore nel caso del microbioma misto;
- La percentuale di idrogeno con il microbioma WK+SFB come inoculo è risultata 2 volte su 3 intermedia rispetto ai singoli inoculi, mentre la resa in idrogeno (mL_H_2/g_TS_iniziali) è sempre stata maggiore nelle tre prove nel caso del microbioma misto;
- La quantità totale cumulativa di gas prodotto è risultata 2 volte su 3 intermedia per il microbioma misto, mentre solo nella seconda prova è risultata più alta;
- L'etanolo è risultato per i sistemi analizzati maggiore nel caso dell'utilizzo del microbioma misto come inoculo;
- Gli acidi organici mediamente sono sempre risultati più alti nel caso del microbioma misto;
- Il maltosio infine, è stato trovato 1 volta in quantità maggiore rispetto agli altri 2 inoculi (terza prova) e un'altra in percentuale intermedia (seconda prova).

Soffermandoci proprio sul maltosio, questo ci può dare un'indicazione sull'attività idrolitica in quanto l'amido durante la reazione di idrolisi viene scisso in maltosio e glucosio. Quindi ipotizzando 3 differenti casi:

- Il maltosio in alta percentuale potrebbe significare che c'è stata una buona attività idrolitica, ma questo non basta per fare conclusioni sull'attività idrolitica, perché in parallelo se i prodotti di fermentazione sono in bassa percentuale, potrebbe significare che solo il glucosio ottenuto dalla rottura dell'amido è stato metabolizzato e quindi il maltosio presente potrebbe non essere stato ancora idrolizzato in zuccheri più semplici e in realtà la capacità idrolitica dopo la prima fase di rottura dell'amido (ottenuta con il trattamento basico) non è stata delle migliori;
- Nel secondo caso invece, quello in cui il maltosio è presente in minor quantità rispetto agli altri casi e in parallelo alcuni prodotti di fermentazione sono presenti in maggior quantità (sempre confrontando le diverse prove con inoculi diversi), con l'ipotesi che il pre-trattamento abbia scisso l'amido in maniera omogenea (e quindi le quantità di partenza di maltosio e glucosio siano uguali per tutte le prove), questo potrebbe significare che la minor quantità di maltosio insieme alla maggior percentuale di prodotti di fermentazione, indichi una ulteriore scissione del maltosio in zuccheri più semplici da parte dei microrganismi e quindi una migliore capacità idrolitica;
- Il terzo invece è quando si ha alta percentuale di maltosio insieme ad un alta presenza di prodotti di fermentazione, il che potrebbe star ad indicare una ancor migliore attività idrolitica perché è come se i microrganismi stessero si rompendo il maltosio in zuccheri più semplici da poi metabolizzare, ma contemporaneamente c'è una

continua fasi di idrolisi dell'amido e quindi una conseguente quasi stabilità della percentuale di maltosio.

Inoltre, considerando la terza prova WK metabolicamente non molto attiva, dato che la produzione di gas è terminata dopo circa 30 ore (Figura 6.28) e le percentuali di acidi organici ed etanolo sono risultate molto basse (Tabella 6.12), in aggiunta all'analisi tramite HPLC eseguita per il solo substrato pre-trattato (Figura 6.24), dove la percentuale di maltosio è risultata pari al 1,43% (Tabella 6.4), è possibile fare una prima conclusione:

- Valori percentuali di maltosio maggiori del 1,4-1,5 % indicano la presenza di attività idrolitica da parte dei microrganismi.

Con queste differenti ipotesi, in aggiunta ai risultati sopra elencati e in anche alla seguente ipotesi :

- Sembrerebbe che nel caso di inoculi provenienti da condizioni non ottimali, come nella terza prova, l'utilizzo del microbioma misto porta ad una compensazione di questo problema, con produzioni in fase liquida maggiori dei casi con i singoli inoculi (Tabella 6.12).

Si può concludere che l'attività idrolitica e le produzioni di acidi organici ed etanolo siano migliorate nel caso dell'utilizzo del microbioma misto, inoltre considerando i risultati riportati sui tempi di latenza e sui mL di idrogeno prodotti per ogni grammo di TS iniziali, l'utilizzo del microbioma misto porta sicuramente a delle migliorie.

Sicuramente però, bisogna innanzitutto cercare di aumentare le quantità ottenute di idrogeno, acidi organici ed etanolo che in questo lavoro sono state basse principalmente per problemi di idrolisi e poi in quanto non sono state effettuate operazioni aggiuntive atte a migliorare la produzione, tutto è stato eseguito e lasciato andare "*come la natura ha deciso*". Infatti alcuni spunti per eventuali lavori futuri potrebbero essere :

- Centrifugazione e concentrazione degli inoculi, al fine di aumentare la biomassa inoculata nella prima prova;
- Controllare il pH. Questo infatti questa è stata una limitazione della configurazione sperimentale (AMPTS II) che permette la scansione di diversi sistemi inoculo, che purtroppo manca del controllo del pH per i sistemi. Infatti, il pH è finito circa allo stesso valore, molto acido e non ottimale per i microrganismi presenti, probabilmente inibendo quindi la loro attività metabolica e idrolitica. Il prossimo passo è scegliere i sistemi più performanti nella presente scala e implementare un controllo di pH in continuo per ottenere ulteriori approfondimenti;
- Utilizzare specifici enzimi per l'incremento di produzione di etanolo oppure per migliorare le capacità idrolitiche dei microrganismi.

Appendice A : Ulteriori test e analisi effettuati durante la fermentazione dei grani di kefir d'acqua

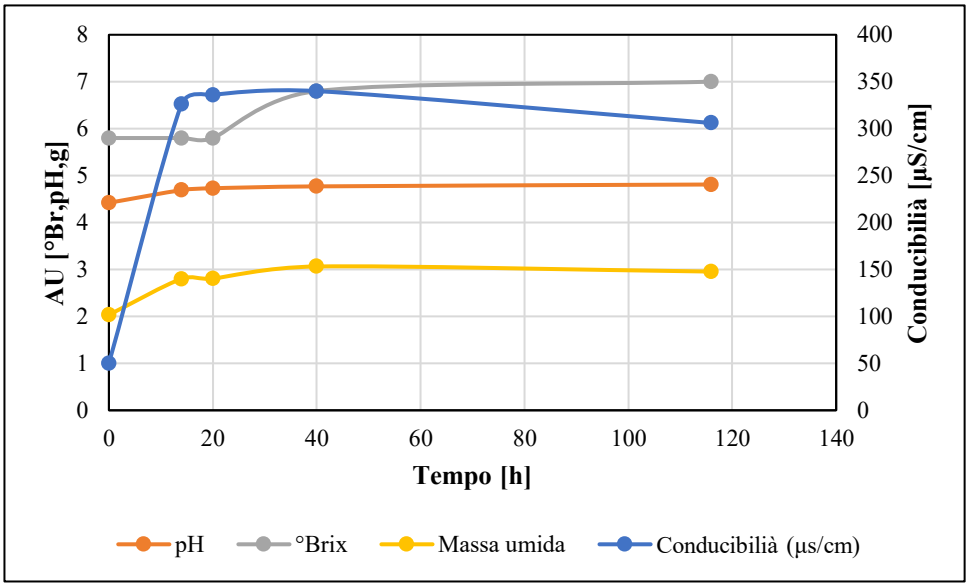


Figura 7.1 Prima prova di fermentazione della prima tipologia di grani di kefir d'acqua con il substrato a 60 g/L.

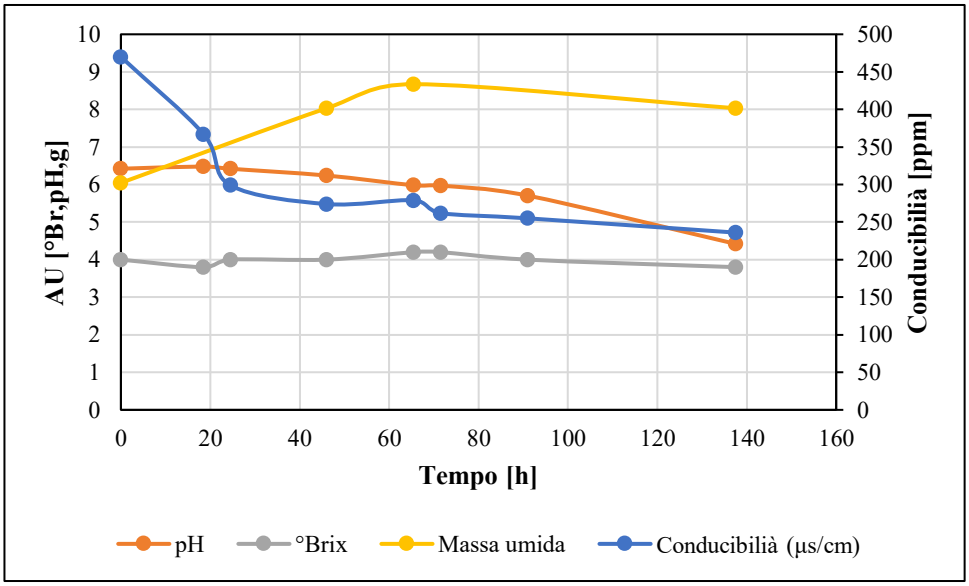


Figura 7.2 Seconda prova di fermentazione della prima tipologia di grani di kefir d'acqua con il substrato a 40 g/L.

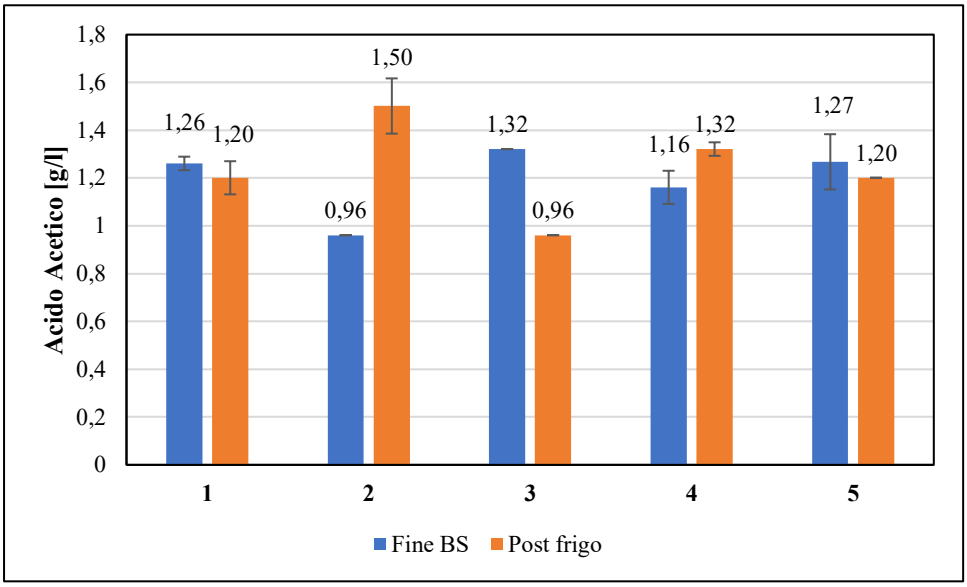


Figura 7.3 Variazione della concentrazione di Acido Acetico all'interno dei surnatanti dei primi 5 backslopping dopo uno stoccaggio a 4°C per più di 20 giorni.

Osservando la Figura 7.3 si possono notare due differenti aspetti: il primo è che all'interno dei surnatanti effettivamente è presente biomassa, e due come questa, nonostante la bassa temperatura di stoccaggio, presenta ancora attività metabolica, attraverso la quale alcune volte ha portato ad un abbassamento della concentrazione rispetto alla fine del BS corrispondente e altre invece ad un innalzamento. Questi risultati sono riscontrabili anche osservando la Figura 7.4.

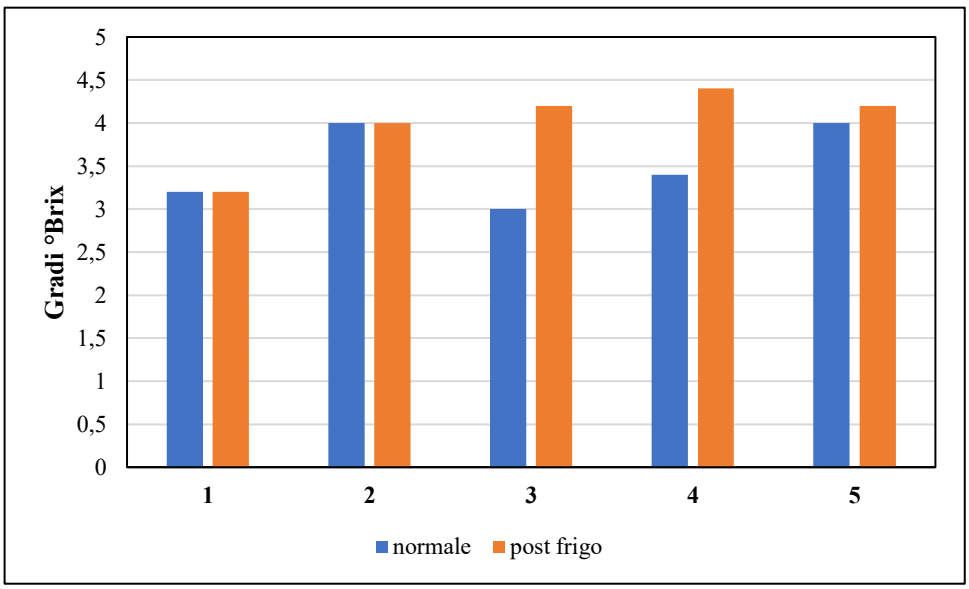


Figura 7.4 Variazione dei gradi Brix all'interno dei surnatanti dei primi 5 backslopping dopo uno stoccaggio a 4°C per più di 20 giorni.

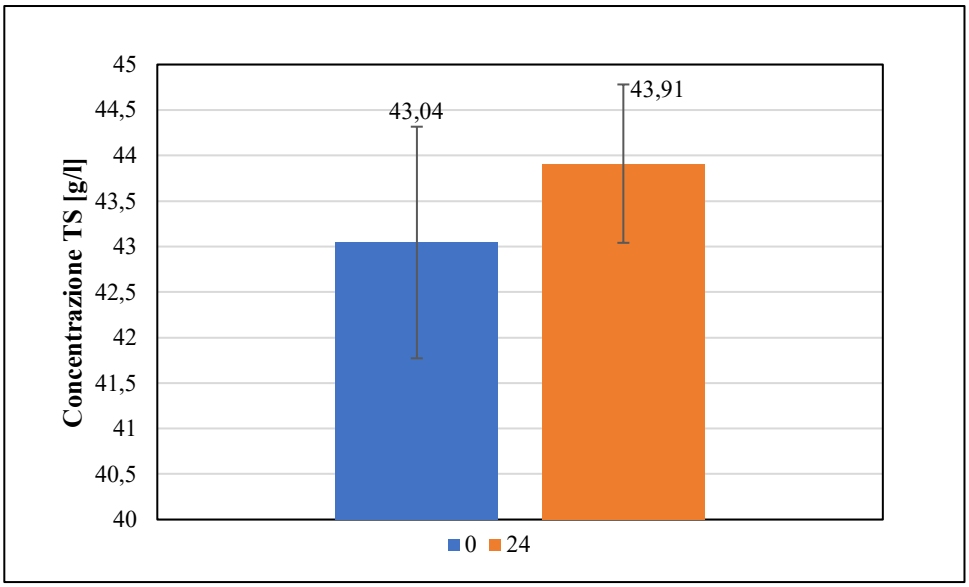


Figura 7.5 Variazione nelle 24 ore dei TS durante il BS numero 6.

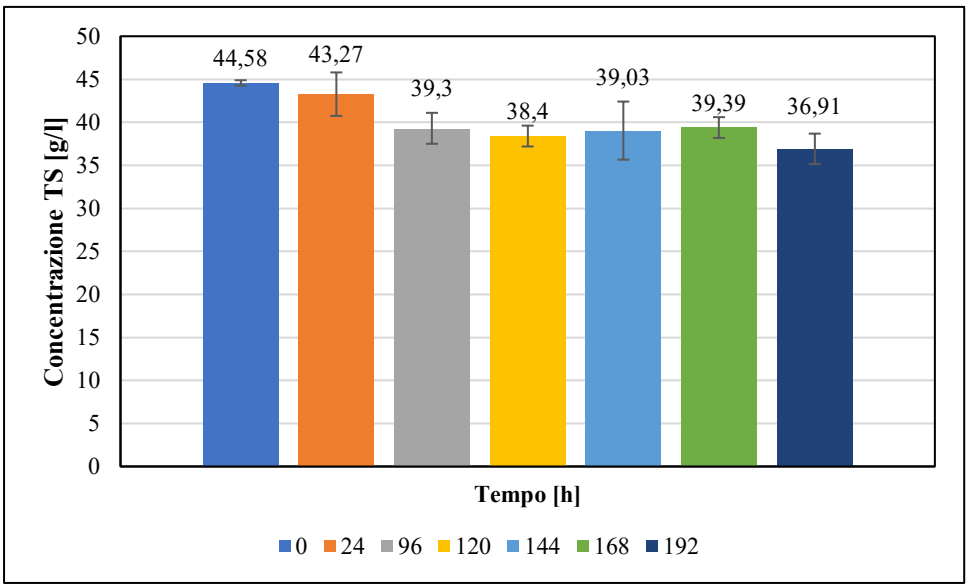


Figura 7.6 Variazione nelle 192 ore dei TS durante il BS numero 7.

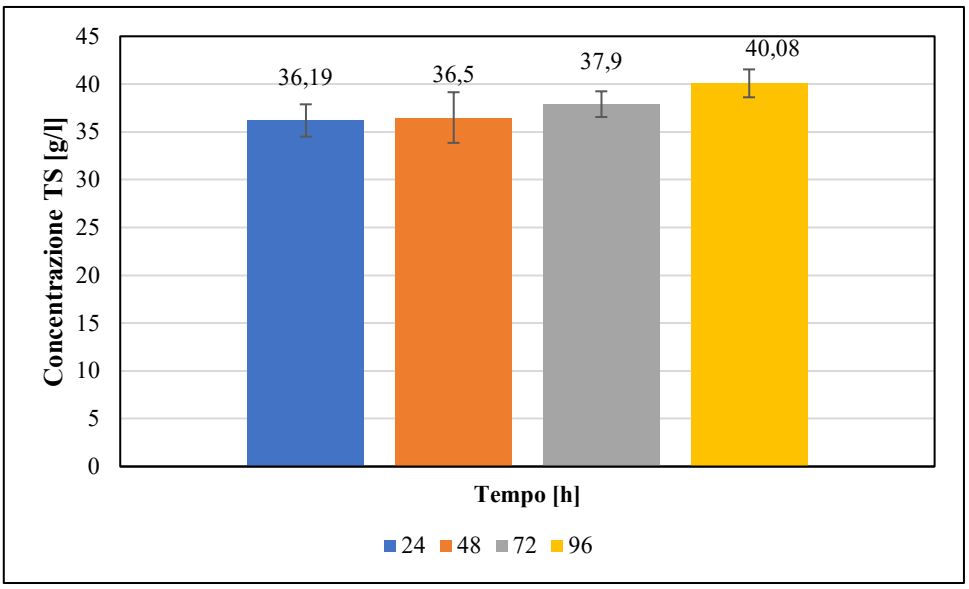


Figura 7.7 Variazione nelle 96 ore dei TS durante il BS numero 8.

Attraverso le Figure 7.8 e 7.9 è stata ipotizzato che i lieviti all'interno dei grani che vengono stoccati per molto tempo in condizioni non ottimali, tendono a modificare la loro morfologia in forme di ife, probabilmente al fine di dare un sostegno strutturale all'EPS.

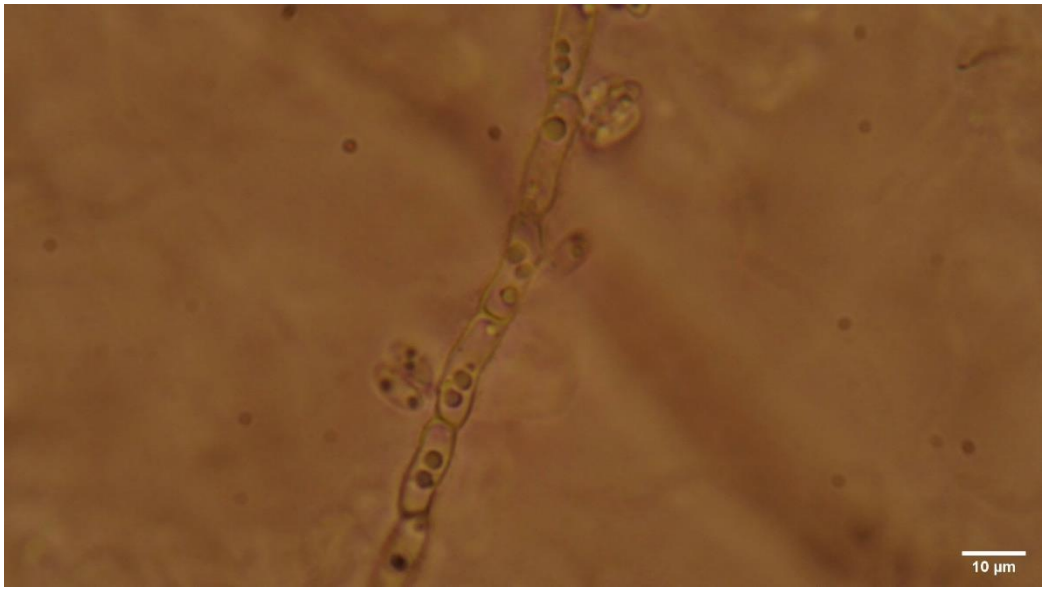


Figura 7.8 Micrografia di grani stoccati a 4°C per 3 mesi. Particolare su lieviti con morfologia di ife (x60).

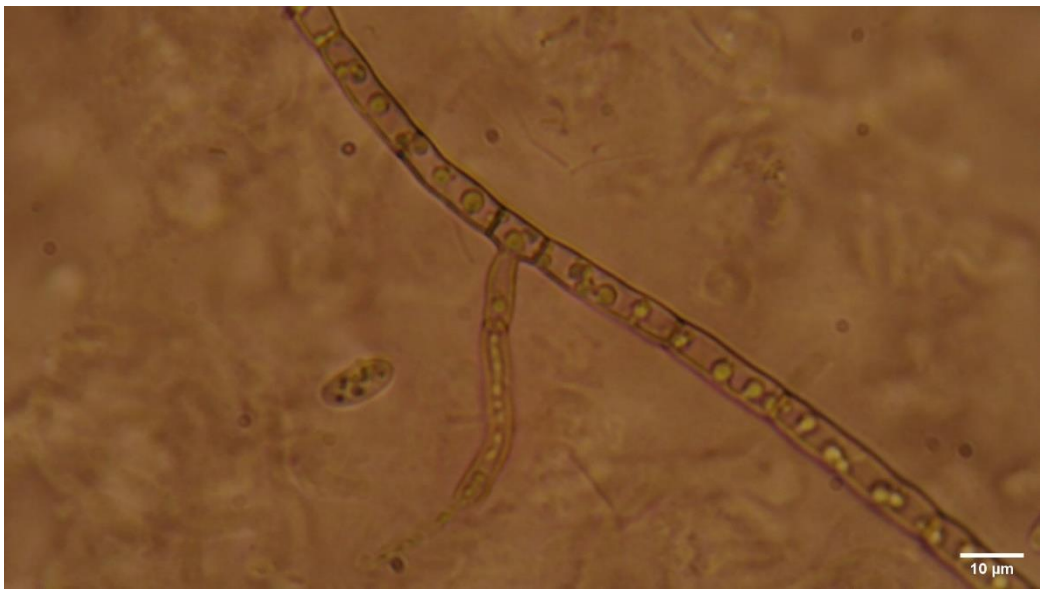
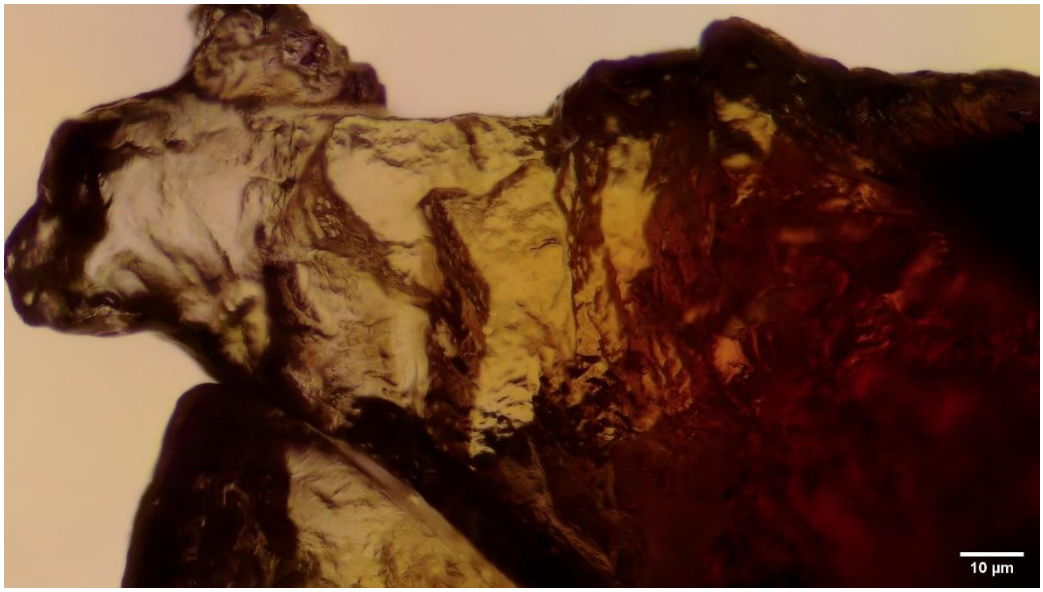


Figura 7.9 Micrografia di grani stoccati a 4°C per 3 mesi. Particolare su lieviti con morfologia di ife (x60).



F**igura 7.10** Micrografia e "post processing" attraverso la tecnica del "***Focus stacking***" eseguita tramite Photoshop 2021 di un grano post stufa a 105°C per 24 ore (x4).

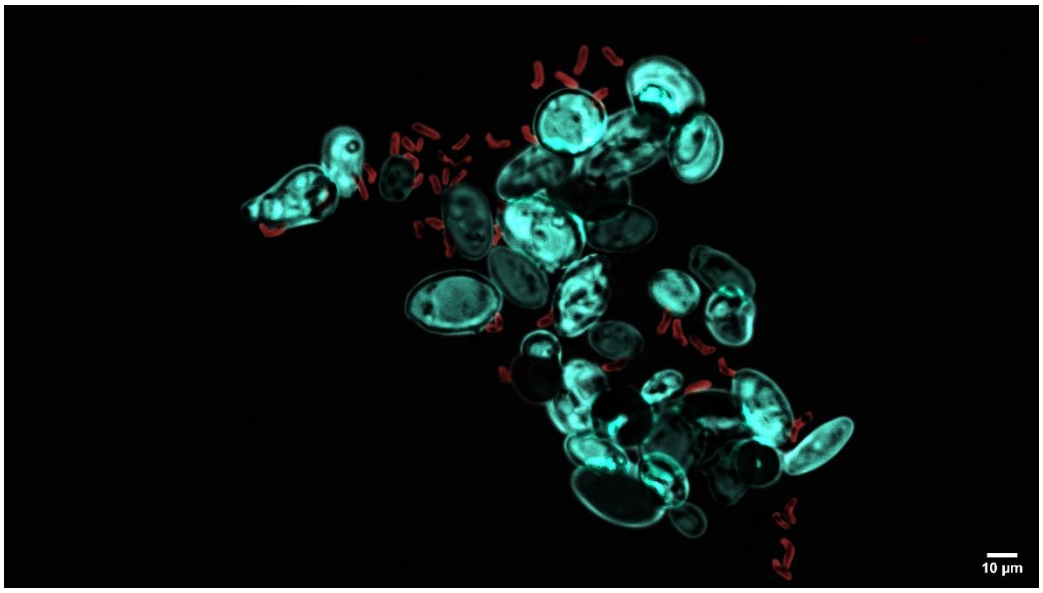


Figura 7.11 Micrografia e "post processing" tramite Photoshop 2021 del surnatante finale del BS 2 (x60). In azzurro i lieviti e in rosso i batteri.

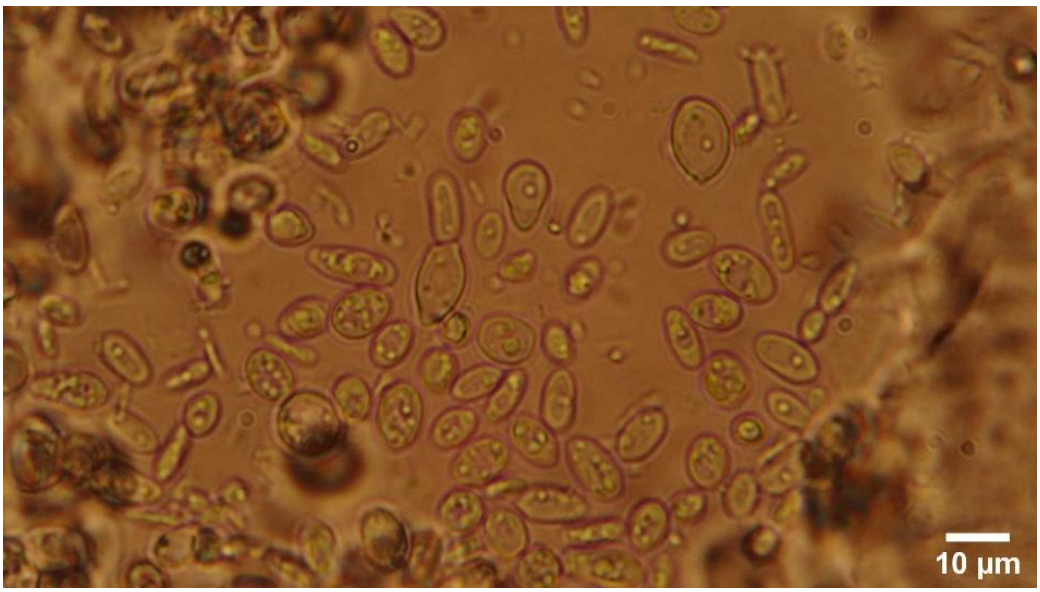


Figura 7.12 Micrografia di un surnatante stoccato a 4°C per più di 20 giorni (x60). Si può notare la massiccia presenza di vacuoli all'interno dei lieviti e quindi non nella loro forma vegetativa, simbolo della non ottimale condizione di stoccaggio.

Appendice B : Scelta della percentuale di TS da utilizzare per il substrato

Di seguito, nelle Figure 8.13 e 8.14 sono riportate le misure effettuate nella scelta della percentuale di TS da utilizzare per il substrato.

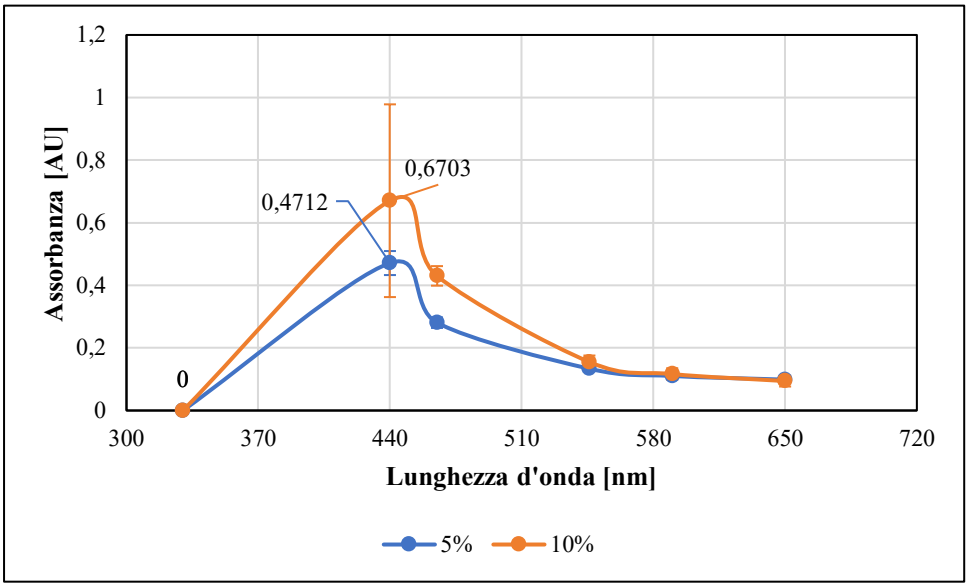


Figura 7.13 Misura dell'OD per i due diversi test.

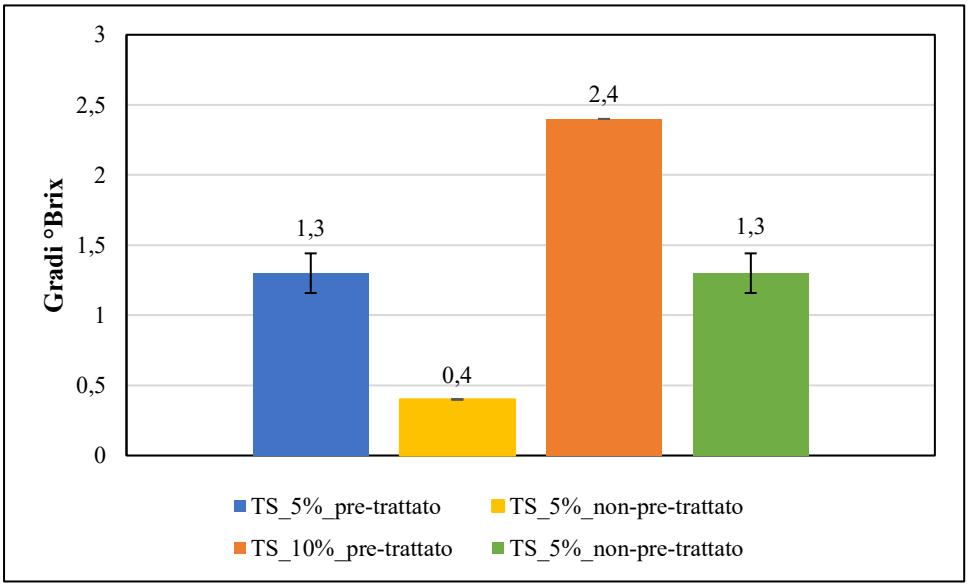


Figura 7.14 Misura dei gradi Brix per i due diversi test.

Tabella 7.1 Informazioni nutrizionali del mix enzimatico utilizzato nello studio dei pre-trattamenti.

	x dose/die
	(3 cps. veg.)
Miscela enzimatica	600 mg
che fornisce:	
Amilasi	300 mg
Proteasi	158 mg
Lactasi	30 mg
Pectinasi	24 mg
Lipasi	23 mg
Bromelina	15 mg
Cellulasi	15 mg
Papaina	9 mg
Invertasi	9 mg
Maltasi	5 mg
Alfa-galattosidasi	5 mg
Miscela erbale	675 mg
che fornisce:	
Cuminum cyminum L. frutti polverizzati	150 mg
Foeniculum vulgare Mill. estratto secco di semi (4:1)	144 mg
Matricaria chamomilla L. fiori polverizzati	135 mg
Zingiber officinalis Rosc estratto secco di rizoma (4:1)	126 mg
Pimpinella anisum L. frutti polverizzati	120 mg

Appendice C : Primo test di fermentazione non riportato nel rispettivo paragrafo. Ulteriori analisi eseguite per le prive 1, 2 e 3

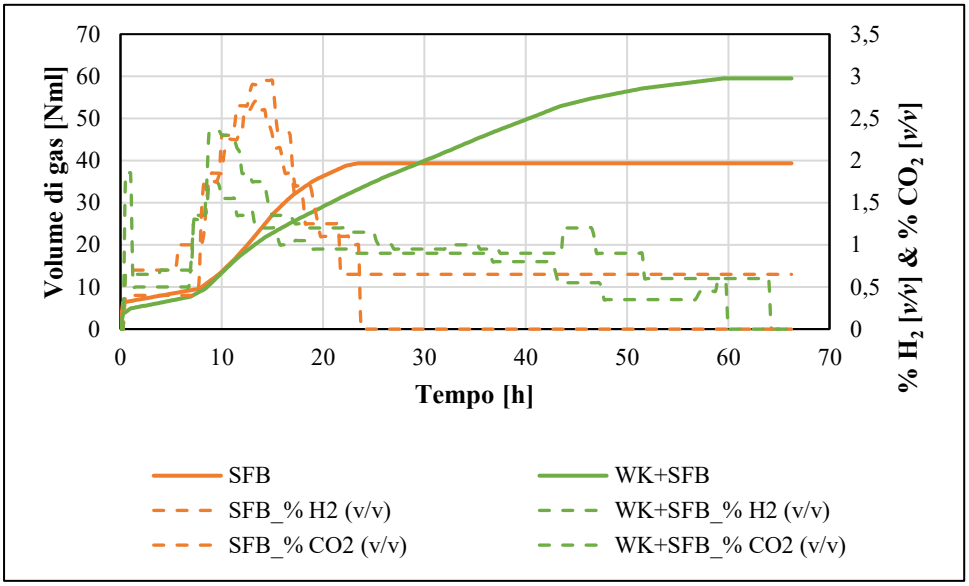


Figura 7.15 Evoluzione del gas e frazioni di idrogeno e anidride carbonica per ogni sistema nella prova effettuata senza il pre-trattamento del substrato.

Tabella 7.2 Risultati parziali della terza prova effettuata senza il pre-trattamento del substrato.

Parametri	Test SFB	Test WK + SFB
pH inizio	5,05	5,05
pH fine	2,80	2,70
Volume cumulativo di gas (mL)	42,95	64,95
% H_2 (*v/v*)	89,96	94,96
% CO_2 (*v/v*)	10,04	5,04
mL_H_2/mL_CO_2	8,96	18,83

Tabella 7.3 Tempi di latenza delle 2 curve relative al volume totale di gas (della prova effettuata senza il pre-trattamento del substrato).

Parametro	SFB	WK+SFB
λ (h) – Tempo di latenza	2,83 ± 0,30	0,68 ± 0,25

Infine, qui di seguito, sono riportati tutti i tassi di produzione in Nml/h per tutte e 4 le prove di fermentazione eseguite durante il mio lavoro.

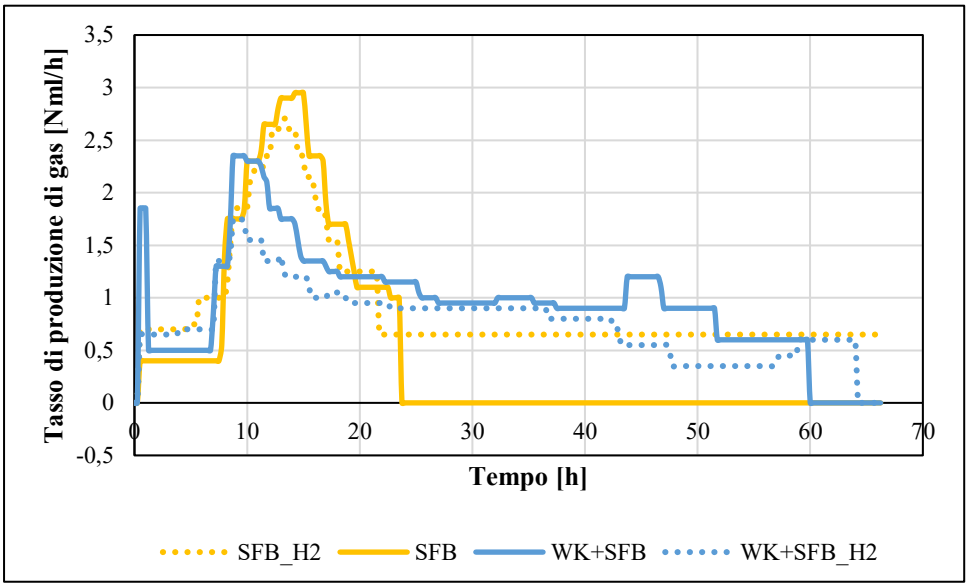


Figura 7.16 Tasso di produzione della prova effettuata senza il pre-trattamento del substrato.

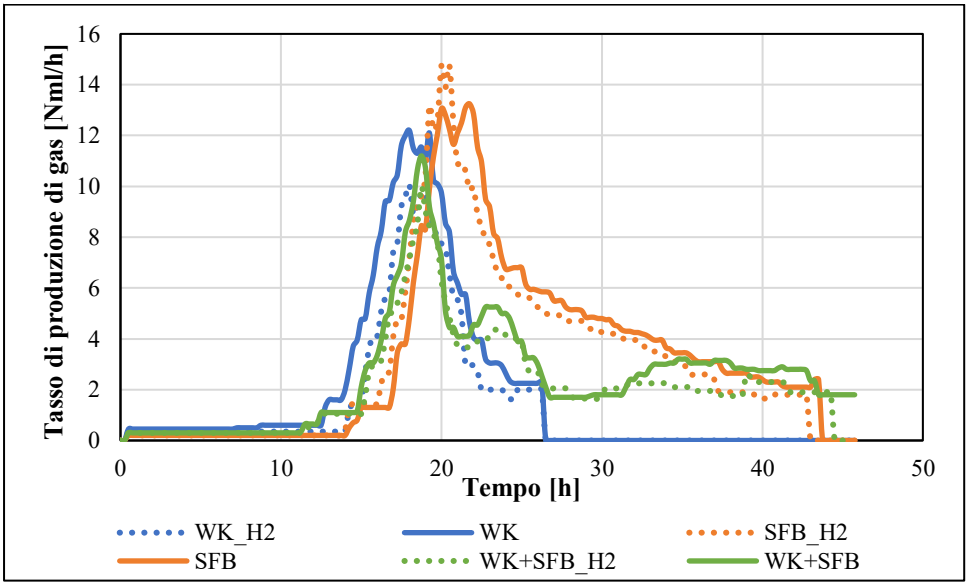


Figura 7.17 Tassi di produzione della prima prova.

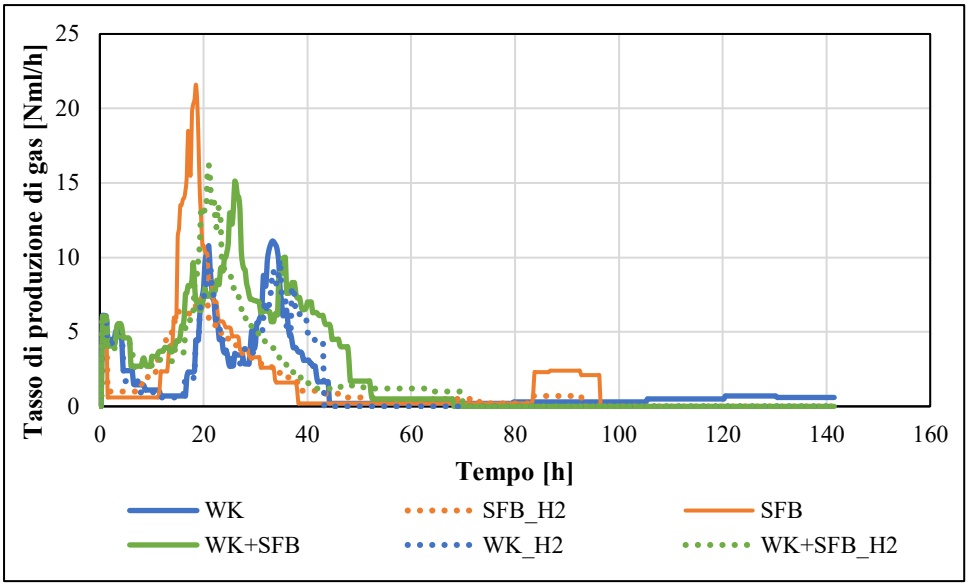


Figura 7.18 Tassi di produzione della seconda prova.

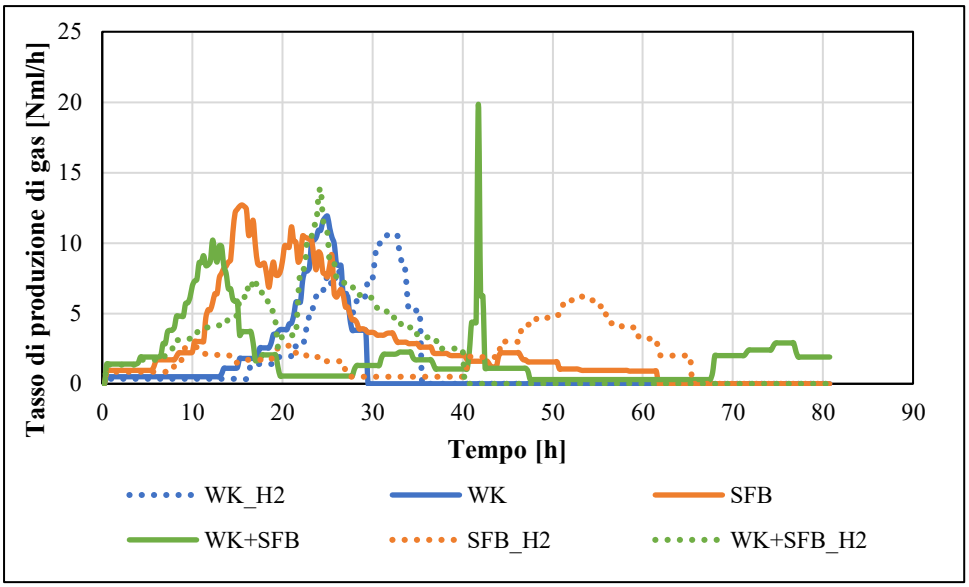


Figura 7.19 Tassi di produzione della terza prova.

Bibliografia

[1] B. Ruggeri, T. Tommasi, and G. Sassi, "Experimental kinetics and dynamics of hydrogen production on glucose by hydrogen forming bacteria (HFB) culture," *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 34, no. 2, pp. 753–763, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.ijhydene.2008.10.076.

[2] C. E. Gómez-Camacho, K. Pellicer Alborch, A. Bockisch, P. Neubauer, S. Junne, and B. Ruggeri, "Monitoring the Physiological State in the Dark Fermentation of Maize/Grass Silage Using Flow Cytometry and Electrooptic Polarizability Measurements," *Bioenergy Research*, vol. 14, no. 3, pp. 910–923, Sep. 2021, doi: 10.1007/s12155-020-10184-x.

[3] D. Dionisi and I. M. O. Silva, "Production of ethanol, organic acids and hydrogen: an opportunity for mixed culture biotechnology?," *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, vol. 15, no. 2. Springer Netherlands, pp. 213–242, Jun. 01, 2016. doi: 10.1007/s11157-016-9393-y.

[4] I. Dincer and C. Acar, "Review and evaluation of hydrogen production methods for better sustainability," *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 40, no. 34, pp. 11094–11111, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.ijhydene.2014.12.035.

[5] H. B. Aditiya, T. M. I. Mahlia, W. T. Chong, H. Nur, and A. H. Sebayang, "Second generation bioethanol production: A critical review," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 66. Elsevier Ltd, pp. 631–653, Dec. 01, 2016. doi: 10.1016/j.rser.2016.07.015.

[6] M. Balat, "Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review," *Energy Conversion and Management*, vol. 52, no. 2, pp. 858–875, 2011, doi: 10.1016/j.enconman.2010.08.013.

[7] I. K. Kapdan and F. Kargi, "Bio-hydrogen production from waste materials," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 38, no. 5. pp. 569–582, Mar. 02, 2006. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.09.015.

[8] S. Kim and B. E. Dale, "Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues," *Biomass and Bioenergy*, vol. 26, no. 4, pp. 361–375, 2004, doi: 10.1016/j.biombioe.2003.08.002.

[9] J. R. Rostrup-Nielsen and T. Rostrup-Nielsen, "Large-scale Hydrogen Production."

[10] S. Manish and R. Banerjee, “Comparison of biohydrogen production processes,” *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 33, no. 1, pp. 279–286, Jan. 2008, doi: 10.1016/j.ijhydene.2007.07.026.

[11] O. Elsharnouby, H. Hafez, G. Nakhla, and M. H. el Naggar, “A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures,” *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 38, no. 12. pp. 4945–4966, Apr. 22, 2013. doi: 10.1016/j.ijhydene.2013.02.032.

[12] B. Ruggeri, T. Tommasi, and G. Sassi, “Energy balance of dark anaerobic fermentation as a tool for sustainability analysis,” *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 35, no. 19, pp. 10202–10211, Oct. 2010, doi: 10.1016/j.ijhydene.2010.08.014.

[13] T. Rostrup-Nielsen, “Manufacture of hydrogen,” in *Catalysis Today*, Oct. 2005, vol. 106, no. 1–4, pp. 293–296. doi: 10.1016/j.cattod.2005.07.149.

[14] B. Ruggeri, T. Tommasi, S. Sanfilippo Bioh, and & Bioch, “Green Energy and Technology Through Anaerobic Digestion From Research to Full-scale Applications.” [Online]. Available: http://www.springer.com/series/8059

[15] A. Yoshida, T. Nishimura, H. Kawaguchi, M. Inui, and H. Yukawa, “Enhanced hydrogen production from glucose using ldh- and frd-inactivated Escherichia coli strains,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 73, no. 1, pp. 67–72, Nov. 2006, doi: 10.1007/s00253-006-0456-9.

[16] C. E. Gómez-Camacho, F. Bosco, and B. Ruggeri, “The role of microbial community engineering (MCE) in the Water-Energy-Food-Waste (WEFW) nexus,” *Chemical Engineering Transactions*, vol. 79, pp. 397–402, 2020, doi: 10.3303/CET2079067.

[17] K. M. Lynch, S. Wilkinson, L. Daenen, and E. K. Arendt, “An update on water kefir: Microbiology, composition and production,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 345. Elsevier B.V., May 02, 2021. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109128.

[18] D. Laureys *et al.*, “The Type and Concentration of Inoculum and Substrate as Well as the Presence of Oxygen Impact the Water Kefir Fermentation Process,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 12, Feb. 2021, doi: 10.3389/fmicb.2021.628599.

[19] D. Laureys, A. van Jean, J. Dumont, and L. de Vuyst, “Investigation of the instability and low water kefir grain growth during an industrial water

kefir fermentation process," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 101, no. 7, pp. 2811–2819, Apr. 2017, doi: 10.1007/s00253-016-8084-5.

[20] D. Laureys, M. Aerts, P. Vandamme, and L. de Vuyst, "Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process," *Food Microbiology*, vol. 73, pp. 351–361, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.fm.2018.02.007.

[21] "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater," 1999.

[22] "Fenolftaleina", [Online]. Available: https://www.colaver.it/fenolftaleina

[23] "Scala per misurare il contenuto zuccherino Brix, Balling, Plato, ČNM, KMW, Oechsle, Baumé", [Online]. Available: https://www.rifrattometro.eu/scala-per-misurare-il-contenuto-zuccherino

[24] D. Laureys *et al.*, "The Type and Concentration of Inoculum and Substrate as Well as the Presence of Oxygen Impact the Water Kefir Fermentation Process," *Frontiers in Microbiology*, vol. 12, Feb. 2021, doi: 10.3389/fmicb.2021.628599.

[25] J. R. Koransky, S. D. Allen, and V. R. Dowell, "Use of Ethanol for Selective Isolation of Sporeforming Microorganisms," 1978.

[26] B. Ruggeri, A. C. Luongo Malave, M. Bernardi, and D. Fino, "Energy efficacy used to score organic refuse pretreatment processes for hydrogen anaerobic production," *Waste Management*, vol. 33, no. 11, pp. 2225–2233, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.wasman.2013.06.024.

[27] J. Wang *et al.*, "Effect of CaCl 2 pre-treatment on the succinylation of potato starch," *Food Chemistry*, vol. 288, pp. 291–296, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.03.018.

[28] Gerardi, "The Microbiology of Anaerobic Digesters," 2069.

[29] J. Paquet, C. Lacroix, P. Audet, and J. Thibault, "Electrical conductivity as a tool for analysing fermentation processes for production of cheese starters," 2000.

[30] K. Assaker and J. Rima, "A New Spectrophometric Method For The Analysis Of Fructose, Glucose And Sucrose, Using 2-Thiobarbituric Acid And Zero-Valent Iron Powder (ZVIP)," *Journal of Food Research*, vol. 8, no. 2, p. 48, Feb. 2019, doi: 10.5539/jfr.v8n2p48.

[31] U. Uthumporn, Y. N. Shariffa, A. Fazilah, and A. A. Karim, "Effects of NaOH treatment of cereal starch granules on the extent of granular starch

hydrolysis," *Colloid and Polymer Science*, vol. 290, no. 15, pp. 1481–1491, Oct. 2012, doi: 10.1007/s00396-012-2674-2.

Ringraziamenti