

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**

Tesi di Laurea Magistrale

**Valorizzazione degli scarti di birrificazione
mediante processi fermentativi: miglioramento
del contenuto proteico del Brewers' spent grain
dopo solid state fermentation con *Rhizopus
oligosporus***



Relatori

Prof. Italo Mazzarino

Prof.ssa Francesca Bosco

Candidato

Andrea Manzini

Dicembre 2021

Indice

1. Introduzione	1
1.1. Processo di birrificazione	2
1.2 Brewers' spent grain-BSG: origine e struttura	5
1.3 Brewers' spent grain: potenziali applicazioni	6
1.3.1 il BSG nel settore primario	6
1.3.2 Il BSG come integratore nella dieta umana	7
1.3.2 Il BSG nella produzione energetica	8
1.3.3 Il BSG come substrato nelle fermentazioni	10
1.3.4 Il BSG nella produzione di adsorbenti e materiali sostenibili	11
1.4 Solid state fermentation di residui lignocellulosici con funghi filamentosi	12
1.4.1 Fungo filamentoso impiegato nelle fermentazioni: <i>Rhizopus oligosporus</i> , caratteristiche morfologiche e utilizzi	13
1.4 Scopo del lavoro	15
2. Materiali e metodi	17
2.1 Caratterizzazione del BSG	17
2.1.1 Contenuto di umidità	17
2.1.2 Contenuto di ceneri	19
2.1.3 Valutazione del pH e dell'acidità titolabile	19
2.2 Caratterizzazione microbiologica	20
2.2.1 Incubazione di BSG tal quale su MEA	21
2.2.2 Metodo delle diluizioni successive e inoculo per inclusione	22
2.2.3 Analisi respirometrica	23
2.3 Solid state fermentation del BSG con <i>Rhizopus oligosporus</i>	25
2.3.1 Prove di fermentazione in sacchetti di LDPE	26
2.3.2 Ottimizzazione della fermentazione in sacchetti di LDPE	28

2.3.3 Caratterizzazione dei prodotti di fermentazione.....	32
2.3.4 Valutazione del contenuto di proteine	34
3. Discussione dei risultati	37
3.1 Caratterizzazione del BSG	37
3.1.1 Valutazione del contenuto di umidità	37
3.1.2 Valutazione del contenuto di ceneri.....	38
3.1.3 Valutazione del pH e dell'acidità titolabile.....	38
3.2 Caratterizzazione microbiologica del BSG.....	39
3.2.1 Incubazione di BSG tal quale su MEA	39
3.2.2 Metodo delle diluizioni successive e inoculo per inclusione	40
3.2.3 Analisi respirometrica	41
3.3 Solid state fermentation del BSG con <i>Rhizopus oligosporus</i>	42
3.3.1 Prove di fermentazione in sacchetti di LDPE	42
3.3.2 Ottimizzazione della fermentazione in sacchetti di LDPE	46
3.3.3 Caratterizzazione dei prodotti di fermentazione.....	49
3.3.4 Valutazione del contenuto di proteine	53
4. Conclusioni e prospettive future.....	57
5. Bibliografia	61
6. Appendice	67
7. Ringraziamenti	69

Si ringrazia il Birrificio Leumann di Collegno (TO) per la fornitura dei campioni di BSG sui quali è stato condotto il presente studio.

1. Introduzione

La produzione dell'industria agro-alimentare è destinata a crescere in maniera esponenziale nei prossimi anni poiché si prevede che nel 2050 la richiesta di cibo aumenterà del 60% (FAO, 2011; FAO, 2014) in seguito alla progressiva crescita della popolazione mondiale. Con essa inevitabilmente aumenterà anche la quantità di scarti prodotti, che già da un decennio si attesta intorno al 20% di tutta la produzione alimentare destinata annualmente al consumo umano (FAO, 2011; Pham et al., 2015; UNEP, 2021). È diventata quindi sempre più chiara l'importanza di ridurre gli sprechi e l'impatto ambientale dei vari processi produttivi trovando un utilizzo alternativo e quindi una modalità di valorizzazione per tutti quei materiali prima destinati allo smaltimento e rappresentanti soltanto costi aggiuntivi e perdite per le aziende, oltre ad una grande fonte di inquinamento. Per la bioeconomia, la possibilità di dare una seconda vita ai prodotti di scarto è alla base della valutazione della sostenibilità di un processo, poiché molte volte essi possono essere una fonte importante di risorse economicamente sfruttabili e a basso impatto ambientale. L'analisi del ciclo di vita (LCA) è diventata infatti parte integrante della gestione delle compagnie negli ultimi anni, soprattutto per quelle alimentari (Chandrasekaran et al., 2012); essa ha portato ad una raccolta dei dati sulla composizione e sulla quantità degli scarti di produzione più completa e sistematica e quindi ad una nuova consapevolezza sull'impatto ambientale delle lavorazioni industriali e delle tecnologie utilizzate. Nel processo di produzione della birra, il maggior prodotto di scarto è rappresentato dal Brewers' spent grain o BSG. Dato che per ogni cento litri di birra prodotti si ottengono intorno ai 20 kg di BSG, esso rappresenta circa l'85% (*m/m*) degli scarti totali di tutta la produzione (Mussatto et al., 2006). È quindi facile capire come sia molto importante e interessante riuscire a valorizzare questo sottoprodotto riutilizzandolo in una linea di produzione. Tutto questo è ancora più chiaro se si vanno a vedere i quantitativi mondiali di birra, e quindi di BSG, prodotti annualmente: una media di 194 miliardi di litri all'anno che si traducono in 40 miliardi di kg di BSG (Birsan et al., 2019).

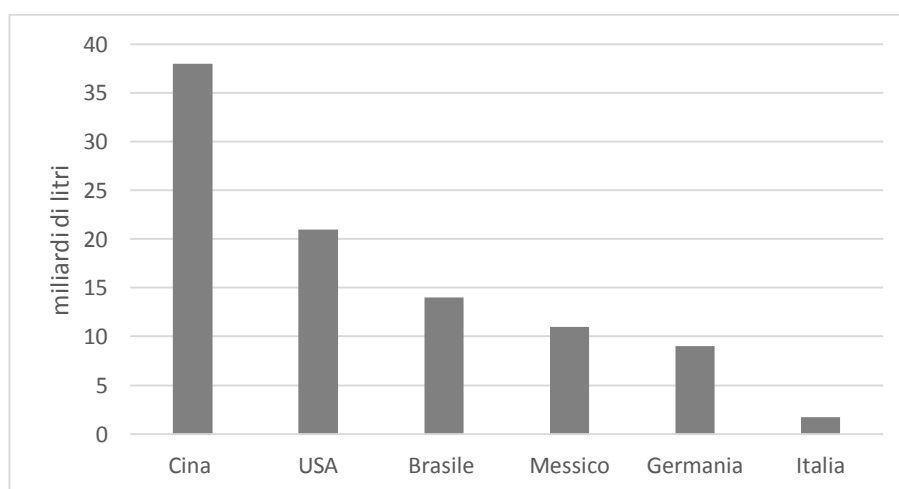


Figura 1.1 Produzione annuale di birra (2019) in miliardi di litri per nazione

In aggiunta a ciò che è stato appena detto si deve riportare che il BSG è un prodotto dall'alto

valore nutrizionale e ricco di componenti importanti come fibre (Roth et al., 2019), proteine e antiossidanti (Mussatto et al., 2006) che lo rendono perfetto per molte applicazioni che spaziano dall'ambito alimentare all'industria biotecnologica. Esso è infatti al centro di studi che ne hanno verificato la possibilità di utilizzo come integratore nella dieta umana e animale dando numerosi benefici per la salute degli stessi, come substrato nella coltivazione di microrganismi, nella produzione di enzimi e di diverse materie prime (es. acido lattico e bioetanolo) fino alla produzione di polimeri, di biogas e di materiali da costruzione (Bianco et al., 2020; Chetrariu e Dabija, 2020). Alla luce di tutto quello che è stato riportato, stiamo quindi considerando una materia prima potenzialmente molto interessante che unisce alta reperibilità lungo tutto l'anno, grande spendibilità e costo di mercato nullo o comunque molto basso dato che per ora è stato utilizzato maggiormente come mangime per il bestiame (Salihu e Bala, 2011).

1.1. Processo di birrificazione

I processi di birrificazione presentano sì alcune differenze dettate dalle proprietà da conferire al prodotto finale, ma hanno tutte una linea comune e ben definita (fig. 1.2, 1.3, 1.4). In generale, la birra è il prodotto di fermentazione di un mosto prodotto partendo sempre dagli stessi ingredienti: cereali (soprattutto orzo), acqua, luppolo e lieviti.

Maltazione

Il primo stadio di lavorazione è quello di maltazione, che consiste nel porre i cereali in vasche di macerazione riempite d'acqua, seguito poi dal processo di germinazione. La macerazione permette di aumentare il contenuto d'acqua nel chicco fino al 40% per far partire la germinazione e per lavare via eventuali inibitori di germinazione presenti sul chicco. Questo processo va fatto in condizioni controllate di: temperatura, tempo di vegetazione, alternanza tra periodi di secca e di ammollo, rifornimento di ossigeno (Kreisz, 2009) e rimozione della CO₂ prodotta (Kunze et al., 2004). Tutti questi parametri sono molto influenzati dalla tipologia di cereale utilizzato, ma fondamentalmente si resta in un campo di temperature tra i 12°C e i 18°C alternando due periodi in ammollo di 4-6 h a due di secca di 18-20h (controllando ogni volta il contenuto di umidità) e mantenendo un adeguato apporto di ossigeno ai chicchi in acqua insufflando aria (che permette anche un rimescolamento dei chicchi stessi) (Kreisz, 2009). In questa situazione, si ha la formazione di una radichetta bianca alla base del chicco. Una volta formata la radichetta, i chicchi vengono trasferiti in appositi contenitori per la germinazione dove viene insufflata aria umidificata a temperatura controllata fino a quando non si sviluppa un germoglio della lunghezza pari ai due terzi di quella del chicco stesso ottenendo così il malto verde. La maltazione (macerazione + germinazione) avviene in un tempo compreso tra le 120 e le 168h, a temperature tra i 12 e i 20°C e ad un contenuto di umidità nel chicco tra il 42 e il 48% (Kreisz, 2009). La fase di maltazione è di vitale importanza per una corretta produzione degli enzimi idrolitici che serviranno a degradare le macromolecole (soprattutto gli amidi) contenute nei grani del cereale durante l'ammontamento (Kunze et al., 2004).

Essiccazione

Lo *step* successivo prevede l'essiccazione del malto in forni dove viene fatta circolare aria calda per far diminuire il contenuto di umidità all'interno del chicco facendo così terminare la

germinazione. Gli altri scopi di questa fase sono quelle di rendere il prodotto più stabile per la sua conservazione, arrestare l'attività degli enzimi prodotti precedentemente e sviluppare colore e aroma desiderati (Kreisz, 2009; Kunze et al., 2004). Le combinazioni di tempo e temperatura sono diverse in base alle caratteristiche finali del prodotto desiderate. Si parte sempre da una fase di pre-essiccazione fatta insufflando una corrente d'aria a temperature relativamente basse (50-65°C) per non degradare gli enzimi formati in precedenza, seguita dalla vera e propria fase di essiccazione che dura per 10-12h con una temperatura dell'aria crescente fino agli 85°C (Kreisz, 2009). Dopo aver essiccato il malto, vengono rimosse le radichette ed esso può essere conservato fino a due settimane dalla sua essiccazione; successivamente avviene la macinazione del malto in molino.

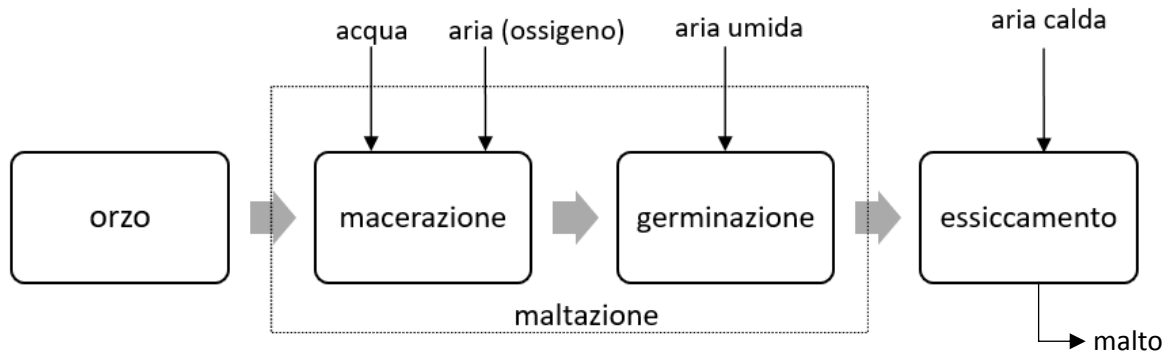


Fig. 1.2 schema del processo di ottenimento del malto

Macinazione

Il principale compito della macinazione è quello di favorire la fuoriuscita del contenuto del malto dall'endosperma facilitandone l'accesso da parte degli enzimi che dovranno poi degradarlo. Poiché le parti insolubili del chicco serviranno a facilitare e a migliorare il processo di filtrazione del mosto, la macinazione non deve essere troppo aggressiva per non intaccare eccessivamente la struttura del chicco.

Ammostamento

Dopo la macinatura si passa all'ammostamento, il mosto è l'ingrediente principale nella fermentazione vera e propria e per ricavarlo bisogna innanzitutto miscelare la farina ottenuta dalla macinazione del malto con acqua e mescolare il tutto finché non si ottiene un composto omogeneo. In base al processo di ammostamento utilizzato dal birrificio si porta la miscela di acqua e malto a temperature comprese tra i 37°C e i 78°C con l'aggiunta, all'occorrenza, di acqua bollente o acqua fredda. Durante questa operazione bisogna controllare l'arresto di alcuni processi enzimatici indesiderati e inibirne parzialmente altri andando ad agire su temperatura, viscosità, pH e tempo di esposizione (Evans et al., 2012). Quello che si vuole ottenere è la conversione degli amidi contenuti nel malto in zuccheri (principalmente maltosio e destrine) e la parziale degradazione delle proteine in aminoacidi e polipeptidi (Mussatto, 2009). Una volta ottenuto il mosto lo si deve filtrare per separare la parte liquida con i componenti del malto che si sono disciolti da tutto ciò che è insolubile, ovvero le trebbie esauste. Questa operazione viene realizzata in appositi macchinari come tini di sedimentazione o filtri a pressa nei quali si sfruttano le trebbie per formare una torta filtrante.

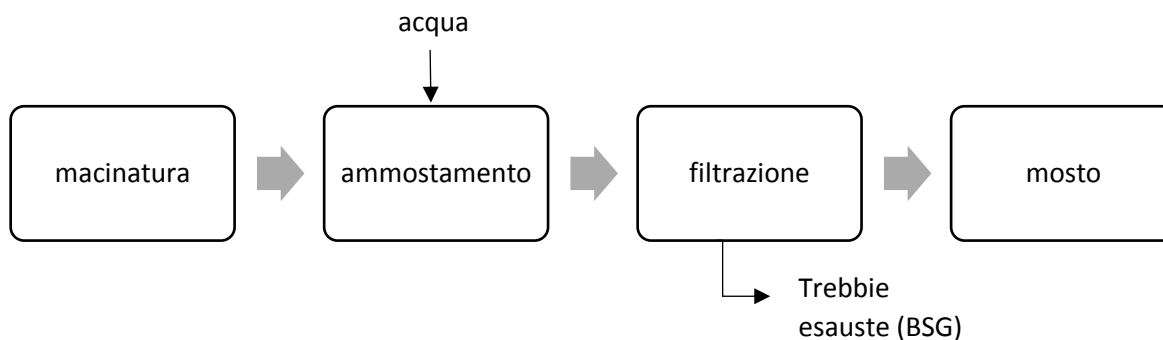


Fig. 1.3 Schema del processo di ottenimento del mosto

Fermentazione

Dopo la filtrazione, si aggiunge il luppolo e si porta tutto ad ebollizione per 50-60 minuti con il fine di: sterilizzare il mosto, distruggere e/o bloccare gli enzimi prodotti e trasferire dai luppoli tutti quei componenti aromatici che caratterizzeranno il prodotto finale (Kunze et al., 2004; Lindemann, 2009; Mussatto, 2009). Dopo aver separato i residui di luppolo e quello che è precipitato durante l'ebollizione dal mosto, si trasferisce il liquido in un serbatoio di fermentazione dove si aggiungono i lieviti. La fermentazione permette la conversione degli zuccheri disciolti nel mosto in etanolo e CO₂ e la formazione di prodotti secondari (es. esteri) che andranno a conferire le proprietà organolettiche della birra (Eßlinger, 2009). Per ottenere una birra bilanciata e di qualità bisogna tenere sotto controllo numerosi fattori: la composizione del mosto, la temperatura, il numero di lieviti attivi, il pH e l'aerazione (Eßlinger, 2009; Kunze et al., 2004). Successivamente, si hanno dei processi di chiarificazione e filtrazione, in base al tipo di birra desiderata, e di raffreddamento e stabilizzazione che portano infine all'imbottigliamento e allo stoccaggio del prodotto (Lindemann, 2009).

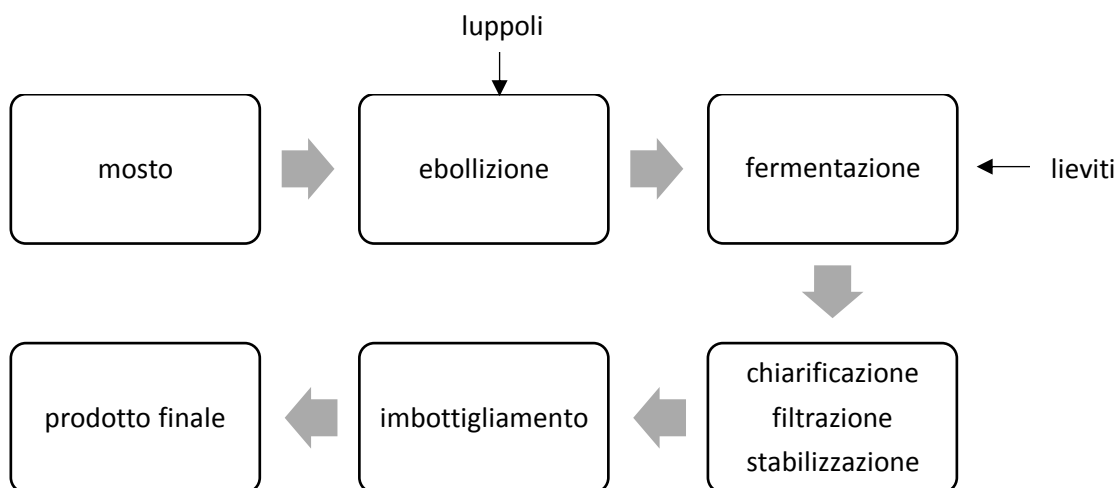


Figura 1.4 schema del processo di trattamento del mosto e di produzione del prodotto finale

1.2 Brewers' spent grain-BSG: origine e struttura

Il BSG è il primo scarto solido della linea di produzione della birra, ovvero quello che nel paragrafo precedente è stato indicato come trebbie esauste. È quindi ottenuto durante il primo processo di filtrazione che subisce il mosto prima dell'aggiunta del luppolo. Durante il processo di maltazione circa l'80% dei componenti del malto passano in soluzione (Thiago et al., 2014) lasciando tutte le parti insolubili sospese nella fase liquida. La struttura e la composizione del BSG variano molto in base al processo di produzione impiegato, alla varietà di orzo utilizzata e ad eventuali aggiunte di cereali secondari nel mosto (Kunze et al., 2004; Mussatto, 2009), ma esso consiste essenzialmente in strati e residui di gluma e pericarpo con possibile presenza di parti di endosperma e aleurone che non sono stati degradati dagli enzimi o distrutti e solubilizzati nei vari processi di macinatura e ammostamento (Chetrariu e Dabija, 2020; Lynch et al., 2016).



Fig. 1.4 struttura del chicco di orzo a sinistra (modificato da (Chetrariu and Dabija, 2020)) e aspetto del BSG a destra (modificato da (Bianco et al., 2020)).

Il BSG è essenzialmente un materiale lignocellulosico, nel quale il contenuto di fibre presenti arriva fino al 70% del suo peso secco, ma ha anche un valore nutritivo pari ad un quinto del chicco di orzo integro poiché il 15-25% circa del suo peso secco è rappresentato da proteine (Chetrariu and Dabija, 2020; Thiago et al., 2014).

Tabella 1.1 Composizione del BSG in % *m/m* di sostanza secca

% <i>m/m</i> peso secco	(Kanauchi et al., 2001)	(Pedro Silva et al., 2004)	(Mussatto et al., 2006)	(Xiros et al., 2008a)	(Canedo et al., 2016)	(Llimós et al., 2020)	(Guarda et al., 2021)
Cellulosa	25,4	25,3	16,8	11,5	-	21,6±1,6	-
Eemicellulosa	-	41,9	28,4	40	-	40,1±1,4	-
Lignina	11,9	16,9	27,8	11,9	-	7,7±1,4	12 (stimata)
Proteine	24	-	15,3	14	17,96±0,21	-	26,9±0,1
Ceneri	2,4	4,6	4,6	3,2	3,41±0,04	-	3,4±0,04
Lipidi	10,6	-	-	13	-	-	11,5±0,03
Carboidrati	-	-	-	-	60,01±0,32	-	46,2±0,06

In tabella 1.1, sono riportate le composizioni di varie tipologie di BSG ottenute in diversi studi condotti negli anni e si può notare quanto queste siano variabili come già detto in precedenza. La composizione del BSG include anche minerali, vitamine, aminoacidi e monosaccaridi (arabinosio, glucosio e xilosio) (Mussatto, 2009). È importante ricordare che questo prodotto ha un contenuto di umidità molto alto (fino all'80-85%) che unito alla presenza di nutrienti e zuccheri fermentabili residui lo rende un ottimo substrato per la rapida crescita di colonie batteriche e fungine (Lynch et al., 2016). Nonostante la microflora naturalmente presente sul BSG e la contaminazione batterica nel momento della sua produzione siano ridotti e nei limiti per un utilizzo alimentare, circa 10^2 - 10^3 UFC/g (Robertson et al., 2010b), già dopo pochi giorni di conservazione a 20°C la concentrazione microbica può arrivare a 10^6 UFC/g (Bianco et al., 2020)

1.3 Brewers' spent grain: potenziali applicazioni

Per arginare il problema del deterioramento ed allungare (anche di molto) la *shelf life* di questo prodotto sono stati proposti vari metodi: l'essiccazione a 60°C (Salihu and Bala, 2011), il congelamento a -20°C oppure un passaggio di sterilizzazione in autoclave a 121°C per 1 ora (Lynch et al., 2016; Robertson et al., 2010b). Se uniamo difficoltà e costi di trasporto di un materiale con una percentuale di umidità così alta ai costi che i birrifici dovrebbero affrontare per i trattamenti atti ad allungare i tempi di conservazione del BSG, si capisce come mai il suo maggior utilizzo sia ancora oggi rappresentato dall'essere impiegato come mangime per il bestiame, soprattutto bovino, presente in allevamenti nelle immediate vicinanze del birrificio stesso (Mussatto et al., 2006). Ciononostante, la ricca composizione unita alla grande reperibilità rende il BSG appetibile per essere utilizzato in molti processi biotecnologici. Proprio per questo negli anni sono stati portati avanti numerosi studi con la finalità di trovare delle modalità sostenibili e vantaggiose di sfruttamento di questo sovrabbondante scarto di produzione del processo di birrificazione.

1.3.1 il BSG nel settore primario

In aggiunta all'utilizzo corrente del BSG come integratore nell'alimentazione bovina, è stato anche studiato l'effetto dell'inserimento di questo scarto di produzione all'interno della dieta di altri animali da allevamento come pesci (carpe, orate, trote) (Nazzaro et al., 2021; San Martin et al., 2020) e pollame (McCarthy et al., 2013) migliorando la crescita di peso degli animali allevati e incrementandone la qualità della carne prodotta. L'utilizzo del BSG nell'ambito descritto è sempre indicato come integratore nella dieta e mai come vero e proprio cibo poiché un utilizzo in quantità eccessive ha portato, soprattutto nei bovini, a casi di: problemi intestinali, diminuzione della fertilità e complicazioni per la salute nel periodo perinatale (Faccenda et al., 2017). Potrebbe comunque rappresentare in futuro una valida alternativa alle farine di carne, ottenute dalle carcasse degli animali e utilizzate come integratori di proteine nei mangimi, che nonostante siano state recentemente riautorizzate, rappresentano comunque una delle maggiori cause dell'epidemia di encefalopatia spongiforme bovina (Bse) (volgarmente nota come *morbo della mucca pazza*) che dal 1986 ha colpito centinaia di migliaia di capi di bestiame e centinaia

di consumatori. Il BSG è stato utilizzato anche nell'agricoltura come fertilizzante e ammendante. È stato infatti dimostrato in vari studi come il contenuto di fosforo e potassio del BSG lo rendano utilizzabile come fonte di nutrimento per i raccolti, migliorandone la produttività (Mbagwu e Ekwealor, 1990) e la crescita delle radici delle piante (Amoriello et al., 2020) . Oltre al rifornimento di nutrienti, in letteratura si riporta anche la capacità del BSG di migliorare le proprietà fisiche, quindi la qualità, dei terreni aumentandone il contenuto organico, la capacità di trattenimento dell'acqua e l'aggregazione (Mbagwu e Ekwealor, 1990).

1.3.2 Il BSG come integratore nella dieta umana

Si può dire che è sotto gli occhi di tutti un crescente interesse per il benessere fisico e per cibi più sani con anche effetti positivi sulla salute. Per questo motivo gli alimenti ad alto contenuto di fibre sono sempre più richiesti e le industrie alimentari sono alla continua ricerca di nuove materie prime adatte allo scopo. Il BSG è naturalmente ricco di fibre e a destare interesse è soprattutto il suo contenuto di β -glucani e arabinoxilani (Steiner et al., 2015). È noto come queste fibre portino numerosi e variegati benefici alla salute umana se integrati nella dieta contribuendo: ad abbassare il colesterolo riducendo così i rischi di problemi cardiovascolari (Truswell, 2002), ad aiutare a controllare il diabete e l'insulino resistenza e a favorire la digestione dei carboidrati (Lu et al., 2000). Il BSG può quindi portare numerosi benefici per la salute e a questo proposito sono stati indagati i suoi possibili utilizzi come additivo nei prodotti da forno e a base di farine come pasta, pane e biscotti (fig. 1.5) ottenendo un miglioramento delle proprietà nutritive e dando anche effetti benefici sull'attività intestinale (Ktenioudaki et al., 2012; Neylon et al., 2021).

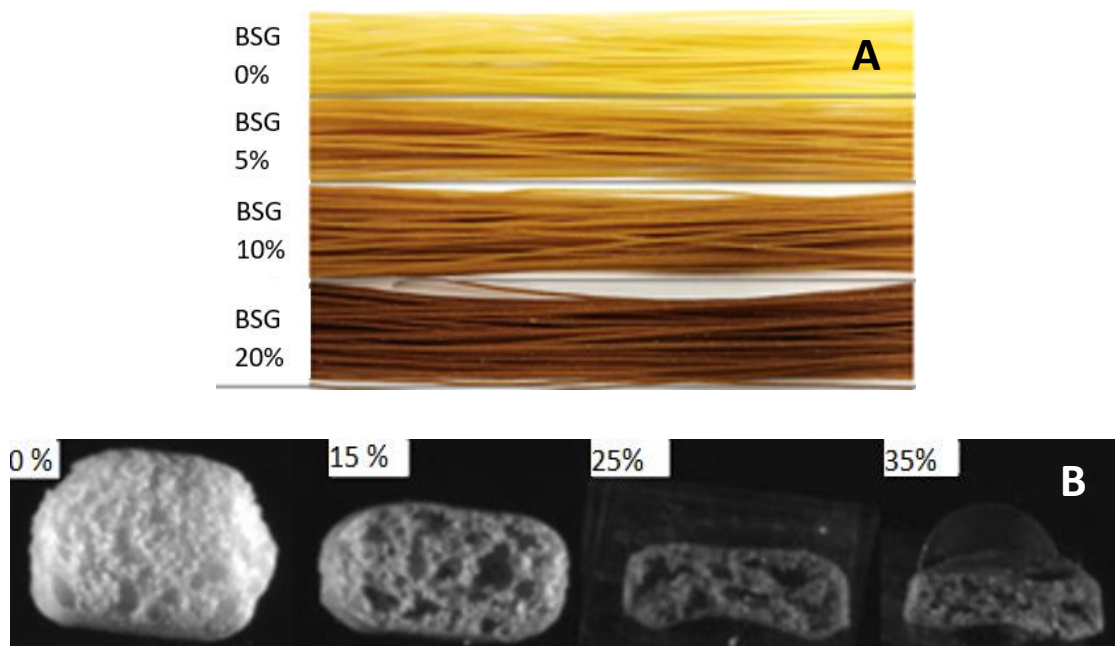


Fig. 1.5 Effetto visivo dell'aggiunta di diverse percentuali di BSG nella pasta (foto A, modificato da Nocente et al., 2019) e nel pane (foto B, modificato da Ktenioudaki et al., 2012)

È stato inoltre valutato il suo impiego nella realizzazione di cibi non a base di farina come salsicce di maiale e di pollo per ottenere un arricchimento del contenuto di fibre riducendo invece quello di grassi (Choi et al., 2014; Özvural et al., 2009). Sia per quanto riguarda i prodotti a base di farina, sia per quelli appena citati a base di carne, il BSG addizionato non può superare il 10-15% del peso totale per non alterare e/o peggiorare le proprietà organolettiche del prodotto finale quali gusto, consistenza, profumo e aspetto, andando quindi a diminuire la possibilità della messa in commercio del prodotto stesso. Il BSG può essere anche riutilizzato nella filiera da cui proviene: dato il suo contenuto residuo di zuccheri derivante dall'attività degli enzimi amilolitici sul chicco di orzo e la presenza di amido non digerito (nel 5% del totale di BSG prodotto, quello che esce per primo dal processo di filtrazione) (Muller, 1991), il BSG può essere impiegato come additivo nella produzione di birra soprattutto a basso contenuto di alcol, rimpiazzando parte delle materie prime utilizzate nel processo. Oltre ad un utilizzo diretto all'interno della dieta umana è stata anche considerata l'estrazione dei componenti desiderati dal BSG come antiossidanti e proteine. Per gli antiossidanti come i composti fenolici (Meneses et al., 2013) e l'acido ferulico (Faulds et al., 2002) si procede sempre partendo da un pretrattamento della matrice, che nella maggior parte dei casi si tratta di un'idrolisi alcalina, acida o enzimatica con la finalità di "sfaldare" la matrice lignocellulosica liberando i composti di interesse o facilitandone l'accessibilità, seguito da un'estrazione liquido-liquido o solido-liquido (Guido e Moreira, 2017) per poi poter isolare e purificare il prodotto ricercato. Anche l'estrazione di proteine segue le stesse fasi citate in precedenza, ovvero pretrattamento della biomassa, estrazione e purificazione, e ad essere ricercate sono sia le proteine da cellula singola (Suman et al., 2015) chiamate anche bioproteine o proteine microbiche, ovvero le proteine ottenute dalla coltivazione di alghe, funghi, batteri lieviti e batteri su biomasse di scarto, poiché rappresentano una possibile soluzione per il rifornimento futuro di proteine a basso impatto ambientale andando a sostituire quelle di origine animale, sia gli idrolizzati e i peptidi (Esfandi et al., 2019) che rispondono alla richiesta di integratori di origine vegetale per vegetariani e vegani. Il BSG potrebbe quindi rappresentare una valida fonte di sostentamento in quei paesi dove la popolazione soffre di carenza proteica nell'alimentazione a causa del basso reddito pro capite e all'aumento del costo della carne e di alimenti proteici (soprattutto dopo la crisi pandemica dovuta al Covid-19), come le nazioni centrafricane e del sud dell'Asia, o a causa del clima presente che favorisce colture a basso contenuto proteico, come nelle nazioni dell'Africa occidentale (FAO, 2020). Sarebbe inoltre utile anche nei paesi più sviluppati e ad alto reddito dove il problema è invece quello dell'eccesso calorico e della deficienza di alimenti ad alto contenuto di fibre, fornendo una fonte di proteine e di fibre a basso impatto ambientale.

1.3.2 Il BSG nella produzione energetica

In risposta ai recenti problemi energetici a cui si sta andando incontro è stato analizzato un impiego del BSG proprio nella produzione di energia e la conversione termochimica del BSG mediante combustione o pirolisi è stata il primo campo di studio. La combustione può avvenire soltanto dopo aver essiccato il prodotto fino ad un contenuto di acqua di 550 g/kg (Zanker et al. 2002) e in queste condizioni il BSG ha un potere calorifico netto di 18,64 MJ/kg di sostanza secca. Si può notare come quello riportato sia un valore importante che rende il BSG

un'interessante materia prima utilizzabile per rispondere alla domanda energetica dei birrifici stessi. Il problema è rappresentato dalla possibilità che la combustione di un prodotto di composizione complessa come il BSG produca sostanze tossiche (Meyer-Pittroff R. 1988). Il processo dovrebbe quindi essere effettuato in maniera controllata per evitare l'inquinamento ambientale ed i rischi per la salute. Con la pirolisi, ovvero una degradazione del materiale a 450°C portata avanti in assenza di ossigeno, si ottengono invece carbone, dal potere calorifico maggiore del BSG stesso (Okamoto et al., 2002), ed olio combustibile (bio-olio) che è una miscela di idrocarburi dal peso molecolare basso e intermedio (Mussatto, 2014). Il brewers' spent grain è anche utilizzato nella produzione di biogas con rese di 3476 cm³ di biogas ogni 100 g di BSG (Mussatto, 2014). Il biogas è considerato un combustibile *green*, ma la sua produzione è ancora praticamente nella totalità basata su combustibili fossili; quindi, un utilizzo di materiali di scarto come il BSG potrebbe contribuire molto ad un abbassamento dell'inquinamento ad una sensibile riduzione del consumo di materie prime fossili. La produzione del biogas si articola essenzialmente in due fasi: un pretrattamento idrolitico del substrato e uno biologico metanogenico. L'idrolisi permette di aumentare la resa andando a degradare parzialmente la matrice, rendendola più facilmente metabolizzabile dai microrganismi, ma aumenta i costi della produzione (Wang et al., 2015) quindi molti studi si sono concentrati sulla ricerca del pretrattamento migliore in questa ottica, investigando su trattamenti: enzimatici, termici (Bochmann et al., 2015) e con reattivi acidi ed alcalini (Puligundla and Mok, 2021). La metanogenesi consiste in una digestione anaerobica delle macromolecole liberate dal pretrattamento da parte microrganismi acidogeni che producono acidi e batteri metanogeni che convertono gli acidi grassi in metano. Questo processo è però inibito da prodotti secondari derivati dalla degradazione della lignina e della cellulosa come il p-cresolo (Sežun et al., 2011), in futuro sarà quindi oggetto di ricerca il miglioramento di questa produzione. Ulteriore valorizzazione degna di nota è la produzione di bioetanolo a partire dal BSG, essendo l'etanolo un combustibile sempre più ricercato poiché rappresenta una valida ed ecosostenibile alternativa alla benzina. Al momento, per la sua sintesi si utilizzano materie prime con alto contenuto di zuccheri, come il mais, che però sono anche utilizzate nell'alimentazione umana (Alam et al., 2009). Ciò porta questo processo a competere con l'industria alimentare per le materie prime andando quindi ad aggravare il problema dell'aumento dei prezzi dei prodotti alimentari di base già costantemente in crescita come attestato da FAO (2021). Con 800 milioni di persone che ogni giorno soffrono la fame nel mondo, la ricerca di materiali lignocellulosici di scarto da utilizzare come fonte alternativa di zuccheri fermentabili per la produzione di bioetanolo sembrerebbe rappresentare una valida soluzione alla luce di quanto detto precedentemente e il BSG si colloca perfettamente tra i candidati allo scopo (Salihu e Bala, 2011). Quello sintetizzato a partire da scarti lignocellulosici viene talvolta denominato *bioetanolo di seconda generazione* ed è ottenuto tramite fermentazione di un idrolizzato ricco di zuccheri estratti dalla matrice lignocellulosica tramite pretrattamenti simili a quelli già citati in precedenza (Mussatto et al., 2006). Uno degli aspetti positivi dell'utilizzo di BSG piuttosto che di altri materiali è rappresentato dal fatto che durante la sua fermentazione non bisogna fornire nutrienti supplementari come avviene per esempio impiegando la bagassa da zucchero (Betancur and Pereira Jr, 2010), riuscendo anche ad ottenere rese dell'86,4% come riportato da Mussatto (2014) . La ricerca ora è incentrata sul massimizzare la resa del processo e verterà sul miglioramento sia dei pretrattamenti, sia del processo di idrolisi (per esempio utilizzando gli enzimi prodotti dai funghi filamentosi per degradare l'emicellulosa e la lignina) e sia della fermentazione vera e propria andando ad

utilizzare più tipi di zuccheri e non solo uno come avviene più spesso (Rojas-Chamorro et al., 2018).

1.3.3 Il BSG come substrato nelle fermentazioni

Dato l'alto contenuto di acqua e nutrienti, il BSG è ottimo come substrato per condurre fermentazioni batteriche e fungine con il fine di produrre composti utili per l'industria. Ad esempio l'acido lattico è un precursore dell'acido polilattico che ha impieghi nella realizzazione di polimeri e bioplastiche, esso può essere ottenuto dal BSG (Guido e Moreira, 2017) tramite fermentazione con batteri lattici come *Lactobacillus delbrueckii* (Nigam, 2017), *Lactobacillus pentosus* e *Lactobacillus rhamnosus* (Mussatto, 2009). Il procedimento è simile nei concetti ai precedenti citati poiché si rendono più accessibili gli zuccheri ai microrganismi grazie a pretrattamenti della matrice (una saccarificazione enzimatica della cellulosa) che viene poi lavata per neutralizzarne il pH ed essiccata. Dopo aver rimosso per filtrazione i componenti non convertiti, si procede alla fermentazione vera e propria con una resa di 0,96 g di acido lattico per grammo di glucosio. Altri tipi di biopolimeri che possono essere ottenuti dalla fermentazione del BSG sono i poli-idrossialcanoati (PHA) e i poli-3-idrossibutirati (P3HB). Essendo prodotti intracellulari che provengono dal metabolismo secondario di diversi procarioti, i costi di produzione sono alti poiché l'estrazione e la purificazione sono abbastanza complicate. L'utilizzo di BSG come substrato e di funghi come *Aspergillus niger* per pretrattare la matrice e liberare zuccheri fermentabili possono portare ad un abbassamento di questi costi (Llimós et al., 2020). Anche lo xilitolo è un prodotto di notevole interesse poiché ha un potere dolcificante simile a quello dello zucchero, ma con un contenuto calorico praticamente dimezzato. La sua produzione a partire dal BSG è promettente poiché ha un costo molto inferiore rispetto all'utilizzo di altre materie prime (Guido and Moreira, 2017) e non richiede pretrattamenti per eliminare composti tossici presenti. Essa è stata sistematizzata da Carvalheiro et al. (2006) con l'impiego di *Debaryomyces hansenii* e da Mussatto et al. (2005) utilizzando *Candida guilliermondii*. Dopo la fermentazione con il lievito si separa la CO₂ prodotta dall'estratto ottenuto e poi si procede alla cristallizzazione con etanolo dello xilitolo ad una temperatura di 5°C (a questa temperatura aumenta l'insolubilità dello xilitolo nella melassa) e alla sua estrazione tramite centrifugazione con rese intorno al 90%. Il BSG è anche stato impiegato come substrato a basso costo per la produzione di enzimi mediante fermentazione sia con funghi filamentosi sia con batteri. Si tratta dell'applicazione probabilmente più importante e più studiata del BSG come substrato, poiché gli enzimi hanno una moltitudine di utilizzi ma rappresentano una voce importante nella casella dei costi di un processo. Per esempio, nella produzione di bioetanolo il 25% totale delle spese viene dall'utilizzo di enzimi per il pretrattamento del substrato lignocellulosico (Humbird et al., 2011) e un impiego di fermentazione su BSG per ottenerli può aiutare ad abbattere i costi. I più ricercati sono gli enzimi deputati a degradare cellulosa, emicellulosa e lignina (Górska et al., 2015) dato che sono essenziali durante i pretrattamenti delle matrici e che molte specie di funghi conosciuti sono in grado di produrli. In tabella 1.2 sono stati riportati alcuni degli studi presenti in letteratura e le tipologie di enzimi prodotte.

Tabella 1.2 alcuni enzimi prodotti tramite fermentazione del BSG

Enzima prodotto	Microorganismo utilizzato	Riferimento bibliografico
α-amilasi	<i>Aspergillus oryzae</i> As 3951 <i>A. oryzae</i> NRRL 6270 <i>Bacillus</i> sp. KR-8104	(Xu et al., 2008) (Francis et al., 2003) (Hashemi et al., 2011)
cellulasi	<i>Aspergillus ibericus</i> MUM 04.86	(Leite et al., 2019)
endoglucanasi	<i>Fusarium oxysporum</i> F3 <i>Neurospora crassa</i> DSM 1129	(Xiros et al., 2008a) (Xiros et al., 2008b)
β-glucosidasi	<i>A. niger</i> CECT2088 <i>N. crassa</i> DSM 1129	(Leite et al., 2019) (Xiros et al., 2008b)
xilanasi	<i>N. crassa</i> DSM 1129 <i>Aspergillus fumigatus</i> FBSPE-05 <i>A. ibericus</i> MUM 03.49 <i>Penicillium brasilianum</i> IBT 20888	(Xiros et al., 2008b) (Souza et al., 2012) (Leite et al., 2019) (Panagiotou et al., 2006)
proteasi	<i>A. awamori</i> IOC-3914 <i>Bacillus cereus</i> PCM 2849	(de Castro et al., 2015) (Laba et al., 2017)
pectinasi	<i>Mucor</i> sp. (ABI)	(Hassan et al. 2020)
peptidasi	<i>B. cereus</i>	(Kotlar et al., 2012)

L'utilizzo dei funghi è preferito rispetto ai batteri perché hanno rese più alte e producono maggiori quantitativi di enzima e soprattutto nel caso di cellulasi, amilasi e simili questi vengono secreti esternamente facilitando il processo di estrazione degli stessi dal terreno di fermentazione. La ricerca in questo campo è stata finora condotta soltanto su scala di laboratorio, il prossimo *step* sarà realizzare degli scale-up per rendere finalmente fruibile dall'industria questo tipo di fermentazione (Marcus e Fox, 2021). Alcuni studi si sono invece concentrati sull'utilizzo di funghi filamentosi per migliorare il contenuto nutrizionale del BSG, soprattutto aumentandone il contenuto proteico e amminoacidico impiegando varie specie di *Rhizopus* e *Aspergillus* (Canedo et al., 2016; Cooray e Chen, 2018).

1.3.4 Il BSG nella produzione di adsorbenti e materiali sostenibili

Unendo la carbonizzazione della biomassa a temperature comprese tra i 400 e i 500°C ad una attivazione fisico-termica o chimica che porta all'ottenimento di un materiale ad alta porosità,

si può ricavare carbone attivo dal BSG (Allen et al., 2008). Il carbone attivo è utilizzato nel trattamento di liquidi e gas per rimuovere da essi, tramite adsorbimento, impurità, composti maleodoranti e tossici (Sajjadi et al., 2019); ciò è possibile grazie all'elevata area specifica del materiale adsorbente dovuta alla sua porosità che permette di trattenere le molecole d'interesse. Vi sono studi riportati in letteratura che confermano la possibilità di usare il BSG come materia prima nella produzione di carbone attivo mediante attivazione termico-fisica (Badr et al., 2000). Il materiale adsorbente ricavato dal BSG ha proprietà comparabili o persino migliori rispetto ai carboni attivi commerciali per quanto riguarda il trattamento di ioni (cromo e ferro) e composti fenolici (Osman et al., 2020; Vanderheyden et al., 2018) oltre al fatto che, anche dopo la saturazione dei siti attivi, può essere utilizzato per adsorbire metalli pesanti da soluzioni acquose (Wierzba e Kłos, 2019). Dato il basso contenuto di ceneri e l'alto contenuto di fibre che lo caratterizzano, il BSG è stato anche testato nella produzione di mattoni per l'edilizia. In generale sembrerebbe adatto come riempitivo e come materiale di rinforzo (Jones et al., 2020), l'idea è quindi quella di rimpiazzare la sabbia comunemente utilizzata nella loro realizzazione con il BSG essiccato non intaccandone però la qualità (Guido e Moreira, 2017; Mussatto et al., 2006) e riducendo i costi di produzione. Nello studio compiuto da (Ferraz Eduardo et al., 2013) viene indagato l'effetto dell'aggiunta di BSG al 5,10 e 15% rispetto al totale dei materiali impiegati nella costruzione di mattoni trovando che il migliore compromesso tra costi e caratteristiche del prodotto finale è raggiunto con il valore più basso, mentre (Russ et al., 2005), con una aggiunta di BSG pari al 3,5% del peso totale, hanno raggiunto dei risultati compatibili con le specifiche di legge tedesche permettendo al prodotto di entrare nel mercato. In generale l'aggiunta di BSG porta alla realizzazione di materiali da costruzione con resistenza, porosità e isolamento termico (propriamente conduttività termica) confrontabili se non addirittura migliori dei materiali. Il BSG è stato anche aggiunto alle schiume poliuretatiche rivelandosi un buon materiale di rinforzo e soprattutto biocompatibile e a basso costo (Formela et al., 2017). Per le applicazioni appena citate naturalmente il BSG viene essiccato prima di essere impiegato per renderlo biologicamente più stabile ritardando l'attacco dei microrganismi e perché il suo alto contenuto d'acqua potrebbe anche minare l'integrità strutturale del materiale.

1.4 Solid state fermentation di residui lignocellulosici con funghi filamentosi

Cellulosa, emicellulosa e lignina come già detto sono i componenti preponderanti del BSG, essi sono polimeri vegetali presenti nelle pareti cellulari di alcune piante con il compito di mantenere la rigidità strutturale delle stesse. Sono spesso utilizzati come fonte di nutrimento per i funghi filamentosi (Marcus e Fox, 2021), noti per la capacità di degradare questi composti in natura, mentre non sono digeribili dagli esseri umani. La struttura eteropolimerica e complessa di lignina ed emicellulosa (quest'ultima composta principalmente da arabinoxilani) rende questi polimeri naturalmente difficili da degradare, poiché è richiesto l'impiego di differenti tipologie di enzimi atti ad idrolizzare i diversi specifici legami presenti in queste molecole. In aggiunta a quanto già detto, anche se la cellulosa risulta essere la molecola più semplice e lineare essendo composta da tante unità monomeriche di D-glucosio, il fatto di potersi trovare come intrappolata all'interno della matrice lignocellulosica (è questo il caso del BSG) aumenta la resistenza della matrice stessa all'azione degli enzimi idrolitici (Zoghlami e Paës, 2019) (fig 1.5).

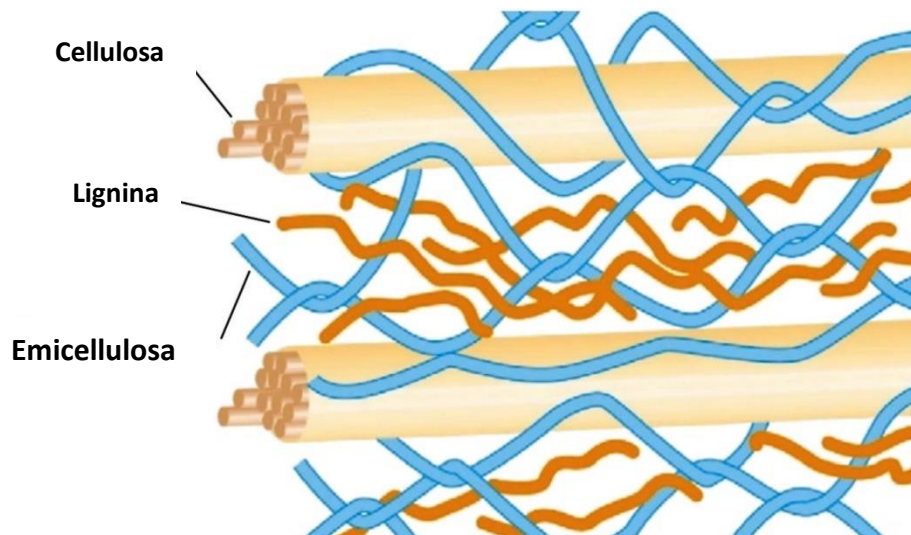


Figura 1.5 Rappresentazione semplificata della struttura di una parete cellulare di una pianta (modificato da Lynch et al. (2016))

I funghi filamentosi riescono però a produrre il corredo enzimatico necessario e ad essere quindi impiegati nei processi che prevedono la parziale o totale degradazione dei polimeri vegetali citati (Knob et al., 2010). La tipologia di fermentazione che ha un miglior rapporto costi-benefici quando si impiegano funghi filamentosi è la *solid state fermentation (SSF)*, che è proprio quella impiegata negli esperimenti eseguiti in questa tesi, poiché si possono far crescere i microrganismi su substrati solidi e dalla complessa composizione in totale o quasi totale assenza di acqua libera (Lonsane et al., 1985). Per il suddetto motivo la *solid state fermentation* con funghi filamentosi ha iniziato ad essere realizzata con ottimi risultati su scarti solidi dell'industria agroalimentare senza nemmeno il bisogno di pretrattamenti, necessari invece per portare avanti una *submerged fermentation (SmF)*, rendendola molto interessante in ottica di processi di valorizzazione e di riutilizzo dei residui solidi industriali. Per questo e anche per il fatto di richiedere meno energia e di produrre meno acque reflue rispetto alla SmF, la SSF è tornata, dalla fine degli anni 90, ad essere al centro della ricerca scientifica anche in occidente dopo essere stata quasi totalmente accantonata dal secondo dopoguerra in favore proprio della *submerged fermentation* che aveva portato alla scoperta della penicillina. I parametri da considerare quando si deve effettuare una SSF sono numerosi e di natura sia fisico-chimica sia biochimica come ad esempio: la temperatura e il tempo di incubazione, il trasferimento di ossigeno, la grandezza delle particelle, la variazione di umidità durante la fermentazione, il pH e il supplemento di nutrienti (per esempio fonti di azoto e carbonio) (Pandey, 2003).

1.4.1 Fungo filamentoso impiegato nelle fermentazioni: *Rhizopus oligosporus*, caratteristiche morfologiche e utilizzi

Il tipo di microrganismo utilizzato nelle fermentazioni che verranno descritte nei prossimi paragrafi è il *Rhizopus microsporus var. oligosporus*. I funghi del genere *Rhizopus* fanno parte della classe degli Zigomiceti e in quanto tali sono aerobici e in maggioranza saprotrofi (pochi sono invece parassiti). Si possono riprodurre sia per via sessuale mediante gli zigosporangi e le zigospore, di forma sferica, che si formano dall'unione di due ife compatibili (gametangi), sia

per via asessuale con le sporangiospore (Jennessen et al., 2008). Essendo della famiglia delle *Mucoraceae* sono anche caratterizzati da un tallo non segmentato e plurinucleato ancorato al substrato su cui crescono tramite rizoidi (Lennartsson et al., 2014; Moore et al., 2011) (figura 1.6).

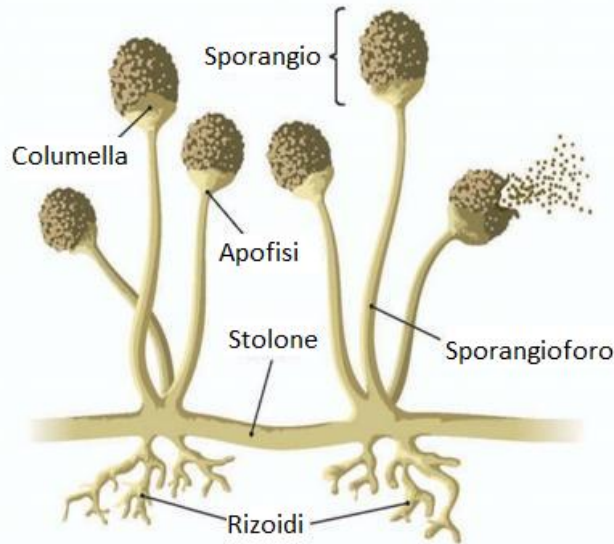


Figura 1.6 Schema della struttura di *Rhizopus oligosporus* (modificato da <https://docplayer.info/docs-images/71/64495759/images/40-0.jpg>)

Al contrario di altre varietà di *Rhizopus* appartenenti al gruppo microsporus, il *R. oligosporus* è stato completamente domesticato e non produce i metaboliti secondari dannosi per la salute (es. Rizonine A e B) tipiche del gruppo microsporus (Jennessen et al., 2005). Esso è infatti utilizzato da centinaia di anni in Indonesia nella produzione di tempeh (o tempe), un cibo dall'alto contenuto proteico utilizzato come sostituto della carne e prodotto a partire dalla soia, dove i semi leguminosi, dopo la fermentazione con il fungo, sono tenuti insieme (come a formare una torta compatta) dal micelio bianco di *Rhizopus oligosporus* (fig. 1.7) (Handoyo e Morita, 2006).



Figura 1.7 Aspetto del tempeh a base di soia (immagine da (Maheshwari et al., 2021))

1.4 Scopo del lavoro

L'obiettivo di questa tesi è lo studio dell'utilizzo del BSG come substrato nella fermentazione allo stato solido con *Rhizopus oligosporus* con il fine di renderlo appetibile per l'industria alimentare. L'attenzione è stata posta innanzitutto su uno sviluppo omogeneo del micelio del fungo sul BSG in modo da stabilizzare la matrice lignocellulosica come avviene per i legumi utilizzati nella realizzazione del tempeh. La prima parte del lavoro si articola quindi intorno a questi passaggi:

- ottimizzazione della coltivazione di *Rhizopus oligosporus* su BSG in sacchetti di LDPE trovando le condizioni migliori per lo sviluppo del micelio e per rendere il processo replicabile;
- valutazione degli effetti della fermentazione sul substrato mediante una caratterizzazione della matrice fermentata;

Una volta trovate le condizioni di crescita migliori e caratterizzata la matrice fermentata, l'attenzione è stata incentrata sulla valutazione della variazione del contenuto proteico tra il BSG tal quale e i prodotti ottenuti, per dimostrare se questo tipo di fermentazione possa portare ad un aumento della concentrazione delle proteine nei prodotti fermentati rispetto a quella del BSG di partenza.

2. Materiali e metodi

2.1 Caratterizzazione del BSG

Come detto nel primo capitolo, il BSG ha una struttura complessa e molto variabile in base alla qualità di cereale utilizzata e ai processi che subisce all'interno della linea di produzione in cui viene impiegato. Perciò la prima attività di laboratorio su cui si è concentrato il nostro studio è stata una caratterizzazione del BSG, in modo da ricavare alcune caratteristiche del substrato che verrà utilizzato per le fermentazioni. Questo procedimento viene chiamato *proximate analysis* (Feldsine et al., 2002), è tipicamente utilizzato per le analisi dei prodotti destinati al consumo alimentare ed è una procedura composta da prove analitiche standardizzate differenti per la valutazione quantitativa delle diverse macromolecole presenti nel materiale analizzato. Il BSG che è stato utilizzato per le prove sperimentali (figura 2.1) ci è stato gentilmente fornito dal Birrificio Leumann a Collegno (TO) dove è stato utilizzato per produrre una birra Pilsner (“Smemorata”) a bassa fermentazione non filtrata e non pastorizzata.



Figura 2.1 Aspetto del BSG utilizzato (scongelato a T_{amb})

È stato ritirato dal birrificio immediatamente dopo la sua separazione dal mosto dovuta al processo di filtrazione, fatto raffreddare a temperatura ambiente all'interno di un contenitore chiuso e da subito conservato in congelatore a -20°C per evitare il più possibile contaminazioni e proliferazioni indesiderate di colonie microbiche.

2.1.1 Contenuto di umidità

Il contenuto di umidità della biomassa è stato ricavato per metodo gravimetrico. Le analisi sono state condotte in triplicato su due campioni rispettivamente di 2 e 3 grammi di BSG tal quale (scongelato a temperatura ambiente); i campioni sono stati posti in stufa a 105°C per 24 ore

valutandone il peso prima e dopo l'operazione. In questo modo sottraendo il peso finale del campione analizzato a quello iniziale si è ottenuta la quantità di umidità presente nello stesso. Chiaramente il complemento a uno di questo valore, nonché quello che è il peso finale del campione, rappresenta il quantitativo di solidi totali presenti nella sostanza. La stufa utilizzata per questa operazione è una *ISCO 9000* (figura 2.2) termostata e a convezione forzata.



Figura 2.2 Stufa utilizzata per l'analisi del contenuto di umidità

Può lavorare in un campo di temperature compreso tra $+5^{\circ}\text{C}$ e $+250^{\circ}\text{C}$ con una precisione di $\pm 1^{\circ}\text{C}$ rispetto al set point impostato. I campioni sono stati posti in stufa all'interno di classici crogioli in porcellana utilizzati per le analisi di questo tipo. Infine, le pesate sono state effettuate impiegando una bilancia analitica di precisione *Gibertini E42S* avente una sensibilità di 0,1 mg (figura 2.3).

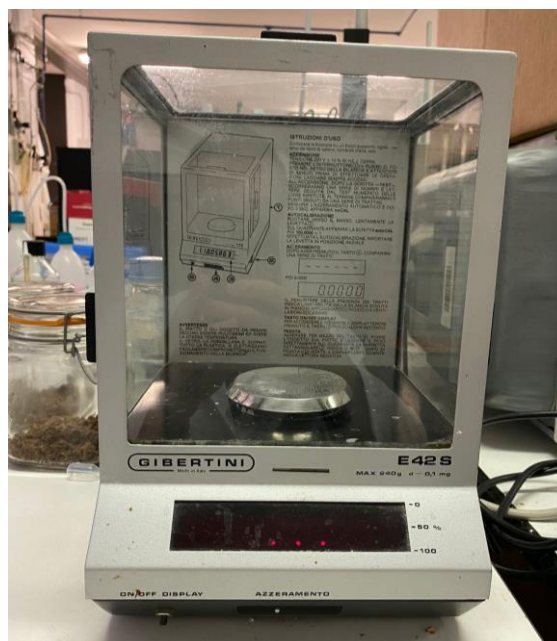


Figura 2.3 Bilancia utilizzata per analisi con metodo gravimetrico

2.1.2 Contenuto di ceneri

Le ceneri presenti nei campioni sono state valutate anch'esse per metodo gravimetrico dopo passaggio in forno a muffola (figura 2.4).



Figura 2.4 Forno a muffola con i crogioli contenenti i campioni analizzati

I crogioli contenenti i campioni di BSG essiccati in stufa per l'analisi del contenuto di umidità sono stati posti nel forno e mantenuti a 550°C per 6 ore. Come fatto in precedenza sono stati valutati i pesi dei campioni prima e dopo la permanenza ad alta temperatura. La differenza tra i valori iniziali e finali del peso dei campioni rappresenta il contenuto di ceneri (solidi residui) su base secca e il relativo complemento a uno indica il quantitativo di solidi volatili.

2.1.3 Valutazione del pH e dell'acidità titolabile

Sono stati scongelati a temperatura ambiente 3 campioni da 20 g di BSG e ognuno è stato posto in un becher contenente 50 mL di uno tra tre diversi solventi: acqua, KCl o CaCl₂. I sistemi sono stati mantenuti in agitazione per 2 ore a 500 rpm mediante l'utilizzo di un agitatore magnetico e di una ancoretta (Fig. 2.5).

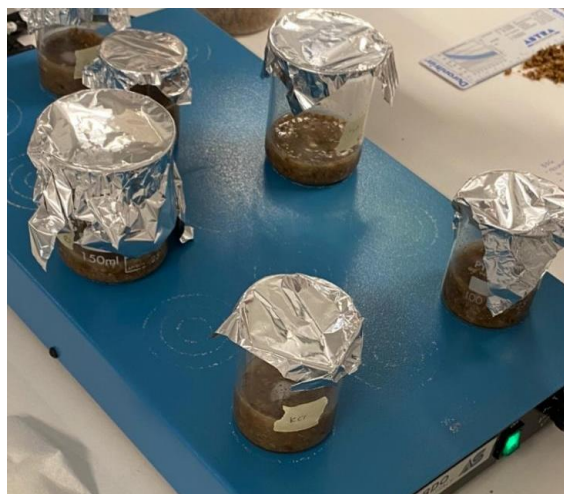


Figura 2.5 Sistemi con BSG e solvente in agitazione

Alla fine dell'agitazione le sospensioni ottenute sono state filtrate con una garza separando la fase liquida da quella solida per poterne valutare il pH con l'utilizzo di un pH-metro inoLab® pH 730 (figura 2.6) operante con elettrodo manuale SenTix® 81.



Figura 2.6 pH-metro utilizzato

Il surnatante del sistema contenente acqua e BSG è stato poi sottoposto a titolazione acido-base in modo da poterne calcolare l'acidità titolabile espressa in g_{eq} di acido acetico. Sono stati prelevati 10 mL di fase liquida tramite l'utilizzo di una micropipetta che poi sono stati diluiti in rapporto 1:10 in una beuta aggiungendo 100 mL di acqua distillata (poiché la diluizione permette una più facile visualizzazione del viraggio della sostanza durante la titolazione). Successivamente sono stati aggiunti 0,1 mL di fenolftaleina (indicatore) e si è passati alla titolazione utilizzando NaOH 0,1N come agente titolante. L'acidità titolabile è stata calcolata con la formula 2.1:

$$g_{eq}CH_3COOH = \frac{V_{NaOH} \times M_{NaOH} \times PM_{CH_3COOH}}{V_{sol}} \quad (2.1)$$

V_{NaOH} = volume di NaOH utilizzato per titolare

M_{NaOH} = molarità di NaOH utilizzato per titolare

PM_{CH_3COOH} = peso molecolare dell'acido acetico

V_{sol} = volume della soluzione da titolare

2.2 Caratterizzazione microbiologica

Come indicato da Robertson et al. (2010a, 2010b), la microflora naturalmente presente nel BSG subito dopo essere uscito dal processo di filtrazione è abbastanza limitata (10^2 - 10^3 UFC/g), ma se la conservazione avviene a temperatura ambiente e/o con modalità che non inibiscono la crescita microbica, la sua concentrazione può salire oltre le 10^6 UFC/g già in pochi giorni.

Sempre secondo gli stessi studi, sul BSG sono stati isolati soprattutto batteri (mesofili e termofili sia aerobici che anaerobici) ma anche diverse specie di funghi filamentosi appartenenti ai generi *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor* e *Penicillium*. Per questo motivo abbiamo deciso di effettuare una caratterizzazione microbiologica su capsule di Petri e un'analisi respirometrica in microcosmi per valutare quantitativamente la presenza di microrganismi sul BSG utilizzato.

2.2.1 Incubazione di BSG tal quale su MEA

La prima prova è stata effettuata trasferendo, con l'impiego di un'ansa sterile, del BSG scongelato a temperatura ambiente su piastre contenenti un terreno agar-malto (Malt Extract Agar-MEA) con composizione:

- 20 g/l estratto di malto,
- 20 g/l glucosio,
- 2 g/l peptone,
- 20 g/l agar.

I componenti del terreno sono stati miscelati con acqua in una bottiglia di vetro e poi posti in autoclave (a 121°C e 2 atm per 20 min) per permettere all'agar di sciogliersi e facilitare il versamento della soluzione nelle Petri; dopo essersi raffreddato, il terreno si solidifica grazie all'azione addensante dell'agar. Le piastre utilizzate sono di dimensioni standard con diametro pari a 90mm e in ognuna di queste vengono aggiunti 20 mL di terreno agarizzato. Il BSG è stato impiegato in due condizioni differenti: tal quale e triturato in mulino per 1 minuto; le piastre così realizzate sono state chiuse con del parafilm e tenute in incubazione a temperatura ambiente al buio per dieci giorni (fig 2.7).

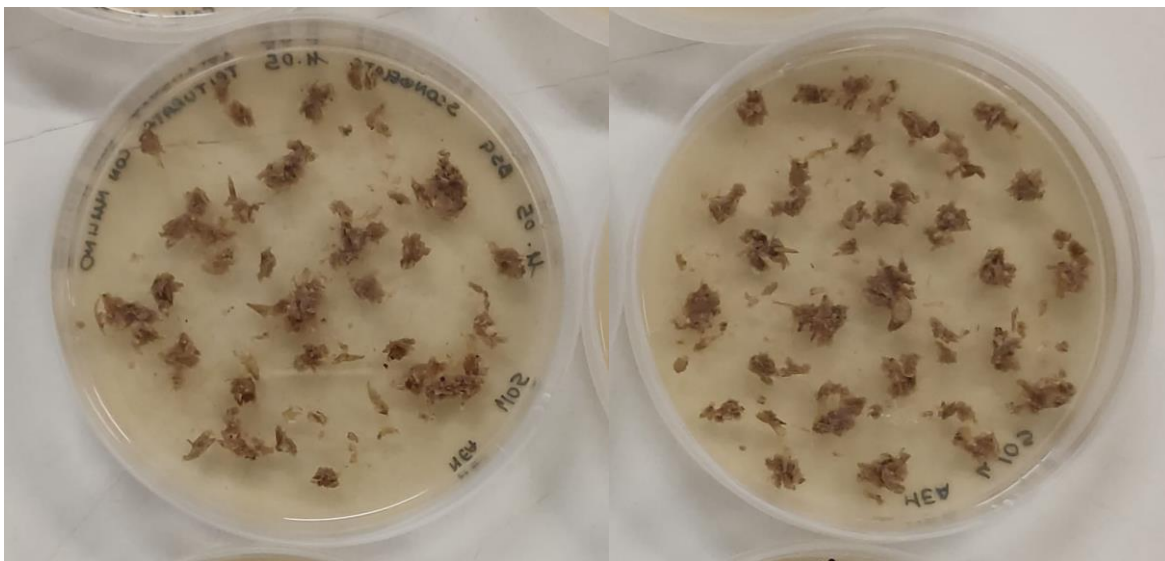


Figura 2.7 Aspetto delle piastre con BSG tal quale (a destra) e trituro (a sinistra)

2.2.2 Metodo delle diluizioni successive e inoculo per inclusione

Metodo delle diluizioni successive

Abbiamo realizzato un estratto aggiungendo 10g di BSG (scongelato a T_{amb}) in una beuta contenente 100 mL di buffer fosfato a pH 7 (per la sua preparazione sono stati aggiunti 8,94g di Na_2HPO_4 e 11,99g di NaH_2PO_4 in 100 mL di acqua distillata). Nel sistema sono state poi inserite delle sfere di vetro per favorire l'estrazione e il tutto è stato mantenuto in agitazione a 125 rpm per 2 ore in uno shaker orbitale. Il surnatante ottenuto con questa operazione, sia tal quale sia diluito con il buffer fosfato preparato in precedenza in rapporti 1:10 e 1:100 (v/v), è stato utilizzato nella realizzazione di piastre (con terreno MEA). In ogni Petri sono stati piastrati 100 μ L di liquido (tal quale o diluito) tramite *spreading* con un'ansa sterile (ogni tipologia è stata sempre effettuata in triplicato). Tutte le piastre sono state poi poste in termostato a 32°C per 7 giorni.

Inoculo per inclusione

L' inoculo per inclusione è stato portato avanti in parallelo alla prova descritta precedentemente ed è stato realizzato anch'esso in triplicato. Sono stati inseriti 0,1g o 0,2g di BSG tal quale (scongelato a T_{amb}) all'interno di Petri vuote e sopra di essi sono stati successivamente trasferiti con una micropipetta 200 o 400 μ L di buffer fosfato rispettivamente, in entrambi i casi sono stati poi versati sopra al BSG umidificato i 20 mL di terreno agar-malto. Anche in questo caso le piastre sono state poste in termostato e mantenute a 32°C per 7 giorni. Il termostato utilizzato nelle prove appena descritte è un *MaxQTM 6000*, lavora in un campo di temperature compreso tra -15°C e +60°C monitorato tramite un controller PID con un'accuratezza rispetto al set point di $\pm 0,1^\circ\text{C}$. È dotato anche di uno shaker orbitale operante a velocità di rotazione comprese tra 15 e 300 rpm (fig. 2.8).



Figura 2.8 Termostato utilizzato

Inoltre, tutte le operazioni che hanno coinvolto le piastre dalla loro preparazione al trasferimento di BSG su di esse, è stato eseguito sotto cappa microbiologica di classe 2 Labogene SCANLAF MARS (fig 2.9).



Figura 2.9 Cappa microbiologica utilizzata

Le piastre di entrambe le tipologie sono state monitorate visivamente e tramite fotografie effettuate ad intervalli regolari per valutare la presenza e la crescita delle comunità microbiche.

2.2.3 Analisi respirometrica

In questa specifica analisi si cerca di quantificare l'anidride carbonica prodotta dalla respirazione dei microrganismi presenti sulla matrice da studiare. Si inserisce il substrato in un sistema chiuso dove verrà catturata la CO_2 che diffonde dalla matrice solida verso lo spazio di testa del sistema tramite l'utilizzo di un volume noto di una soluzione di NaOH. I milligrammi di gas prodotti vengono poi calcolati tramite una formula empirica i cui dati sono ricavati dalla titolazione del volume di NaOH. Nel nostro caso abbiamo inserito 80g di BSG tal quale (scongelato a T_{amb}) e 20 mL di NaOH 1N in barattoli di vetro da 1 L (microcosmo). I barattoli sono stati poi chiusi ermeticamente mediante l'inserimento di una guarnizione in gomma sotto al tappo in modo da non permettere all'anidride carbonica presente nell'atmosfera di entrare nel microcosmo e invalidare la prova. L'utilizzo di acqua decarbonatata nella preparazione della soluzione di NaOH 1N è stata un'altra misura impiegata per non alterare i risultati della titolazione: la decarbonatazione si ottiene portando ad ebollizione l'acqua distillata all'interno di una bottiglia di vetro chiusa con un foglio di alluminio mentre la si tiene in agitazione con un'ancoretta magnetica; per garantire l'eliminazione della CO_2 questa situazione viene

mantenuta per un'ora. Dopo aver fatto raffreddare l'acqua decarbonatata in modo da poterla maneggiare, si prepara la soluzione di soda che viene quindi posta nel microcosmo all'interno di un becher posizionato su un apposito treppiede di plastica (fig. 2.10). Il contenuto del becher è stato sottoposto a titolazione con HCl 1N ad intervalli regolari ed ogni volta è stato sostituito con una nuova soluzione di NaOH identica alla precedente, avendo sempre cura di esporre per il tempo minore possibile il contenuto del nostro microcosmo all'atmosfera esterna.



Figura 2.10 Esempio di microcosmo utilizzato per la prova respirometrica

Per titolare si aggiungono alla soda la fenolftaleina come tracciante e BaCl_2 come agente precipitante. Il volume di acido utilizzato per titolare può essere correlato alla quantità di anidride carbonica prodotta poiché si sfrutta la proprietà delle molecole di NaOH che si sono legate precedentemente alla CO_2 per cui esse non reagiscono più con l'agente titolante, questo significa che le uniche molecole ad essere rilevate dalla titolazione saranno quelle che non si sono legate al gas e che risultano ancora "libere". È stato anche allestito come parametro di controllo un microcosmo uguale in tutto e per tutto ai precedenti ma abiotico poiché sterilizzato tramite passaggio in autoclave (121°C , 2 atm, 20 minuti) e conservato in condizioni di sterilità sotto cappa microbiologica. La titolazione della soluzione di NaOH 1N contenuta nel microcosmo abiotico fornisce un parametro necessario per la correlazione empirica seguente (2.2) che restituisce i mg di CO_2 prodotti in quelli biotici:

$$mg_{\text{CO}_2} = (V_0 - V) * f \quad (2.2)$$

V_0 = mL di HCl utilizzati per titolare la soluzione di NaOH nel sistema abiotico;

V = mL di HCl utilizzati per titolare la soluzione di NaOH nel sistema biotico;

f (fattore di conversione) = ricavata da $22 * M$ ed espressa in mg/mL

M = molarità della soluzione di HCl utilizzata per titolare

I componenti materiali dei microcosmi biotici (barattoli, becher e treppiedi) ed il microcosmo abiotico sono stati sterilizzati con passaggio in autoclave *Fedegari FVG2* (fig. 2.11).



Figura 2.11 Autoclave utilizzata

Questa autoclave ha una capacità utile di 75L e può operare ad alte temperature e pressioni (fino a 140°C e a 3,5 bar) grazie ad un sistema a doppio sensore che permette il controllo di entrambi i parametri necessari al processo di sterilizzazione.

2.3 Solid state fermentation del BSG con *Rhizopus oligosporus*

Lo studio di questa tesi si è concentrato sull'utilizzo del BSG come substrato nella fermentazione allo stato solido con *Rhizopus oligosporus* prendendo spunto dal concetto del tradizionale tempeh indonesiano: un cibo dall'alto contenuto proteico realizzato tramite la fermentazione di soia e altri legumi con questo fungo filamentoso. Il fine ultimo di queste fermentazioni è quello di riuscire ad ottenere un prodotto finale edibile e dal contenuto proteico migliorato rispetto a quello di partenza. Per la preparazione degli inoculi è stato utilizzato uno *starter* di tempeh commerciale ("*Tempehtation*") composto da spore di *Rhizopus oligosporus* e tracce di farina di riso integrale e di soia.

2.3.1 Prove di fermentazione in sacchetti di LDPE

Fermentazione a temperatura ambiente

Per valutare la fattibilità della realizzazione di tempeh partendo dal BSG abbiamo effettuato delle prove preliminari di fermentazione in sacchetti di LDPE, monitorando regolarmente lo sviluppo macroscopico del micelio e la variazione del peso dei sistemi in fermentazione mediante pesate. Sono stati allestiti due sistemi in parallelo e i parametri fermentativi scelti per queste prove sono stati:

- Caratteristiche dei sacchetti: materiale LDPE, dimensioni 12x8 cm, volume utile di 175 ml
- Temperatura: T_{amb} con naturale escursione termica giorno-notte
- Massa di substrato (BSG tal quale scongelata a T_{amb}): 50g
- Inoculo: sospensione acquosa al 6,6% m/v di starter di tempeh e 0,6% m/v di farina di riso (utilizzata come fonte di carbonio supplementare per accelerare la crescita del fungo)
- Inoculazione: 10 ml della sospensione di inoculo (20% $v/m_{substrato}$)

Il BSG scongelato è stato inserito nei sacchetti di plastica mediante l'uso di un cucchiaino in acciaio sterilizzato mentre la sospensione di inoculo, preparata precedentemente in una falcon sterile con acqua sterilizzata in autoclave, è stata inoculata sul substrato con una micropipetta da 1 ml e omogeneizzata prima di ogni trasferimento con l'impiego di un vortex. Una volta inseriti substrato e inoculo, i sacchetti sono stati sigillati mediante la chiusura a pressione presente avendo sempre cura di eliminare più aria possibile dall'interno del sistema. I sacchetti così preparati sono stati poi massaggiati per distribuire nel modo più uniforme possibile l'inoculo e il substrato all'interno del volume di ogni *batch*. I due sistemi in fermentazione sono stati appoggiati in orizzontale (sulla faccia inferiore del sacchetto) su dei supporti e forati sistematicamente con una pinza da laboratorio (soltanto sulla faccia superiore per evitare il percolamento dell'inoculo per gravità dall'altro lato) per permettere un apporto di ossigeno ad entrambi i *batch* il più simile possibile (figura 2.12). Dopo cinque giorni, i sistemi sono stati capovolti e forati anche sull'altra faccia impiegando lo stesso pattern di buchi utilizzato in precedenza, in modo da evitare condizioni di anaerobiosi e di stress per il fungo nella porzione inferiore non esposta all'aria.



Figura 2.12 Aspetto dei sistemi ad inizio fermentazione

Questa operazione è stata eseguita anche per fare in modo che la crescita del micelio su entrambi i lati del sacchetto fosse il più comparabile possibile fornendo un apporto di ossigeno quantitativamente simile nei due casi. A fine fermentazione è stato anche valutato il contenuto di umidità dei sistemi tramite metodo gravimetrico dopo passaggio in stufa (24 ore a 105°C) di tre porzioni di massa pari a 3g asportati da tre zone diverse (superiore, centrale e inferiore) dei prodotti di fermentazione. I valori ottenuti dai dati ricavati dalle pesate sono stati utilizzati per esprimere e confrontare la concentrazione di umidità media all'interno dei *batch* a fine fermentazione con quella presente all'inizio. È importante riportare inoltre che dopo la prova di fermentazione appena descritta sono state realizzate altre due prove di questo tipo con gli stessi parametri e con modalità in tutto e per tutto identiche, ma con temperatura e umidità esterne differenti essendo state condotte in un periodo temporale successivo (fine settembre per le seconde prove rispetto a fine agosto per la prima).

Fermentazione termostata

Successivamente le fermentazioni in sacchetto sono state condotte in condizione di temperatura controllata all'interno di un termostato (SNJ-159B) di dimensioni 368x190x145 mm (figura 2.13) operante con una precisione rispetto al set point impostato di $\pm 1^\circ\text{C}$.



Figura 2.13 Termostato utilizzato per le fermentazioni

I parametri selezionati per queste fermentazioni sono stati:

- Range di temperatura: 30-32°C
- Massa di substrato: 50g di BSG tal quale scongelato a T_{amb}
- Inoculo: sospensione acquosa al 3,3% m/v di starter di tempeh e 0,3% m/v di farina di riso (acqua sterilizzata in autoclave)
- Inoculazione 10% $V_{\text{inoculo}}/m_{\text{substrato}}$

La preparazione del substrato nei sacchetti e l'inoculazione sono stati effettuati con le stesse modalità descritte in precedenza ed anche in questo caso i sistemi sono stati forati sistematicamente e posti in orizzontale su dei supporti forati (fig. 2.14).



Figura 2.14 Disposizione dei sacchetti all'interno del termostato

2.3.2 Ottimizzazione della fermentazione in sacchetti di LDPE

Dopo le prove preliminari di fermentazione descritte in precedenza e l'analisi dei risultati ottenuti, abbiamo cercato di ottimizzare questo processo per ottenere i parametri necessari ad una crescita macroscopica del micelio uniforme e ripetibile. I seguenti sono i parametri comuni a tutte le fermentazioni, ovvero quelli che non hanno mai subito variazioni tra le varie prove:

- Substrato: BSG tal quale scongelato a Tamb
- Inoculo: sospensione acquosa al 3,3% di starter tempeh *m/v* di starter tempeh + 0,3% *m/v* di farina di riso
- Caratteristiche dei sacchetti: materiale LDPE, dimensioni 12x8 cm, volume utile di 175 ml
- Allestimento dei sistemi: in verticale poggiante sul lato lungo del sacchetto

Le variazioni tra prova e prova hanno invece interessato i seguenti parametri:

- Range di temperatura
- Pattern di fori applicato sui sacchetti
- Massa di substrato
- Rapporto tra volume di inoculo e massa di substrato

L'allestimento dei sistemi, per quanto riguarda l'inserimento del substrato e la modalità di inoculazione, ricalca quello utilizzato in precedenza, la differenza è rappresentata invece dal posizionamento in verticale dei sacchetti, reso possibile grazie all'impiego di supporti in metallo (tipo portatovaglioli), come mostrato in figura 2.15, il quale ha permesso di applicare i fori su entrambe le facce dei sacchetti contemporaneamente evitando una manipolazione degli stessi in un secondo momento.



Figura 2.15 Particolare della disposizione in verticale dei sacchetti durante una prova

I pattern utilizzati sono stati realizzati sempre con una pinza da laboratorio effettuando nei tre casi un numero crescente di buchi su ogni faccia del sacchetto. Il fine di questa operazione è stato quello di poter variare il rapporto tra area forata e area superficiale del sacchetto (figura 2.16) per avere un apporto di ossigeno al sistema diverso da caso a caso. Questo rapporto è stato valutato tramite *image analysis* delle foto dei fori effettuate al microscopio, operazione che ha restituito un valore medio della loro dimensione.

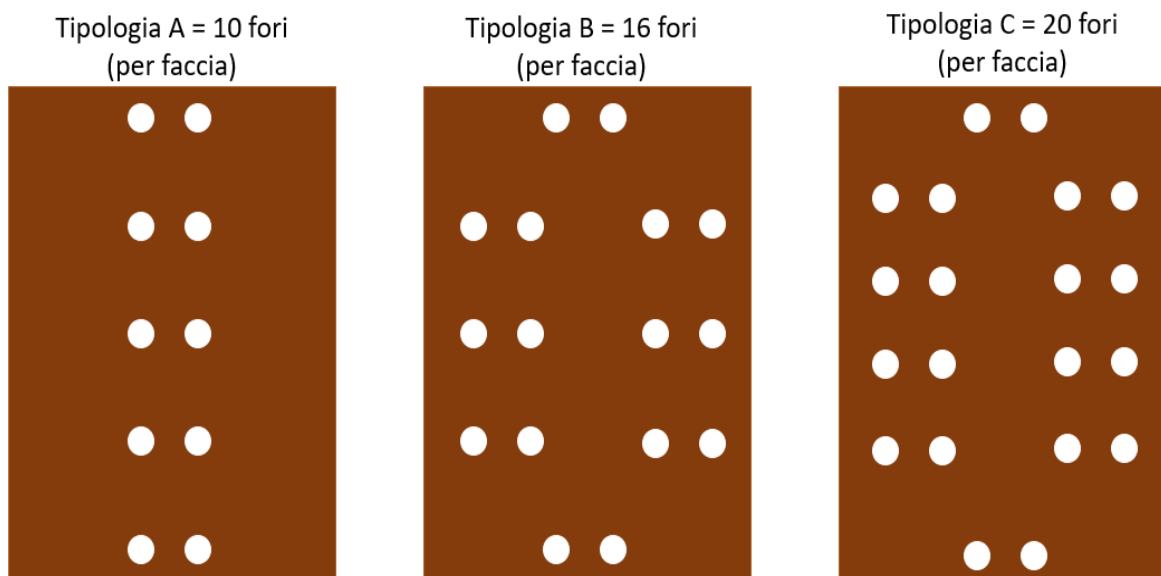


Figura 2.16 schema dei tre pattern di buchi utilizzati

Il microscopio utilizzato per questa analisi di immagini è un Olympus BHS con illuminatore a fluorescenza BH2-RFCA (Figura 2.17). Le foto sono state effettuate con un ingrandimento 4X e con fotocamera HAYEAR da 16MP utilizzando il software KOPPACE-VIEW, mentre le analisi di immagine sono state effettuate tramite il software ImageJ.

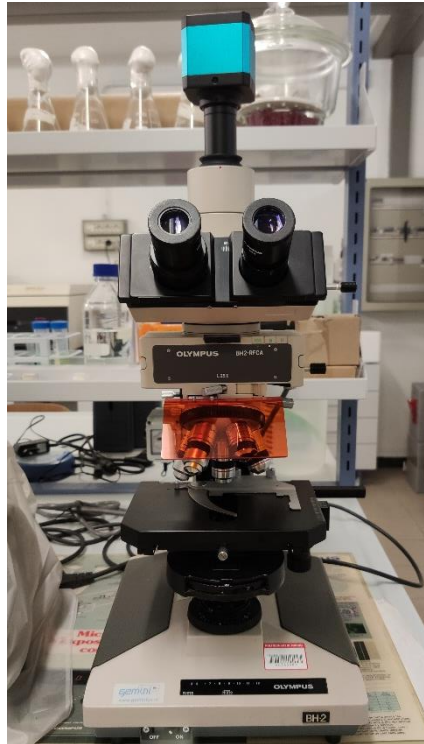


Figura 2.17 Microscopio utilizzato per l'*image analysis*

Le varie prove di fermentazione sono state eseguite in ordine cronologico e in ognuna di esse è stato indagato l'effetto della variazione di un parametro (tra due valori scelti arbitrariamente) sulla crescita macroscopica del micelio del fungo; dopo aver valutato quale dei due valori restituisse la crescita migliore, abbiamo eliminato il parametro peggiore dalla nostra indagine e siamo passati alla prova successiva. Per tutte le fermentazioni descritte nei prossimi paragrafi ogni parametro oggetto di indagine è stato applicato con le stesse modalità a tre sacchetti diversi per garantire una maggiore ripetibilità delle prove rispetto a quella che restituirebbe la fermentazione di un singolo sistema.

Prima prova

La prima prova è consistita nell'analisi a confronto dell'effetto sulla fermentazione dell'applicazione dei pattern A e B sui sacchetti. I parametri della fermentazione sono quelli riportati in seguito in tabella 2.1:

Tabella 2.1 Parametri fermentativi della prima prova

Temperatura [°C]	Massa di substrato [g]	% di inoculo [v/m]	Pattern di fori utilizzati
30-32	50	10%	A e B

Su metà dei sacchetti è stato quindi applicato ad inizio fermentazione il pattern A mentre sull'altra metà il pattern B; tutti i sistemi sono stati poi inseriti all'interno del termostato nello stesso momento e capovolti ogni 12 ore sul lato lungo opposto. Durante questa prova sono state impiegate delle reti di plastica fissate ai sacchetti mediante degli elastici per mantenere

l'integrità strutturale dei sistemi ed evitare la sedimentazione del substrato all'interno degli stessi (figura 2.18).

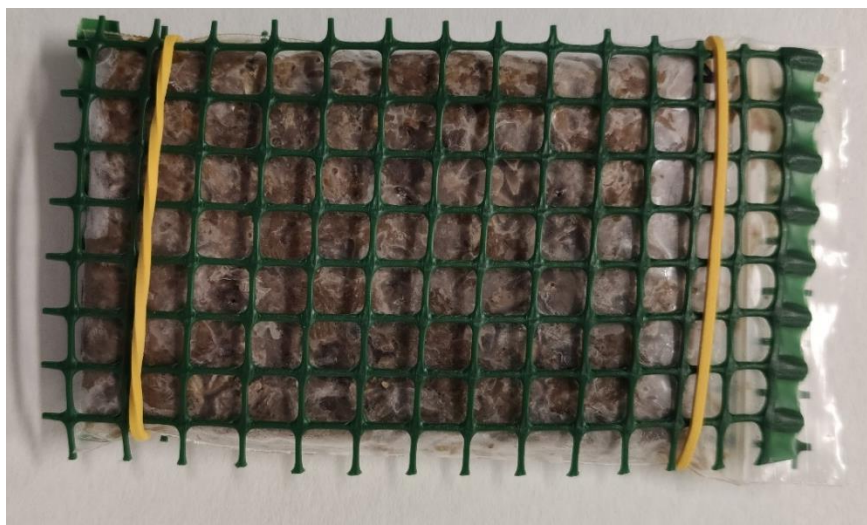


Figura 2.18 Aspetto dei batch con i supporti in plastica montati

Seconda prova

Nella seconda prova sono state comparate invece due diverse quantità di massa di substrato all'interno dei sistemi impiegando il medesimo pattern (B) sui sacchetti. I parametri della fermentazione sono quelli riportati in seguito in tabella 2.2:

Tabella 2.2 Parametri fermentativi della seconda prova

Temperatura [°C]	Massa di substrato [g]	% di inoculo [v/m]	Pattern di fori utilizzati
30-32	50 e 70	10%	B

Anche in questo caso i sacchetti sono stati inseriti in termostato nei supporti metallici e capovolti sul lato lungo opposto ogni 12 ore dall'inizio della prova di fermentazione. Per i sistemi contenenti 70 g non è stato necessario impiegare le reti di plastica per mantenere la forma del sacchetto ed evitare la sedimentazione del substrato.

Terza prova

Nella terza prova sono stati messi a confronto il pattern B e il C. I parametri della fermentazione sono quelli riportati in seguito in tabella 2.3:

Tabella 2.3 parametri fermentativi della terza prova

Temperatura [°C]	Massa di substrato [g]	% di inoculo [v/m]	Pattern di fori utilizzati
30-32	70	10%	B e C

Anche in questo caso su metà dei sacchetti è stato applicato ad inizio fermentazione il pattern B mentre sull'altra metà il pattern C; tutti i sistemi sono stati poi inseriti all'interno del termostato nello stesso momento per portare avanti le fermentazioni in parallelo e capovolti sul lato lungo opposto ogni 12h.

Quarta prova

Nella quarta prova è stato indagato l'effetto di due diverse percentuali di inoculo ($V_{\text{inoculo}}/m_{\text{substrato}}$) mentre il pattern impiegato per tutti i sistemi è stato il B. I parametri della fermentazione sono quelli riportati in seguito in tabella 2.4:

Tabella 2.4 parametri fermentativi della quarta prova

Temperatura [°C]	Massa di substrato [g]	% di inoculo [v/m]	Pattern di fori utilizzati
30-32	70	10 e 15%	B

Metà dei sistemi è stata inoculata con un volume di inoculo pari al 10% della massa di substrato presente mentre l'altra metà con una percentuale pari al 15%. Anche in questo caso tutti i sacchetti sono stati inseriti insieme nel termostato all'interno dei loro supporti e capovolti ogni 12 h sul lato lungo opposto.

Quinta prova

Nella quinta e ultima prova sono stati mantenuti il pattern B e le due diverse percentuali di inoculo ma è stato variato il range di temperatura impiegato. I parametri della fermentazione sono quelli riportati in seguito in tabella 2.5:

Tabella 2.5 parametri fermentativi della quinta prova

Temperatura [°C]	Massa di substrato [g]	% di inoculo [v/m]	Pattern di fori utilizzati
33-35	70	10 e 15%	B

Come già fatto nelle precedenti fermentazioni i sistemi sono stati capovolti ogni 12 ore sul lato lungo opposto.

2.3.3 Caratterizzazione dei prodotti di fermentazione

Una volta conclusa ogni prova di fermentazione, tutti i prodotti ottenuti sono stati conservati in congelatore a -20°C per poter permettere una caratterizzazione degli stessi in un secondo momento. Le analisi condotte hanno portato a valutare:

- Il contenuto di umidità
- Il contenuto di ceneri

- Il pH
- L'acidità titolabile
- Il contenuto di zuccheri disciolti (°Brix)

Questa caratterizzazione è servita per valutare in maniera più precisa e completa l'effetto delle varie prove fermentative e per fornire dei dati correlabili al parametro macroscopico dello sviluppo del micelio nei sistemi, fino a questo momento utilizzato come unico discriminante nella scelta del risultato migliore tra le fermentazioni.

Valutazione di umidità e ceneri

Entrambi sono stati eseguiti in duplicato per ogni sistema asportando da due zone differenti (superiore e inferiore) due campioni di 3 grammi ciascuno poi trasferiti all'interno di crogioli di porcellana come quelli usati in precedenza. Le due valutazioni sono state eseguite con metodo gravimetrico dopo passaggio in stufa (a 105°C per 24h) dei campioni scongelati per il contenuto di umidità e in muffola (a 550°C per 6h) dei campioni usciti dalla stufa per il contenuto di ceneri su peso secco. I valori del contenuto di umidità sono stati poi impiegati per effettuare un bilancio dell'acqua presente nei sistemi tra inizio e fine fermentazione per valutare le differenze tra quelli presentanti una buona crescita del fungo e quelli che invece non l'hanno sviluppata.

pH, acidità titolabile e °Brix

In questo caso ad essere utilizzate per le analisi sono state le fasi liquide ottenute dalla centrifugazione di omogeneizzati realizzati a partire dai prodotti delle fermentazioni. Gli omogeneizzati sono stati preparati frullando un campione composto da 10 g di prodotto di fermentazione e 30 mL di acqua distillata con l'impiego di un frullatore (IKA RW 20 digital) operante a 700 rpm per 10 minuti (figura 2.19).

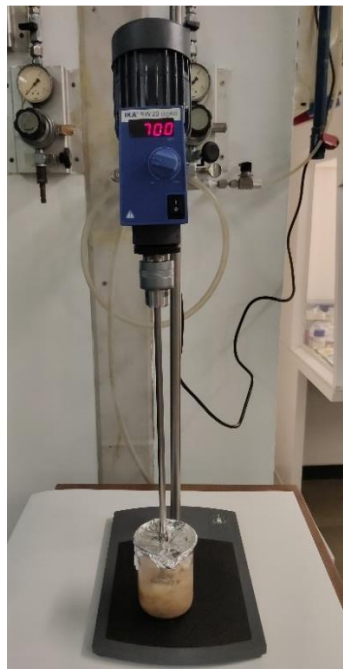


Figura 2.19 Assetto sperimentale impiegato per la realizzazione degli omogeneizzati

Il prodotto dell'omogeneizzazione è stato poi centrifugato (a 4000 rpm per 10 min a 20°C) all'interno di provette coniche da 50 ml in una centrifuga *Thermo Scientific IEC CL30* per separare la fase solida da quella liquida utile per le nostre analisi (figura 2.20). Dopo la centrifugazione la separazione vera e propria tra le due fasi è stata effettuata manualmente versando il surnatante liquido dalla Falcon in un becher.



Figura 2.20 centrifuga utilizzata

La valutazione del pH è stata effettuata in duplicato mediante misurazioni con pH-metro WTW inoLab® pH 730 ed elettrodo manuale SenTix® 81. I °Brix sono stati invece ottenuti tramite misure in duplicato con rifrattometro manuale (figura 2.21) di 100 µL di fase liquida.



Figura 2.21 Refrattometro utilizzato

La titolazione acido-base è stata effettuata con NaOH 0,1N, come agente titolante, e 100 µL di fenolftaleina, come tracciante, su una soluzione di estratto liquido e acqua in rapporto 1:5 v/v. I mL di NaOH utilizzati per titolare la soluzione sono stati poi convertiti in g_{eq} di acido acetico tramite la relazione 2.1.

2.3.4 Valutazione del contenuto di proteine

Dopo aver caratterizzato i tempeh ottenuti nelle varie prove di fermentazione, abbiamo valutato il loro contenuto di proteine mediante letture allo spettrofotometro. Anche questa analisi è stata

effettuata sulla fase liquida ottenuta dalla centrifugazione a 4000 rpm per 10 minuti degli omogeneizzati realizzati con il frullatore IKA RW 20 operante a 700 rpm per 10 minuti. Abbiamo innanzitutto realizzato una retta di taratura, da utilizzare come standard di riferimento, partendo da soluzioni di acqua e whey protein commerciali (WPI) a diverse concentrazioni in g/L. Questa miscela commerciale presenta il 75% in peso di proteine, come riportato sull'etichetta, e un 10% di contenuto di acqua, valutato con metodo gravimetrico dopo essiccazione a 60°C per 24h in stufa. Noti questi parametri, si è proceduto a realizzare una soluzione a concentrazione nota di acqua e whey protein che è stata poi diluita a 0,125; 0,25; 0,5 e 1 g/L all'interno di cuvette UV da 3 mL; i campioni diluiti sono stati utilizzati per delle letture dirette a 280 nm (lunghezza d'onda alla quale assorbono le proteine) allo spettrofotometro. I valori ottenuti sono stati impiegati per realizzare tramite interpolazione la retta di taratura in un grafico concentrazione [g/L] vs assorbanza [AU] (figura 2.22). In seguito, gli estratti liquidi ricavati dalle omogeneizzazioni sono stati diluiti in rapporto 1:50 con acqua distillata all'interno delle cuvette in modo da ottenere dei campioni che, dopo la lettura allo spettrofotometro, restituissero dei valori dello spettro di assorbimento rientranti nel campo della linearità della legge di Lambert-Beer. Per poter procedere con i calcoli abbiamo prima effettuato la correzione del *baseline* delle letture allo spettrofotometro degli estratti sottraendo ai valori di assorbanza a 280 nm il valore di assorbanza a 350nm per poter così eliminare l'imprecisione data dal rumore dello strumento e dalla possibile presenza di particelle nel campione, successivamente i dati corretti sono stati inseriti nell'equazione della retta di taratura per calcolare la concentrazione delle proteine in g/L presente nel campione analizzato.

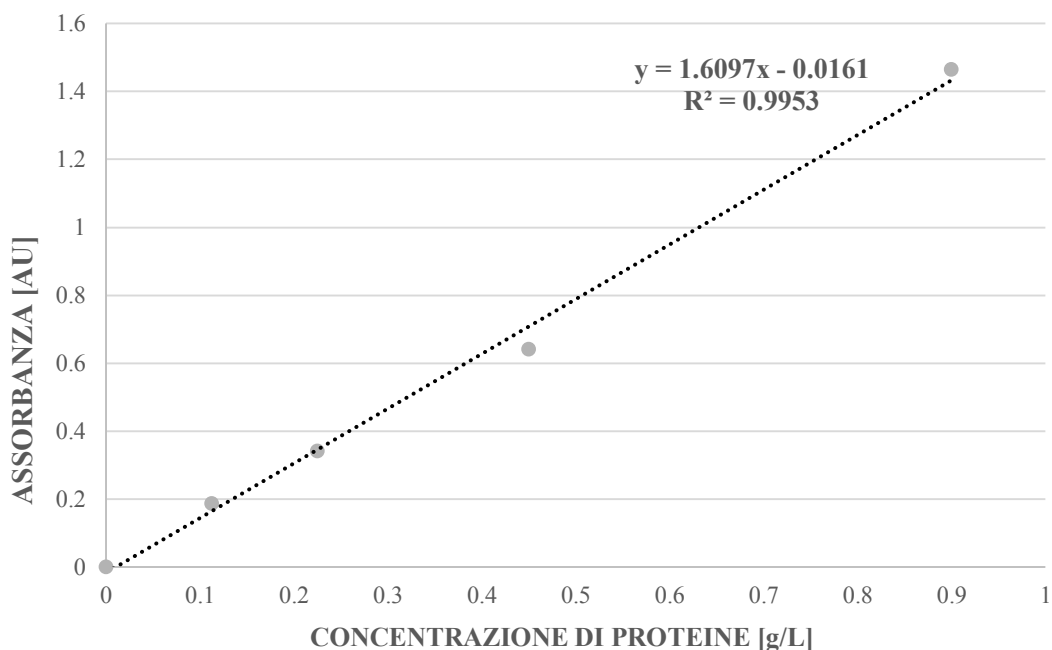


Figura 2.22 Retta di taratura utilizzata

Si è scelto di utilizzare questo mix commerciale di proteine come parametro di confronto poiché il BSG contiene diverse tipologie di proteine e amminoacidi e una retta di taratura costruita su una sola proteina (come la siero-albumina utilizzata nel metodo Bradford) avrebbe portato naturalmente a dei risultati di concentrazione meno precisi. Tutti i dati sono stati ottenuti con uno spettrofotometro PerkinElmer LAMBDA™ 465 UV/Vis con risoluzione di 1 nm (figura 2.23)



Figura 2.23 Spettrofotometro utilizzato per le analisi di concentrazione di proteine

3. Discussione dei risultati

3.1 Caratterizzazione del BSG

3.1.1 Valutazione del contenuto di umidità

I calcoli effettuati dai dati ottenuti dalle pesate in triplicato dei crogioli contenenti rispettivamente 2 e 3 g di BSG tal quale dopo la permanenza in stufa a 105°C per 24h (tabella 3.1) hanno restituito i valori medi di contenuto di umidità e solidi totali riportati in tabella 3.2.

Tabella 3.1 Dati ricavati dalle pesate

	Peso del campione [g]	Peso dopo passaggio in stufa [g]	Contenuto di Umidità [% m/m]
Campione 1	2,01	0,57	71,72%
Campione 2	2,12	0,56	73,72%
Campione 3	2,08	0,57	72,54%
Campione 4	3,14	0,87	72,14%
Campione 5	2,96	0,88	70,41%
Campione 6	3,16	0,89	71,93%

Tabella 3.2 Contenuto di umidità e di solidi medi del BSG utilizzato

Umidità (% m/m)	72,08 ± 1,08%
Solidi totali (% m/m)	28,02 ± 1,08%

I valori riportati in tabella 3.2 sono stati quelli utilizzati per i calcoli riguardanti tutte le prove di fermentazione a temperatura ambiente e la prima prova termostata, ovvero prima di iniziare con l'ottimizzazione della fermentazione allo stato solido (SSF) di *Rhizopus* in sacchetti di plastica. Questo è dovuto al fatto che una seconda analisi, effettuata con modalità identiche a quella di cui abbiamo appena riportato i valori, ha riportato i seguenti cambiamenti di composizione riportati in tabella 3.3

Tabella 3.3 Contenuto di umidità e di solidi medi del BSG utilizzato per le prove di sistematizzazione

Umidità [% m/m]	76,18 ± 0,73%
Solidi totali [% m/m]	23,82 ± 0,73%

Il cambiamento di composizione è probabilmente dato dal fatto che i cicli di congelamento e scongelamento ai quali è stato sottoposto il BSG nei mesi in cui è stato impiegato in laboratorio, necessari per ottenere i quantitativi di materia prima per le varie prove svolte, abbiano portato alla rottura delle cellule dei componenti della matrice lignocellulosica e al rilascio dell'acqua

contenuta al loro interno proprio come avviene nel metodo “freeze and thaw” impiegato nei laboratori biologici per rompere ed omogeneizzare le cellule.

3.1.2 Valutazione del contenuto di ceneri

I crogioli contenenti i campioni di BSG usciti dalla stufa sono stati posti in muffola a 550°C per 6 ore per ottenere un valore medio di contenuto di ceneri su peso secco pari a $1,40 \pm 0,61\%$ (*m/m*). Anche in questo caso la seconda analisi compiuta sul BSG ha restituito un valore differente pari a $2,31 \pm 0,41\%$ (*m/m*), ma dato che questa è una percentuale calcolata sul peso secco del BSG la differenza di valori è data dalla diminuzione della concentrazione di solidi totali tra le due prove dovuta all’aumento della percentuale di umidità interna spiegata in precedenza.

3.1.3 Valutazione del pH e dell’acidità titolabile

La misurazione del pH della fase liquida ottenuta dopo l’agitazione del BSG nei tre diversi solventi (H₂O, KCl 1M e CaCl₂ 0,01M) ha restituito i seguenti valori riportati in tabella 3.4 (le misurazioni sono state effettuate sempre in triplicato):

Tabella 3.4 Valori di pH misurati

Solventi	pH del solvente	pH solvente + BSG
H₂O	$6,02 \pm 0,12$	$5,95 \pm 0,06$
KCl 1 M	$6,45 \pm 0,09$	$6,34 \pm 0,10$
CaCl₂ 0,01 M	$5,33 \pm 0,20$	$5,24 \pm 0,07$

In tutti e tre i casi riportati, l’aggiunta del BSG al solvente ha portato ad un abbassamento del pH, questo permette di ipotizzare la presenza di composti acidi (come acidi organici e acidi grassi) all’interno della matrice lignocellulosica del BSG come è effettivamente riportato in letteratura (Castro e Colpini, 2021). Dopo la misurazione del pH si è passati alla titolazione (in triplicato) di 10 mL di fase liquida (diluita 1:10) ottenuta dal campione contenente BSG (20g) e acqua mediante l’utilizzo di NaOH 0,1M come agente titolante e fenolftaleina come indicatore; i mL di soda utilizzati per titolare i campioni e i g_{eq} di acido acetico/mL (di soluzione titolata) corrispondenti calcolati sono riportati in tabella 3.5:

Tabella 3.5 Risultati delle titolazioni

	mL di NaOH 0,1M	g _{eq} di CH ₃ COOH/mL
1^a titolazione	0,80	0,048
2^a titolazione	0,70	0,042
3^a titolazione	0,70	0,042

Da questi dati sono stati calcolati dei valori medi pari a quelli riportati in tabella 3.6:

Tabella 3.6 valori medi di mL di NaOH 0,1M e g_{eq} di acido acetico per il BSG

mL di NaOH 0,1M	g _{eq} di CH ₃ COOH/mL
$0,77 \pm 0,058$	$0,044 \pm 0,002$

Questa analisi conferma la presenza, seppur contenuta, di acidi organici all'interno del BSG.

3.2 Caratterizzazione microbiologica del BSG

3.2.1 Incubazione di BSG tal quale su MEA

L'incubazione a temperatura ambiente di BSG (tal quale e tritato) su piastre con terreno agar-malto ha portato alla formazione di colonie di organismi unicellulari; abbiamo ragione di pensare, anche dopo analisi al microscopio, che si tratti soprattutto di colonie batteriche e in misura molto minore di lieviti. Non abbiamo osservato in nessun caso la presenza e la crescita di funghi filamentosi. In seguito, vengono riportate le foto delle piastre A (contenente BSG tal quale), B e C (contenenti BSG tritato in mulino per 1 minuto) dopo 72h, 144h e 240h di incubazione (fig. 3.1).

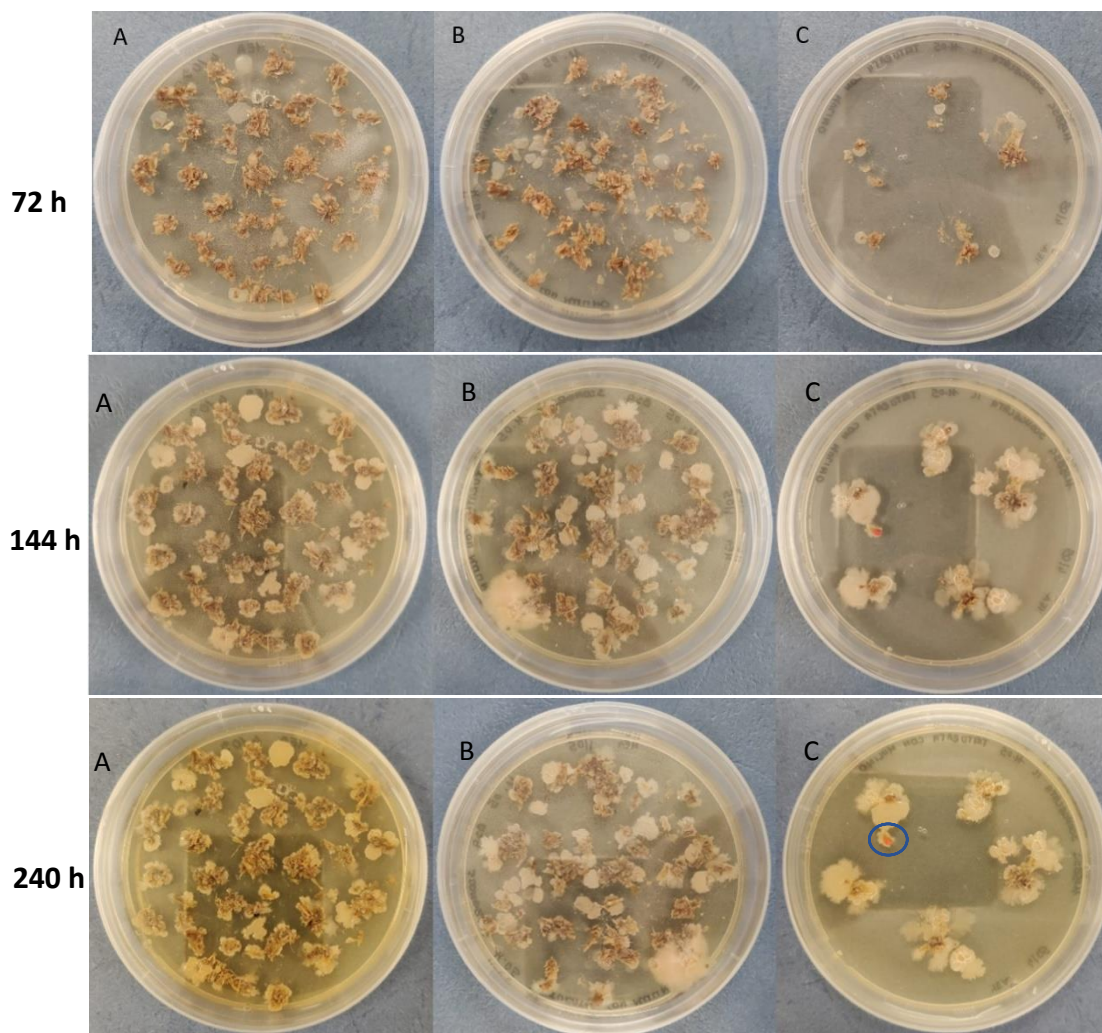


Figura 3.1 Aspetto delle piastre A, B e C dopo 72h ,144h e 240h

Dall'analisi delle immagini riportate possiamo osservare che in tutte e tre le piastre c'è stato lo sviluppo di colonie batteriche dopo 72h che sono poi leggermente cresciute nei giorni seguenti. Nel solo caso della piastra C, si riporta la presenza di quella che è molto probabilmente una colonia di lieviti (il particolare cerchiato in blu nell'ultima sequenza di foto).

3.2.2 Metodo delle diluizioni successive e inoculo per inclusione

Metodo delle diluizioni successive

La dispersione su piastra del surnatante ottenuto dall'estrazione di BSG con il buffer fosfato ha mostrato, anche in questo caso, la formazione e la crescita di colonie di microrganismi unicellulari, in prevalenza batteri. Esse sono cresciute soltanto nelle piastre contenenti il surnatante tal quale, mentre in tutte quelle contenenti surnatante diluito con il buffer (in rapporto 1:10 e 1:100) non abbiamo osservato nessuna colonizzazione microbica (fig. 3.2)

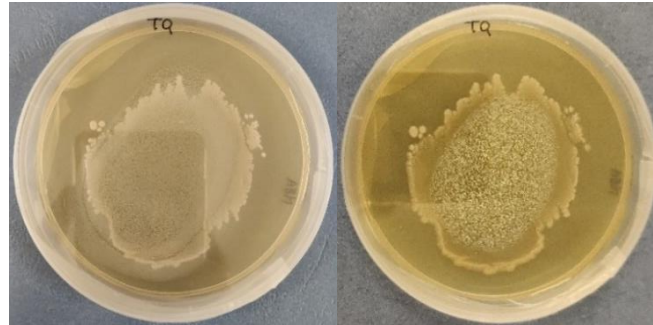


Figura 3.2 foto di una piastra contenente surnatante tal quale dopo 72h (a sinistra) e dopo 168h (a destra)

Le colonie microbiche si sono nuovamente sviluppate in 72h per poi crescere leggermente (questa volta in maniera meno apprezzabile rispetto alla prova precedente) nei giorni successivi.

Inoculo per inclusione

Come per le prove riportate in precedenza, anche in questa parte di caratterizzazione microbiologica abbiamo osservato la formazione di colonie di microrganismi unicellulari, soprattutto batteri, sia nelle piastre contenenti 0,1g di BSG (indicate con la lettera A) sia in quelle con 0,2g di BSG (indicate con la lettera B) (fig. 3.3).

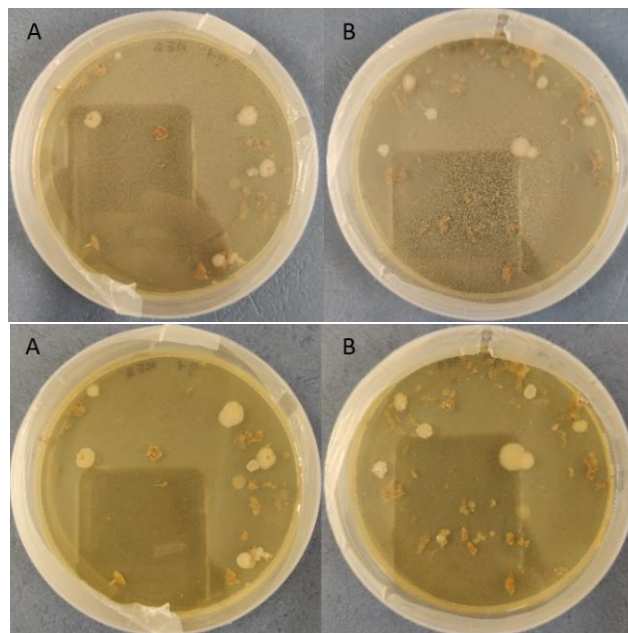


Figura 3.3 Foto delle piastre a 72h (in alto) e a 168h (in basso)

Il monitoraggio delle piastre ha evidenziato di nuovo la formazione contenuta di colonie microbiche dopo 72h dall'inizio dell'incubazione in termostato. Le stesse hanno poi aumentato leggermente le proprie dimensioni nei restanti giorni di svolgimento della prova.

3.2.3 Analisi respirometrica

Dai dati ottenuti dalle titolazioni dell'NaOH 1M contenuto nei becher all'interno dei microcosmi sono stati calcolati i mg di CO₂ prodotti dalla microflora presente sul BSG. I valori riportati in tabella 3.7 sono valori medi calcolati rispetto ai dati ottenuti dai due microcosmi biotici allestiti in parallelo per la prova respirometrica, fatta eccezione per l'ultimo dato (corrispondente al giorno 12) che è ottenuto solo dalla titolazione del microcosmo numero 2 poiché il numero 1 è risultato contaminato. In figura 3.4 sono state rappresentate invece le curve cumulative dei quantitativi totali di CO₂ prodotti nei due sistemi che mostrano un comportamento simile nel tempo per entrambi i microcosmi.

Tabella 3.7 mg di CO₂ prodotti nei microcosmi

Giorno	mg di CO ₂
1	404,25 ± 28,93
2	426,80 ± 1,80
5	683,65 ± 102,93
6	343,20 ± 12,45
7	303,60 ± 49,78
8	277,20 ± 34,22
9	269,50 ± 42,00
12	422,40

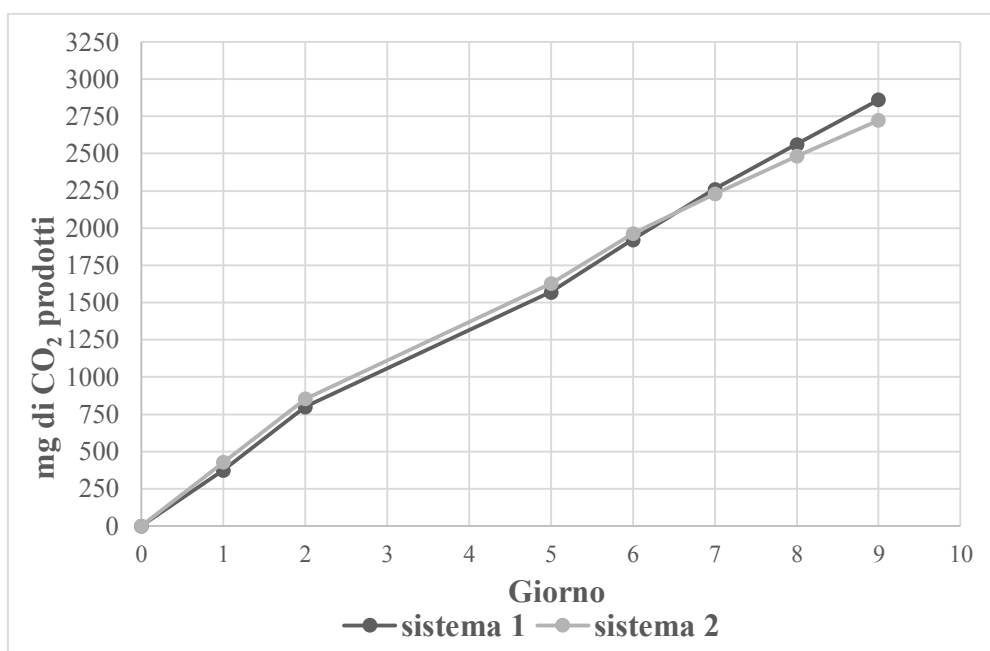


Figura 3.4 curve cumulative della CO₂ prodotta globalmente nei due sistemi

Per facilitare la comprensione dei dati riportati in tabella bisogna evidenziare che i valori corrispondenti ai giorni 5 e 12 rappresentano i milligrammi di anidride carbonica prodotti durante il fine settimana, sono quindi il risultato di tutta la CO₂ diffusa dalla matrice nei giorni compresi tra le due misurazioni riportate. Dato che la quantità di CO₂ prodotta durante la prova è direttamente correlabile alla presenza di colonie microbiche, con i valori che abbiamo ottenuto dai calcoli possiamo confermare ulteriormente la presenza di microrganismi all'interno del BSG. Alla fine delle analisi effettuate durante la caratterizzazione microbiologica possiamo affermare inoltre che la conservazione immediata in congelatore a -20°C del BSG dopo la sua uscita dall'impianto di filtrazione si è dimostrata un metodo valido per limitare la contaminazione microbica del prodotto e il suo deterioramento in seguito alla proliferazione di microrganismi.

3.3 Solid state fermentation del BSG con *Rhizopus oligosporus*

3.3.1 Prove di fermentazione in sacchetti di LDPE

Fermentazioni a temperatura ambiente

Nelle prove di fermentazione a temperatura ambiente abbiamo ottenuto dei prodotti finali soddisfacenti per sviluppo macroscopico del micelio solo nel caso della prima fermentazione eseguita a fine agosto. In quelle che abbiamo allestito successivamente (nella seconda metà di settembre) abbiamo sempre riscontrato problemi nella crescita del micelio che è apparsa disomogenea e a tratti inesistente (fig. 3.5). La motivazione è probabilmente data dalla netta differenza di temperature medie giornaliere presenti durante le fermentazioni: 20-24°C ad agosto e 17-20°C a settembre. L'abbassamento delle temperature deve aver influito negativamente sullo sviluppo del micelio di *Rhizopus oligosporus*, essendo questo un fungo utilizzato originariamente in Indonesia e adattato a crescere quindi a temperature maggiori.

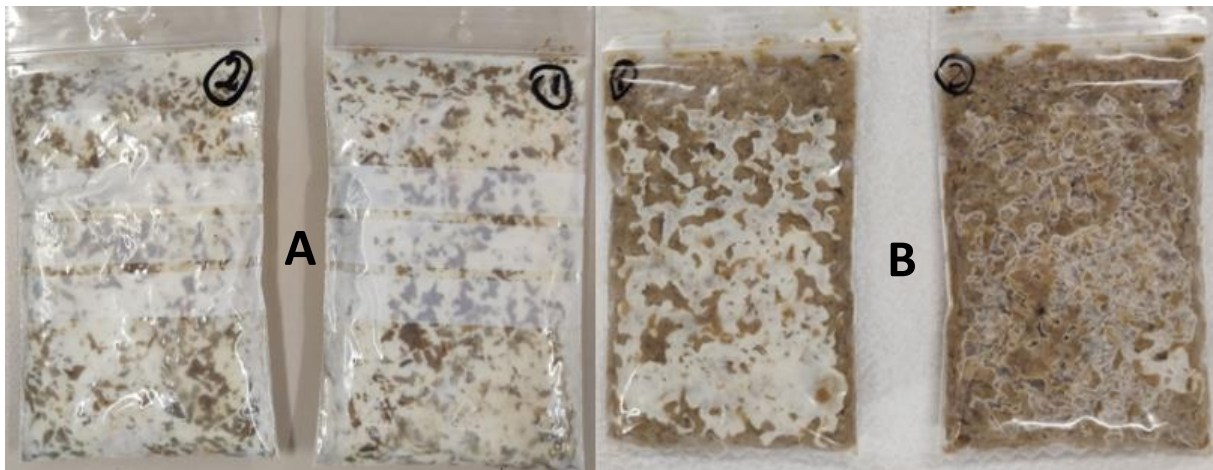


Figura 3.5 Differenza di sviluppo macroscopico finale del micelio nella fermentazione eseguita a fine agosto (caso A) e a fine settembre (caso B).

Nonostante i parametri e l'allestimento delle prove fossero identici, il risultato delle fermentazioni si è rivelato profondamente diverso nei due casi in analisi; si può quindi concludere che la temperatura giochi un ruolo fondamentale nello sviluppo del micelio e nella stabilizzazione della matrice: nel caso A i prodotti si sono presentati compatti, facilmente maneggevoli e dalla consistenza quasi gommosa, con un micelio omogeneamente distribuito in

superficie e sviluppato anche negli strati sottostanti in cui agiva da collante tra di essi (fig. 3.6), nel caso B invece, entrambi i sistemi riportati in foto, nonostante avessero uno sviluppo superficiale del micelio diverso tra di loro, non erano caratterizzati dalle stesse proprietà meccaniche appartenenti ai prodotti del caso A, la matrice non risultava stabilizzata dal micelio del fungo che è cresciuto giusto sulla superficie e non all'interno della matrice.

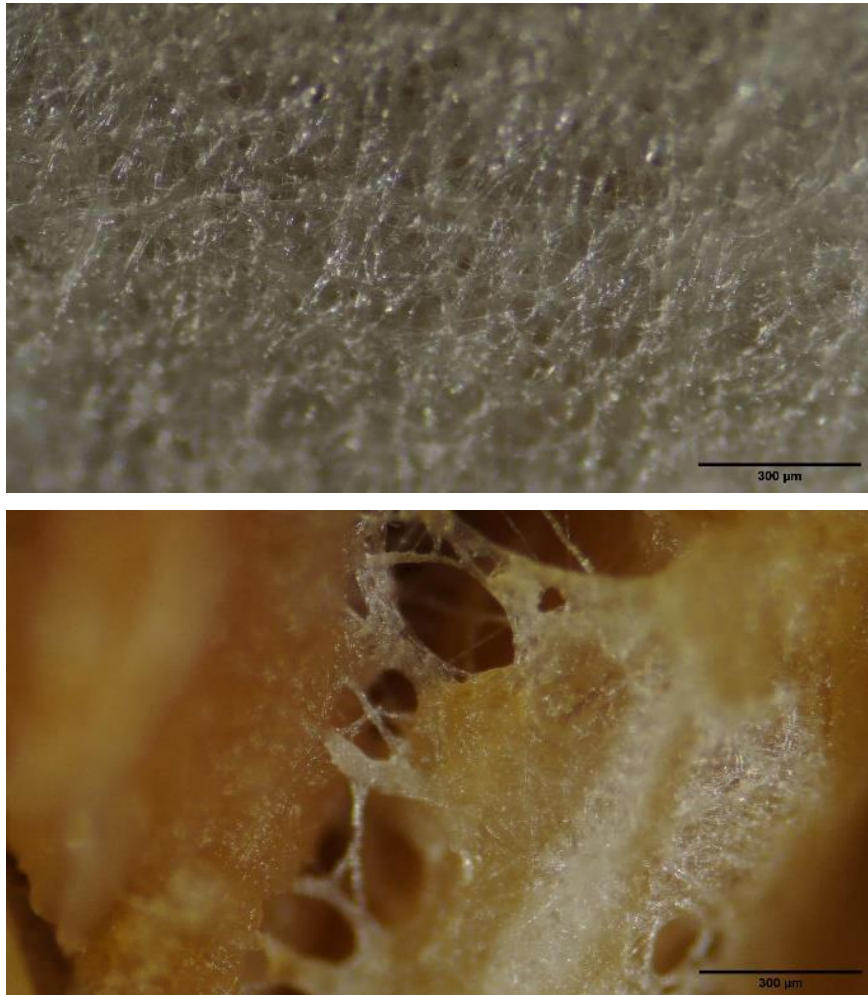


Figura 3.6 Foto al microscopio (ingrandimento 4x) di due zone del sistema 1 del caso A: micelio superficiale (in alto) e strati interni (in basso).

È però importante riportare che anche nel caso A, dove abbiamo avuto la crescita migliore del micelio, c'è stata una grande differenza nel suo sviluppo tra le due facce del sacchetto: maggiore sulla faccia esposta per prima all'aria (quella superiore ad inizio fermentazione) e minore sulla faccia esposta all'aria in un secondo momento dopo aver ribaltato il sacchetto (quella inferiore su cui è stato appoggiato il *batch* ad inizio fermentazione).

Monitoraggio gravimetrico dei sistemi

Per quanto riguarda la fermentazione "A", abbiamo anche monitorato giornalmente il peso dei due sistemi nel corso della prova e i dati ottenuti sono stati graficati e riportati in figura 3.7. Oltre all'andamento dei pesi è stata anche rappresentata la velocità di perdita di peso (espressa in g/h) in entrambi i batch facendo semplicemente la derivata del grafico principale.

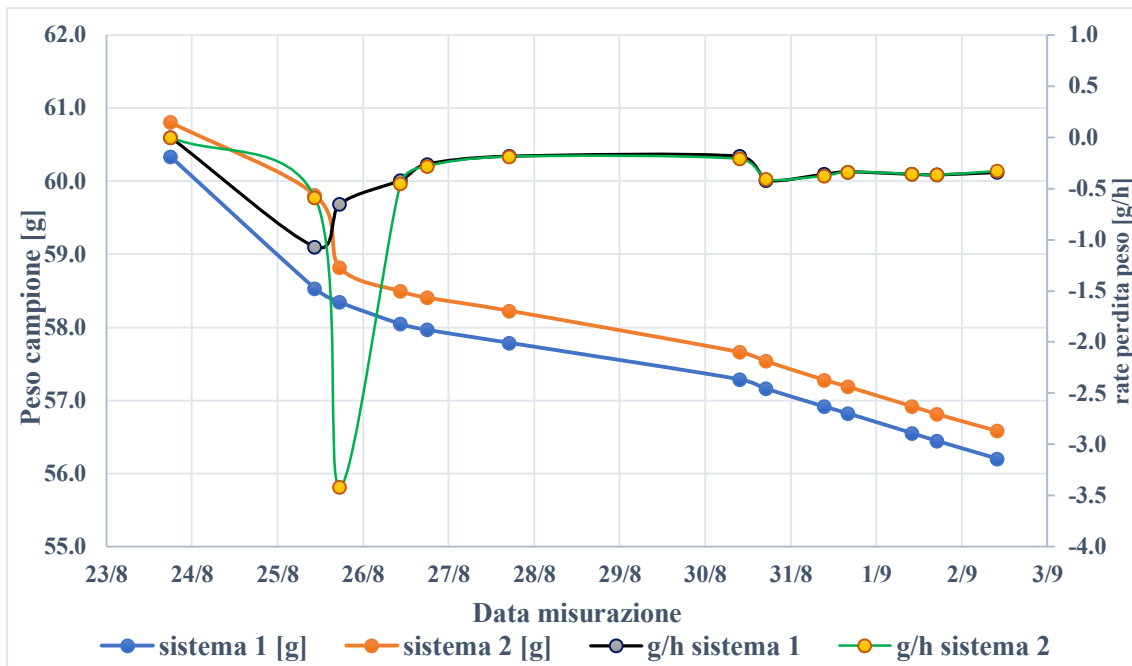


Figura 3.7 Andamento dei pesi e della velocità di perdita di peso nei due sistemi

Si può notare come gli andamenti dei grafici corrispondenti ad entrambi i batch siano essenzialmente identici fatta eccezione per il tratto corrispondente alle prime 48h dall'inizio della fermentazione, dove nel sistema 2 la perdita di peso è stata più lenta. Probabilmente la *lag phase*, ovvero l'adattamento del fungo a questo sistema, è stata leggermente più lunga rispetto a quella del sistema numero 1.

Valutazione del contenuto di umidità dei sistemi

Dopo passaggio in stufa dei 3 campioni (α , β , γ) asportati dal sistema 1, abbiamo valutato attraverso il metodo gravimetrico una percentuale media del contenuto di umidità del tempeh ottenuto dopo una fermentazione di 240h a temperatura ambiente. L'utilizzo di campioni di massa identica ma ottenuti da tre zone differenti del sistema è stato fatto per evitare di fare valutazioni errate del contenuto di umidità data la grande eterogeneità della matrice in esame. I valori ottenuti da questa analisi sono riportati nella tabella 3.8 e nel grafico (figura 3.8) sottostante, mentre in tabella 3.9 è stato riportato il confronto dei contenuti di umidità e di sostanza secca tra BSG tal quale e i valori medi calcolati al tempo zero (post inoculo) e a fine fermentazione per l'intero sistema.

Tabella 3.8 percentuale di umidità nei tre campioni

Campione	%umidità (v/v)
parte superiore (α)	79,24 \pm 0,90%
parte intermedia (β)	82,25 \pm 0,81%
parte inferiore (γ)	78,71 \pm 0,76%

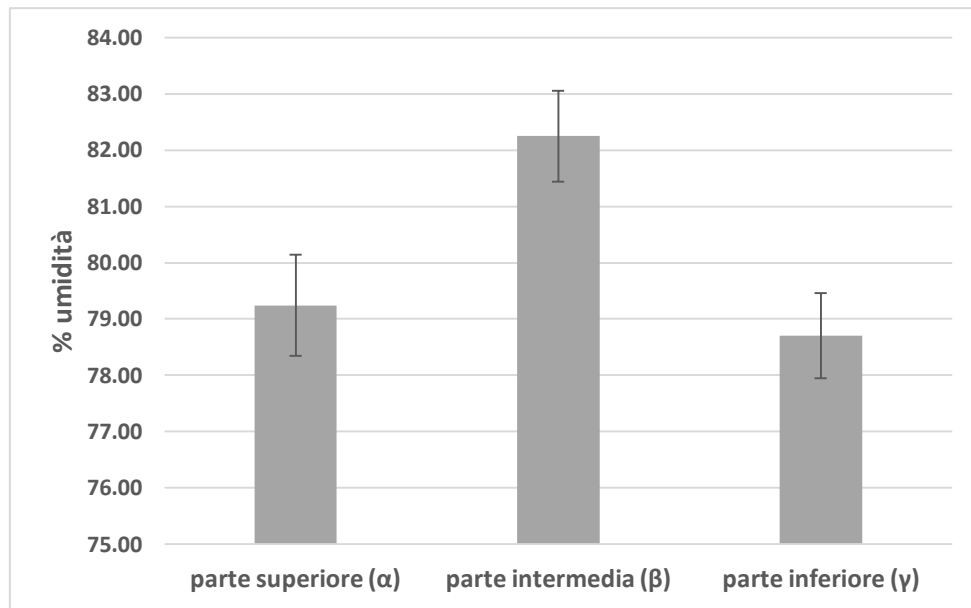


Figura 3.8 rappresentazione grafica delle diverse percentuali di umidità nei campioni

Si può quindi affermare facilmente che la porzione più umida è quella centrale rispetto a quelle provenienti dalle zone più periferiche; probabilmente questo risultato è dato dal fatto che al centro del sistema si trova più substrato rispetto alle estremità per via della forma del sacchetto in cui avviene la fermentazione.

Tabella 3.9 Valori medi del contenuto di umidità e sostanza secca nei tre casi riportati

	BSG tal quale	fermentazione t=0	fermentazione t= 240h
% umidità (v/v)	72,08±1,08%	79,54±1,08%	80,06±1,80%
% sostanza secca (m/v)	28,02±1,08%	20,46±1,08%	19,94±1,80%

La fermentazione del BSG con *Rhizopus oligosporus* porta quindi ad una generale perdita di peso come è stato riportato nel grafico iniziale, ma la percentuale di umidità contenuta nel sistema rispetto al volume totale aumenta leggermente.

Fermentazione termostata

Dati i problemi di crescita del micelio dovuti alla diminuzione delle temperature citati in precedenza, abbiamo deciso di condurre delle fermentazioni termostate per valutare il contributo dato dalla temperatura all'ottenimento del prodotto finale. In questo caso non abbiamo monitorato il peso dei sistemi durante la fermentazione per evitare un'eccessiva manipolazione degli stessi che avrebbe potuto portare sia a contaminazioni sia a vanificare la termostatazione. Siamo riusciti ad ottenere un prodotto macroscopicamente comparabile al caso A della fermentazione a temperatura ambiente in soli 5 giorni (rispetto ai 10 necessari in precedenza) utilizzando inoltre una sospensione di inoculo diluita 1:1 e inoculandone un volume dimezzato rispetto a quanto fatto in precedenza. Anche in questo caso, come è successo nelle scorse prove, il micelio si è sviluppato in modo diverso tra la faccia superiore e quella inferiore. Possiamo quindi affermare che il fatto di poter ribaltare il sacchetto e bucare la faccia

inferiore solo dopo alcuni giorni dall'inizio della fermentazione porti ad uno squilibrio nello sviluppo del micelio che sarà migliore per la faccia superiore e peggiore per quella inferiore.

3.3.2 Ottimizzazione della fermentazione in sacchetti di LDPE

Per eliminare questa disomogeneità nello sviluppo del micelio tra le due facce, abbiamo deciso di effettuare l'ottimizzazione della fermentazione allestendo i sacchetti in verticale (appoggiandoli sul lato lungo) in modo da poter garantire condizioni più simili ad entrambe le facce del sacchetto per tutta la durata delle prove di fermentazione. La scelta dei parametri migliori per effettuare le fermentazioni ed ottenere dei prodotti finali simili al tempèh tradizionale è stata fatta dopo la fine di ogni prova basandoci solamente su una analisi visiva dello sviluppo macroscopico del micelio nei sistemi allestiti. Ogni set di parametri è stato testato in triplicato durante le prove, quindi l'analisi visiva è stata ritenuta sufficiente per individuare quali fossero le condizioni capaci di garantire la stabilizzazione del substrato e lo sviluppo di un micelio omogeneo. Come è stato già detto nel capitolo 2.3.2, oltre a variare il range di temperatura, la massa di substrato e il volume di inoculazione, è stato variato anche il *pattern* di fori applicato ai sacchetti. Questo è stato fatto per poter cambiare il rapporto tra area forata e area totale del sacchetto e poter così, in un certo senso, manipolare l'apporto di ossigeno ai vari sistemi. Il fungo *Rhizopus oligosporus* è un organismo aerobio quindi variare l'apporto di ossigeno può migliorare o peggiorare di molto la sua crescita. In tabella 3.9 sono riportati i valori ottenuti dall'*image analysis* delle foto fatte al microscopio dei fori applicati ai sacchetti.

Tabella 3.9 Risultati dell'*image analysis* dei pattern di fori

Parametri	Tipologia A	Tipologia B	Tipologia C
n° di fori totali	20	32	40
Area totale forata (media) [mm ²]	15,70	25,12	31,40
Area del sacchetto [mm ²]	$1,92 \times 10^4$	$1,92 \times 10^4$	$1,92 \times 10^4$
Area forata/area sacchetto	0,0818%	0,131%	0,163%
Area forata/volume sacchetto [mm ² /mm ³]	0,00897%	0,0143%	0,0179%

Prima prova

La prima prova ci ha permesso di capire che a parità di temperatura di incubazione, massa di substrato e volume di inoculazione, il *pattern* B si è rivelato globalmente migliore del *pattern* A in tutte le prove effettuate, si può vedere un esempio nella figura 3.9.

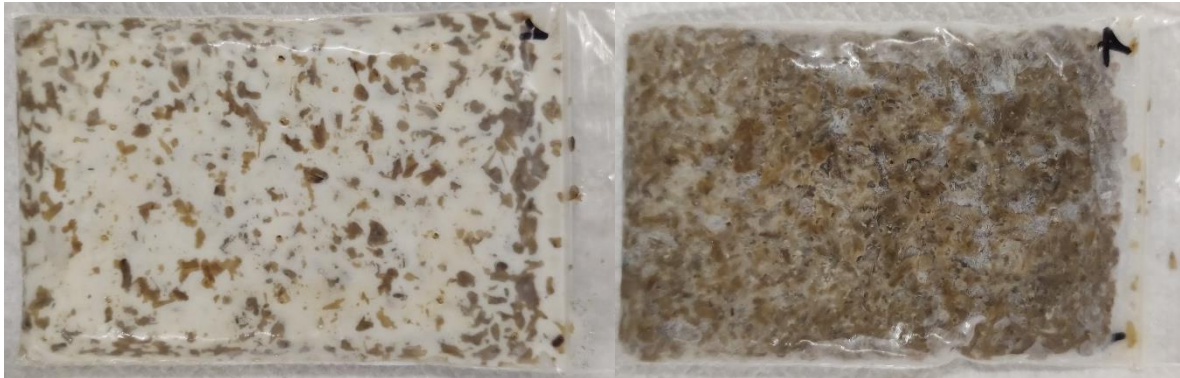


Figura 3.9 confronto tra un sistema a cui è stato applicato il *pattern* B (a sinistra) rispetto ad uno a cui è stato applicato il *pattern* A (a destra)

Il *pattern* A è stato quindi scartato per le prove successive.

Seconda prova

La seconda prova ha mostrato che inserire meno substrato, a parità di temperatura di incubazione e *pattern* di fori applicato, velocizza la crescita del micelio e ne favorisce uno sviluppo più omogeneo, ma utilizzare più substrato ha permesso di evitare l'impiego delle reti di plastica per mantenere la forma dei sacchetti (fig 3.10). In sintesi, aumentare il substrato ha leggermente rallentato lo sviluppo del micelio, ma ha evitato il montaggio delle reti, che allungava parecchio il tempo di allestimento delle prove e che rappresentava comunque un processo macchinoso e una possibile fonte di contaminazione dei sistemi data dalla prolungata manipolazione dei sacchetti già forati.

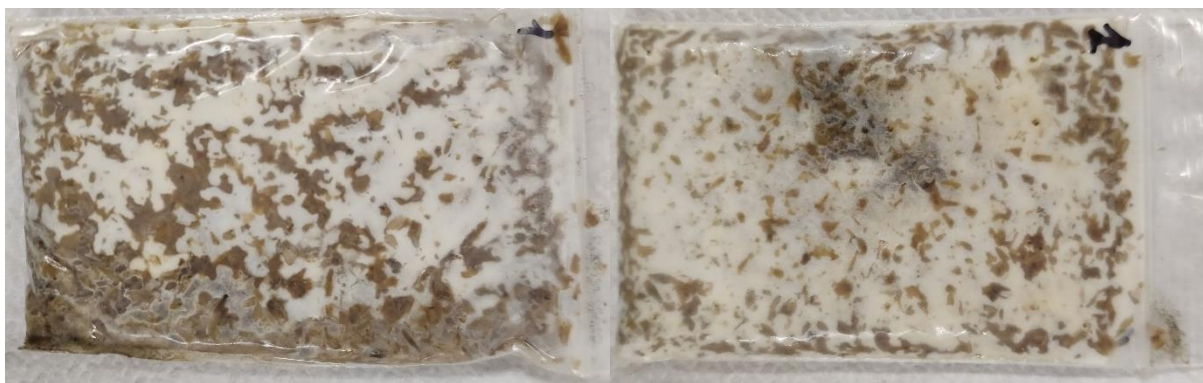


Figura 3.10 confronto tra un sistema avente 70g di substrato (a sinistra) e uno avente 50g di substrato (a destra)

La scelta sul parametro migliore è quindi ricaduta sull'utilizzo di una massa di substrato pari a 70 grammi poiché semplificava di molto l'allestimento della prova di fermentazione restituendo comunque un prodotto finale non troppo diverso da quello ottenuto con massa di substrato inferiore.

Terza prova

Nella terza prova è stato indagato nuovamente l'effetto del pattern di fori a parità delle altre condizioni di fermentazione. Sono stati utilizzati il pattern B e il pattern C (figura 3.11)

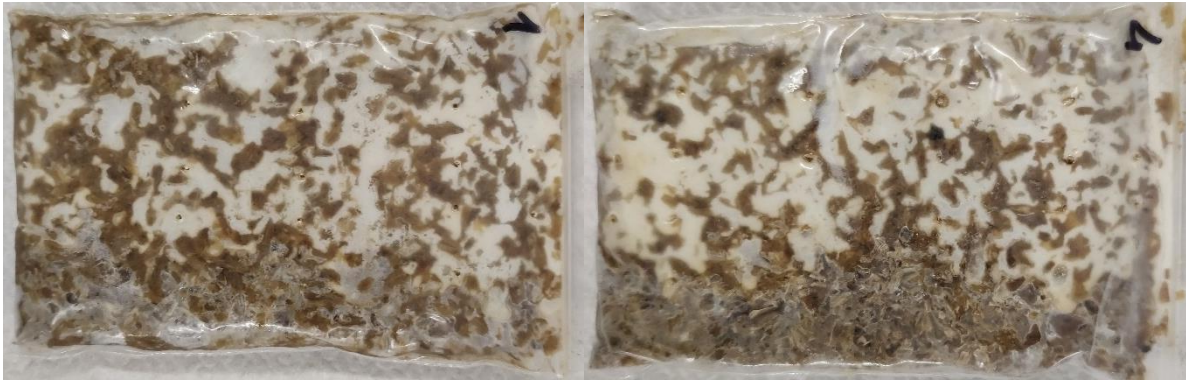


Figura 3.11 confronto tra un sistema a cui è stato applicato il *pattern B* (a sinistra) rispetto ad uno a cui è stato applicato il *pattern C* (a destra)

Analizzando i vari tempeh ottenuti, quelli su cui è stato applicato il *pattern B* si sono rivelati leggermente migliori come si vede anche dall'esempio in figura. Questa minima differenza può essere stata data più che altro dal fatto che nei sistemi con più buchi c'è stato un maggiore percolamento durante la fermentazione della sospensione inoculata. Abbiamo quindi deciso di mantenere il *pattern B* per le successive fermentazioni.

Quarta prova

Il parametro variato in questa prova è stato il rapporto tra volume inoculato e massa di substrato. Aumentare il rapporto dal 10 al 15% (v/m) ha peggiorato molto l'esito della fermentazione in tutti i sistemi in cui è stato testato (figura 3.12).

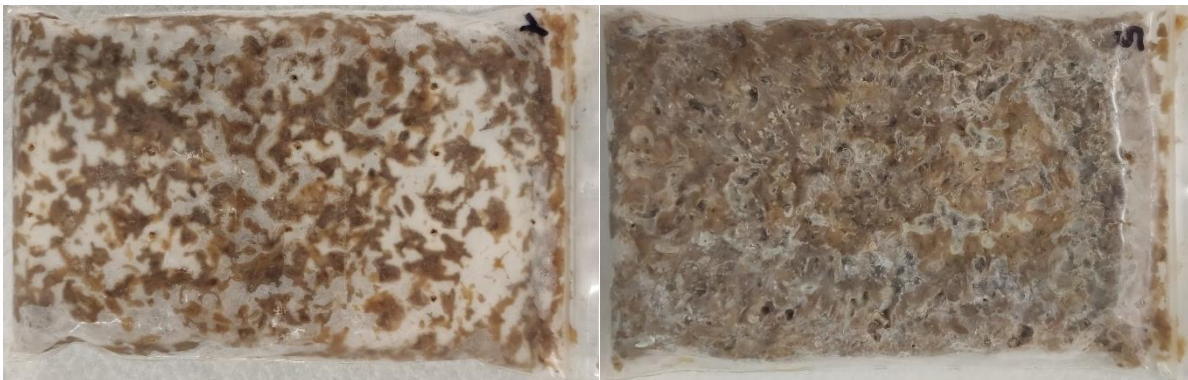


Figura 3.12 confronto tra un sistema con inoculazione al 10% (v/m) (a sinistra) rispetto ad uno con inoculazione al 15% (v/m) (a destra)

Nei sistemi con inoculazione al 15% il micelio si è sviluppato ma non ha mai assunto la tipica colorazione bianca e non è stato in grado di stabilizzare in maniera accettabile la matrice.

Quinta prova

Nell'ultima prova è stato variato il range di temperature in cui sono state condotte le fermentazioni, mantenendo comunque i due diversi rapporti tra volume inoculato e massa di substrato. In entrambi i casi aumentare la temperatura non ha portato miglioramenti nell'esito della fermentazione, ha anzi peggiorato molto il prodotto finale dei sistemi con inoculazione al

10% (v/m) e lasciato quasi invariato quello dei sistemi con inoculazione al 15% (v/m) rispetto a quanto ottenuto nella quarta prova (fig. 3.13)



Figura 3.13 confronto tra un sistema con inoculazione al 10% (v/m) (a sinistra) rispetto ad uno con inoculazione al 15% (v/m) (a destra) incubati in un range di temperatura tra 33 e 35°C

Alla fine delle prove abbiamo quindi trovato che i parametri migliori tra quelli testati per ottenere un micelio omogeneamente sviluppato e una stabilizzazione della matrice sono stati:

- Massa di substrato: 70 g di BSG
- Pattern di fori: Pattern B (area forata/area sacchetto = 0,13%)
- Inoculo: 10% v/m
- Range di temperatura: 30-32°C

3.3.3 Caratterizzazione dei prodotti di fermentazione

I prodotti delle varie fermentazioni sono stati conservati in congelatore a -20°C e analizzati tutti insieme in un secondo momento. La caratterizzazione dei sistemi fermentati è servita per valutare gli effetti della fermentazione del BSG con *Rhizopus oligosporus* mettendo in relazione i dati ottenuti con quelli del BSG non fermentato. Nella tabella 3.10 sono stati riportati:

- i campioni analizzati durante questa caratterizzazione;
- il numero di prova fermentativa a cui appartengono;
- i parametri utilizzati durante la prova di fermentazione in cui sono stati prodotti (temperatura, massa di substrato, tipo di pattern e %v/m di inoculazione);
- un'indicazione sulla qualità della crescita macroscopica del micelio di *Rhizopus oligosporus* in quello specifico campione

Questi dati sono stati riportati per poter contestualizzare e spiegare meglio i risultati ottenuti e permetterne una comprensione più chiara al lettore dando la possibilità di reperire velocemente i parametri che contraddistinguono un determinato campione analizzato. Nelle figure dalla 3.14 alla 3.17 (in Appendice) si riportano le foto esemplificative delle differenti crescite del micelio ottenute, per fornire una prova visiva del parametro di qualità di crescita del micelio riportato in tabella.

Nella trattazione che segue, per comodità, ci rifaremo ad un particolare batch indicandolo con:

- numero romano indicante il numero della prova a cui appartiene

- numero del sistema considerato all'interno della prova di fermentazione (preceduto dalla lettera "B" di batch) in cui è stato ottenuto

Per esempio "IV.B5" indicherà il batch numero 5 ottenuto nella quarta prova di fermentazione dell'ottimizzazione. Questo è fatto nuovamente per facilitare la comprensione e la ricerca dei parametri corrispondenti al campione in analisi durante la lettura senza dover riportare il tutto ogni volta, snellendo così le descrizioni.

Tabella 3.10 indicazioni generali sui campioni analizzati

Numero del batch	Prova in cui è stato ottenuto	Parametri fermentativi	Qualità della crescita del micelio*
B1	I	30-32°C, 50g BSG, pattern B, 10% v/m	+++
B4	I	30-32°C, 50g BSG, pattern A, 10% v/m	+
B1	II	30-32°C, 70g BSG, pattern B, 10% v/m	+++
B4	III	30-32°C, 70g BSG, pattern C, 10% v/m	++
B3	II	30-32°C, 70g BSG, pattern B, 10% v/m	+
B5	III	30-32°C, 70g BSG, pattern C, 10% v/m	++
B5	IV	30-32°C, 70g BSG, pattern B, 15% v/m	++
B2	V	33-35°C, 70g BSG, pattern B, 15% v/m	-
B4	V	33-35°C, 70g BSG, pattern B, 15% v/m	++

*si riporta la legenda:

- "-": il micelio è quasi totalmente assente, nessuna stabilizzazione della matrice, presenza di acqua libera nel sistema
- "+": il micelio si è sviluppato solo in alcuni punti in maniera disomogenea, leggera stabilizzazione della matrice, leggera presenza di acqua libera nel sistema
- "++": il micelio è sviluppato in maniera abbastanza omogenea ma non ha assunto il tipico colore bianco rimanendo prevalentemente traslucido, leggera stabilizzazione della matrice, assenza quasi totale di acqua libera
- "+++": il micelio è bianco ed è sviluppato in maniera omogenea, completa stabilizzazione della matrice, assenza di acqua libera

Valutazione del contenuto di umidità e di ceneri

In tabella 3.11 si riportano i dati riferiti alla variazione di peso dei sistemi tra inizio e fine fermentazione con le relative percentuali di umidità. I valori presenti nella tabella 3.11 sono stati utilizzati per fare un calcolo di bilancio sul contenuto di acqua all'interno dei sistemi

valutandone così la differenza tra l'inizio e la fine della fermentazione e i risultati sono stati rappresentati in figura 3.15. Il bilancio è stato fatto per valutare se ci possa essere una correlazione tra la perdita di acqua da parte di un sistema e lo sviluppo del micelio nello stesso, dato che abbiamo riscontrato che tendenzialmente i campioni nei quali la crescita è stata insoddisfacente presentavano il più alto quantitativo di acqua libera all'interno dei sacchetti a fine prova.

Tabella 3.11 dati sul contenuto di umidità e di ceneri dei campioni

campione	Peso batch t=0 [g]	% umidità nel sistema a t=0	Peso batch fine fermentazione [g]	% umidità nel sistema a fine fermentazione	% ceneri nel campione
I.B1	55,80	78,34±0,73%	49,06	81,37±0,28%	4,52±0,078%
I.B4	56,61	78,34±0,73%	48,93	80,07±1,65%	4,27±0,14%
II.B1	79,46	78,34±0,73%	71,84	81,00±0,78%	4,44±0,32%
III.B4	78,41	78,34±0,73%	71,41	82,43±0,28%	4,48±0,35%
II.B3	78,81	78,34±0,73%	70,38	80,90±1,52%	4,18±0,33%
III.B5	78,49	78,34±0,73%	67,67	81,72±0,56%	4,73±0,18%
V.B2	79,34	78,34±0,73%	60,11	80,30±2,73%	3,35±0,27%
V.B4	82,35	82,89±0,73%	75,40	81,35±0,37%	4,18±0,22%

Da un'analisi dei dati in tabella possiamo comunque riscontrare che la percentuale di umidità tende ad aumentare leggermente a fine fermentazione e che l'incertezza sul suo valore aumenta nei sistemi dove la crescita è stata minore (I.B4, II.B3, V.B2), questo è dato probabilmente dalla loro composizione più eterogenea e dalla presenza di acqua libera. Per il contenuto di ceneri rispetto alla sostanza secca invece, possiamo dire che esso rimane praticamente costante fatta eccezione per il campione V.B2 dove la crescita di micelio era praticamente assente.

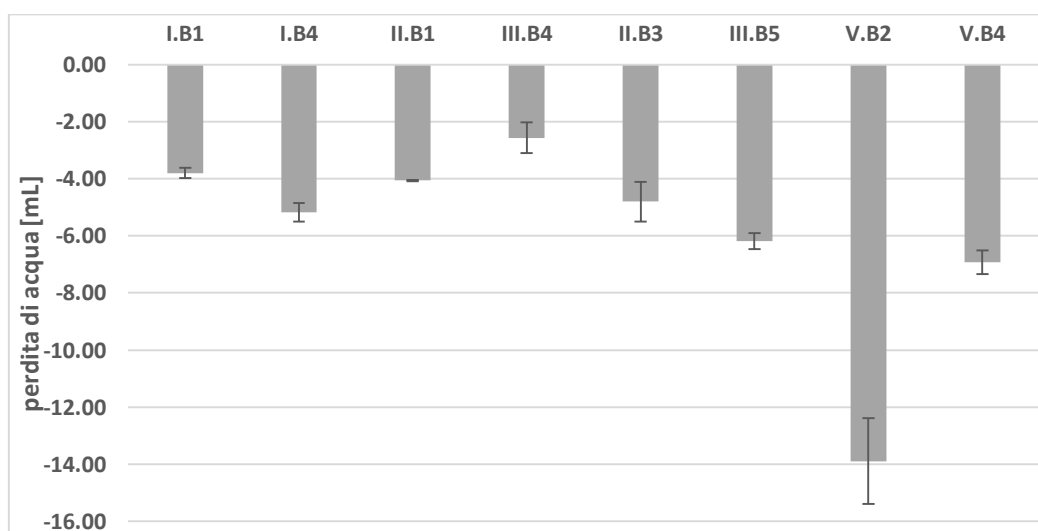


Figura 3.15 grafico rappresentante la perdita di acqua all'interno dei sistemi

Analizzando questo grafico possiamo ribadire che i sistemi che presentano una perdita di acqua maggiore sono quelli che hanno poi presentato una crescita inferiore del micelio del fungo a livello macroscopico rispetto agli altri.

Valutazione degli zuccheri disciolti (°Brix)

Dopo la centrifugazione degli omogeneizzati ottenuti mediante l'utilizzo del frullatore "IKA RW 20", la prima analisi eseguita è stata la valutazione del cambiamento del contenuto di zuccheri disciolti tra il BSG tal quale (pari a 2°Brix) e il campione fermentato (tabella 3.12).

Tabella 3.12 °Brix dei campioni

campione	°Brix
I.B1	1,10 ± 0,10
I.B4	0,95 ± 0,10
II.B1	1,00 ± 0,10
III.B4	0,90 ± 0,10
II.B3	1,15 ± 0,10
III.B5	1,25 ± 0,10
IV.B5	1,15 ± 0,10
V.B2	1,55 ± 0,10
V.B4	1,25 ± 0,10

I dati riportati suggeriscono che, nella maggioranza dei casi analizzati, dove c'è stata una maggior crescita del micelio di *Rhizopus oligosporus* il contenuto di zuccheri espresso in °Brix si è dimezzato, mentre nei campioni dove abbiamo avuto una crescita minore esso è risultato superiore fino a raggiungere un massimo nel campione dove la crescita è stata praticamente assente (V.B2).

Valutazione del pH e dell'acidità titolabile

Anche con l'analisi della variazione di pH e dell'acidità titolabile abbiamo cercato di ottenere dei dati correlabili alla crescita del fungo da rapportare con quelli del BSG tal quale. Per quanto riguarda il pH del BSG esso è pari a 6,10, mentre la sua acidità titolabile è pari a 0,022 g_{eq} di acido acetico. In tabella 3.13 sono stati riportati i pH e i g_{eq} di acido acetico/mL di estratto relativi ai campioni analizzati.

Tabella 3.13 Valori di pH dei relativi campioni

campione	pH batch	Acidità titolabile (g_{eq} di acido acetico/mL di estratto)
I.B1	5,60	0,016 ± 0,002
I.B4	5,30	0,011 ± 0,002
II.B1	5,60	0,017 ± 0,002
III.B4	5,80	0,011 ± 0,002
II.B3	5,60	0,015 ± 0,002
III.B5	5,30	0,035 ± 0,002
IV. B5	5,00	0,022 ± 0,002
V.B2	4,50	0,034 ± 0,002
V.B4	5,90	0,011 ± 0,002

La fermentazione con *Rhizopus oligosporus* del BSG porta, in tutti i casi analizzati, ad una acidificazione della matrice, ciò è dato probabilmente dal fatto che in questa fermentazione si producono acidi organici come l'acido citrico, come riportato da Cooray e Chen (2018). Bisogna comunque sottolineare che le variazioni del pH potrebbero anche essere date da contaminazioni batteriche dei sistemi non avendo condotto le fermentazioni in condizioni di sterilità, questo è probabilmente il caso di V.B2 e IV.B5. La presenza di acidi è stata provata anche tramite il calcolo dell'acidità titolabile a seguito della titolazione dei campioni trovando una situazione abbastanza correlabile a quella del pH.

3.3.4 Valutazione del contenuto di proteine

Dopo aver caratterizzato i prodotti di fermentazione siamo passati ai calcoli per ottenere il contenuto di proteine estratto dai campioni dopo omogeneizzazione e centrifugazione degli stessi. I valori ottenuti sono stati paragonati a quelli del BSG tal quale, sottoposto anch'esso ad omogeneizzazione e centrifugazione, in modo da avere un parametro di confronto e poter valutare così l'incremento del contenuto proteico dovuto alla fermentazione del BSG con *Rhizopus oligosporus*. In tabella 3.14 sono stati riportati i valori di concentrazione di proteine calcolati grazie all'uso della retta di taratura ottenuta dalla miscela di whey protein commerciali (riportata in figura 2.20) in g/L e la relativa conversione in g/kg_{BSG}.

Tabella 3.14 Valori di concentrazione di proteine nei campioni

campione	Concentrazione di proteine [g/L]	Concentrazione di proteine [g/kg_{BSG}]
BSG tq	4,779 ±0,016	9,559±0,0327
I.B1	7,127 ±0,016	17,816±0,041
I.B4	5,286 ±0,0205	13,214±0,051
II.B1	6,767 ±0,0132	17,595±0,034
III.B4	6,252 ±0,0154	15,631±0,038
II.B3	5,870 ±0,004	14,676±0,009
III.B5	7,851 ±0,024	18,841±0,058
IV. B5	7,244 ±0,008	17,385±0,019
V.B2	5,026 ±0,013	12,566±0,033
V.B4	7,487 ±0,026	17,969±0,065

Nella figura 3.16 è stato rappresentato il rapporto tra il contenuto proteico estratto dal BSG tal quale e dai campioni in g/L.

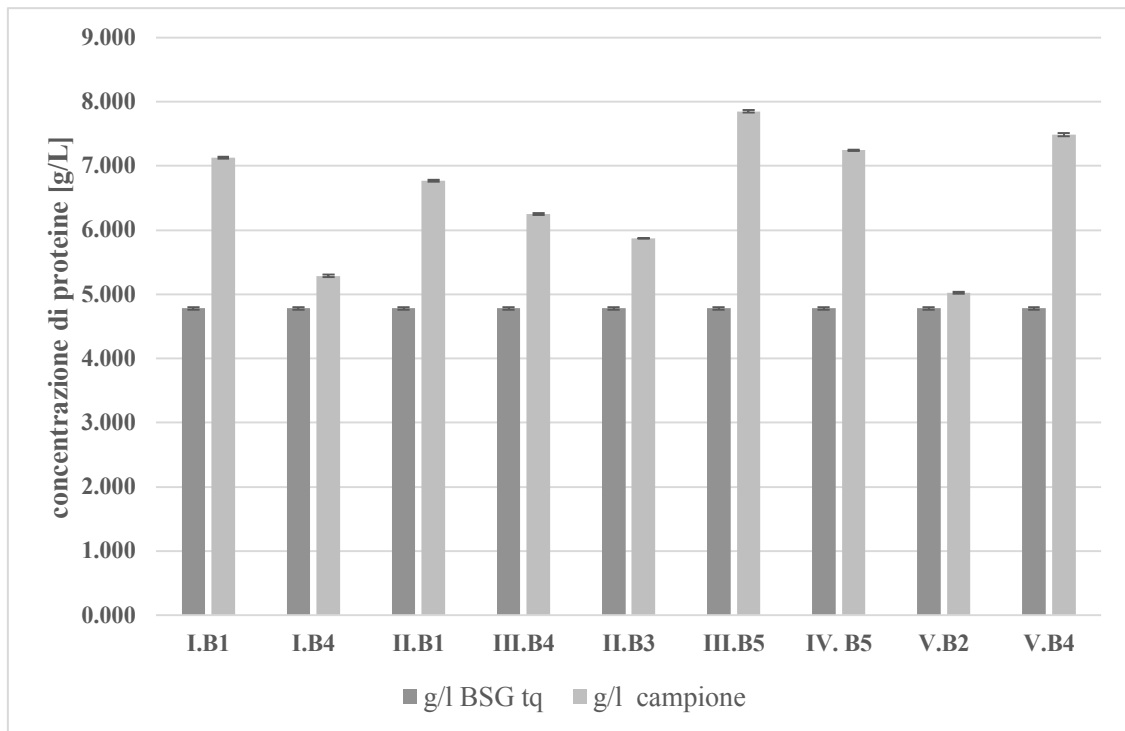


Figura 3.16 comparazione tra la concentrazione in g/L di proteine nel BSG tal quale e nei campioni analizzati

Mentre in figura 3.17 è stato messo in evidenza il rapporto tra le due concentrazioni espresse in g/kg_{BSG} .

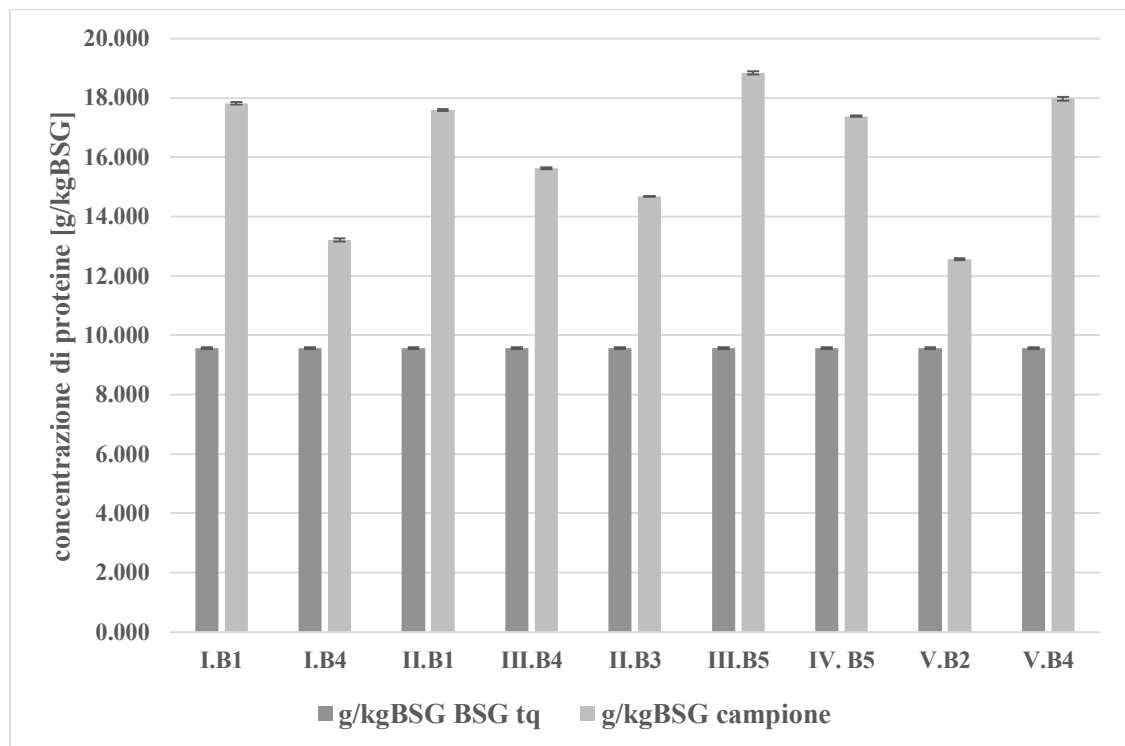


Figura 3.17 comparazione tra la concentrazione in g/kg_{BSG} di proteine nel BSG tal quale e nei campioni analizzati

Analizzando i risultati ottenuti possiamo evincere che in tutti i campioni c'è stata una produzione di proteine dovuta alla fermentazione con *Rhizopus* poiché i valori di concentrazione sono sempre più alti nei campioni rispetto al BSG tal quale. Naturalmente la concentrazione è molto più bassa nei campioni dove c'è stata una crescita macroscopica del fungo inferiore, come in I.B4 e in V.B2, mentre è maggiore negli altri. Il valore maggiore è stato ottenuto per i sistemi III.B5 e V.B4 dove però la crescita del fungo è stata sì maggiore e più uniforme rispetto ai precedenti, ma a livello decisamente inferiore rispetto a I.B1 e II.B1 dove la stabilizzazione della matrice e la formazione del micelio erano risultate le migliori. Una spiegazione per questi risultati può essere trovata nella tecnica estrattiva utilizzata poiché per i sistemi I.B1 e II.B1 l'omogeneizzazione è stata più difficile rispetto ai sistemi con una qualità di crescita del micelio inferiore come III.B5 e V.B4, infatti la matrice risultava più compatta e resistente grazie all'azione stabilizzante del micelio fungino rendendo più difficile l'estrazione. Analizzando il rapporto tra il contenuto proteico del BSG tal quale e quello estratto dai campioni si può osservare che quando andiamo a valutarlo in g/L esso aumenta di circa 1,5 volte mentre quando lo valutiamo in g/kg_{BSG} osserviamo addirittura delle concentrazioni raddoppiate. Questa differenza è data dal fatto che per calcolare la concentrazione in g/kg_{BSG} si effettua la conversione dalla concentrazione in g/L utilizzando il valore del volume di estratto liquido ottenuto dalla centrifugazione dell'omogeneizzato: per i campioni fermentati si è sempre estratto un volume di liquido pari a circa 25 mL (partendo da una sospensione 1:3 di 10g di campione in 30 mL di acqua distillata) mentre per il BSG tal quale se ne sono ricavati solo 20 mL lavorando nelle stesse condizioni. Il prodotto fermentato permette quindi, a parità di peso del campione sottoposto ad estrazione, di ottenere più fase liquida alla fine del processo estrattivo rispetto al BSG tal quale aumentando l'efficacia dell'estrazione stessa.

4. Conclusioni e prospettive future

Il BSG è sicuramente una materia prima versatile grazie alla sua ricca composizione e in futuro la sua valorizzazione potrà ricoprire un ruolo importante all'interno dell'industria biotecnologica. In questa tesi ne abbiamo dimostrato la possibilità di utilizzo come substrato in una fermentazione allo stato solido con *Rhizopus oligosporus* per ottenere un prodotto finale dall'aumentato contenuto proteico simile al tempeh.

Le prime prove di fermentazione sono state condotte a temperatura ambiente tra la fine di agosto e la fine di settembre e ci hanno mostrato che un naturale abbassamento delle temperature di qualche grado, dettato dal solo cambio di stagione, compromette di molto la formazione e lo sviluppo del micelio di *Rhizopus oligosporus*. Abbiamo quindi concluso che, per la crescita di questo fungo filamentoso, una termostatazione è necessaria e vantaggiosa perché oltre a garantire maggiormente l'effettiva formazione del micelio fungino, permette di raggiungere la stessa crescita macroscopica del micelio e la stessa stabilizzazione della matrice ottenute a temperatura ambiente nella metà del tempo, con volume di inoculazione dimezzato e una sospensione di inoculo diluita 1:1 rispetto a quella utilizzata nelle prove precedenti. Inoltre, dopo aver valutato che un allestimento dei sistemi in posizione orizzontale, ovvero poggiati su una delle due facce del sacchetto, porta ad una crescita superficiale non omogenea del micelio (questo vale sia nelle prove di fermentazione a temperatura ambiente sia in quelle termostate), abbiamo deciso di cambiare la disposizione spaziale dei sacchetti passando dalla posizione in orizzontale appena descritta ad una in verticale poggiante sul lato lungo del sacchetto. Questa variazione nell'allestimento ha effettivamente permesso una crescita del micelio più uniforme su tutta la superficie del substrato. L'ottimizzazione della crescita in sacchetti è partita dalle considerazioni appena fatte e mantenendo alcuni parametri di partenza fissi, cioè:

- Substrato: BSG tal quale scongelato a T_{amb}
- Inoculo: sospensione acquosa al 3,3% di starter tempeh m/v di starter tempeh + 0,3% m/v di farina di riso
- Caratteristiche dei sacchetti: materiale LDPE, dimensioni 12x8 cm, volume utile di 175 ml
- Allestimento dei sistemi: in verticale poggiante sul lato lungo del sacchetto

ha restituito come parametri fermentativi migliori tra quelli testati nelle prove effettuate:

- Massa di substrato: 70 g di BSG
- Pattern di fori: Pattern B (area forata/area del sacchetto = 0,13%)
- Inoculazione: 10% $v/m_{substrato}$
- Range di temperature: 30-32°C.

Una volta trovate le condizioni migliori per la coltivazione in sacchetto di *Rhizopus oligosporus* su BSG, abbiamo caratterizzato i tempeh ottenuti e abbiamo ricavato delle informazioni relative al cambiamento delle caratteristiche fisiche della matrice fermentata rispetto al BSG tal quale in relazione al grado di sviluppo del micelio fungino su di essa:

- La fermentazione porta ad una leggera acidificazione del substrato, probabilmente data dalla produzione di acidi organici, tanto più marcata tanto più il micelio si è sviluppato

(escludendo i casi dove abbiamo avuto una diminuzione del pH maggiore a fronte di una crescita del micelio quasi nulla probabilmente data da contaminazioni batteriche)

- Il contenuto di zuccheri disciolti diminuisce tanto più il micelio si è sviluppato
- I sistemi in cui la crescita del micelio è stata maggiore presentano una minore perdita del contenuto di acqua tra inizio e fine fermentazione.

A seguito della caratterizzazione siamo passati all'analisi della variazione del contenuto proteico tra BSG tal quale e prodotti fermentati. Abbiamo omogeneizzato i campioni da analizzare in acqua (1:3 *m/v*) con un frullatore e separato la fase solida da quella liquida dopo centrifugazione. La fase liquida ottenuta da ogni campione è stata utilizzata per letture allo spettrofotometro a 280nm e i dati ricavati sono stati inseriti nell'equazione di una retta di taratura ottenuta con dati di assorbanza a 280 nm di soluzioni di acqua e whey protein commerciali (WPI) a concentrazioni note. Dall'equazione della retta abbiamo così potuto calcolare le concentrazioni di proteine in g/L presenti nei vari campioni analizzati e rapportarlo a quello del BSG tal quale. Abbiamo verificato un incremento del contenuto proteico in tutti i sistemi (anche in quelli dove la crescita del micelio è risultata inferiore) fino ad un massimo di 1,5 volte quello di partenza. Quando abbiamo convertito le concentrazioni in g/kg_{BSG} i calcoli hanno restituito invece dei valori maggiori, fino a concentrazioni pari a 2 volte quella del BSG tal quale. La variazione è data dal fatto che, a parità di massa di campione analizzato, il volume di estratto liquido ottenuto (il cui valore è utilizzato nel calcolo della conversione) è minore nel BSG tal quale rispetto a quello dei prodotti fermentati. Bisogna infine precisare che la tecnica estrattiva utilizzata per questa analisi del contenuto proteico è risultata non ottimale per i prodotti di fermentazione che hanno presentato la massima crescita del micelio, poiché in questi sistemi la forte stabilizzazione della matrice ottenuta a fine fermentazione ha reso difficoltosa l'omogeneizzazione peggiorando probabilmente l'esito dell'estrazione. Possiamo quindi concludere questa tesi affermando che una *solid state fermentation* del BSG con l'utilizzo di *Rhizopus oligosporus* porta effettivamente all'ottenimento di un prodotto dal migliorato contenuto proteico come accade nel tempeh tradizionale. In futuro bisognerà quindi valutare la tecnica estrattiva migliore da utilizzare per garantire un'estrazione ottimale delle proteine anche dai sistemi dove la stabilizzazione è stata maggiore, per ottenere dei valori di concentrazione di proteine in essi più precisi.

Per quanto concerne gli sviluppi futuri dell'utilizzo del BSG come substrato nella fermentazione con questo fungo filamentoso si potrebbe:

- Ottenere uno starter di tempeh specifico per le fermentazioni su BSG
- Accoppiare questa fermentazione ad un processo di estrazione di proteine

Entrambi i punti sono stati brevemente affrontati durante l'attività di laboratorio. Per lo starter di tempeh abbiamo pensato di adattare il fungo al BSG come substrato delle fermentazioni mediante passaggi successivi su piastre contenenti BSG agarizzata come terreno (15 g BSG + 20 mL H₂O + 0,6 g agar per piastra) e raccogliere le spore di *Rhizopus* ottenute dall'ultimo passaggio su piastra. Una volta ottenute le spore del fungo adattato si potrebbe realizzare il nuovo starter aggiungendo della BSG essiccata e tritata per sostituire la farina di riso normalmente utilizzata negli starter commerciali come fonte supplementare di carbonio. L'impiego di questo starter potrebbe portare ad un miglioramento delle fermentazioni su BSG abbassando le tempistiche necessarie per ottenere il tempeh e magari ad avere prodotti di qualità

superiore e dai valori nutritivi incrementati. L'accoppiamento della fermentazione del BSG con *Rhizopus oligosporus* ad un processo di estrazione di proteine potrebbe invece risultare interessante in quanto si avrebbero almeno due possibilità:

- fermentare il BSG con *Rhizopus oligosporus* e ottenere dei prodotti con contenuto di proteine aumentato per poi estrarle con il processo di estrazione;
- effettuare l'estrazione delle proteine dal BSG e poi effettuare una fermentazione con *Rhizopus oligosporus* sul residuo solido dell'estrazione per provare ad aumentarne i valori nutritivi valorizzando il prodotto di scarto di una valorizzazione

Il problema associato al secondo punto è dato dal fatto che le estrazioni di proteine sono solitamente effettuate impiegando acidi e basi forti che alterano di molto il pH della matrice da utilizzare per le successive fermentazioni. Bisognerebbe quindi valutare l'effetto dell'estrazione sul pH del residuo solido e riportarlo poi ad un valore ottimale per la crescita di *Rhizopus oligosporus* senza intaccare troppo il rapporto tra costi e benefici del processo.

5. Bibliografia

- Alam, Md.Z., Kabbashi, N.A., Hussin, S.N.I.S., 2009. Production of bioethanol by direct bioconversion of oil-palm industrial effluent in a stirred-tank bioreactor. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 801. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0554-7>
- Allen, S.J., Whitten, L., McKay, G., 2008. The Production and Characterisation of Activated Carbons: A Review. *Dev. Chem. Eng. Miner. Process.* 6, 231–261. <https://doi.org/10.1002/apj.5500060501>
- Amoriello, T., Fiorentino, S., Vecchiarelli, V., Pagano, M., 2020. Evaluation of Spent Grain Biochar Impact on Hop (*Humulus lupulus* L.) Growth by Multivariate Image Analysis. *Appl. Sci.* 10. <https://doi.org/10.3390/app10020533>
- Badr, A., M, K., Sch, R., Rabey, H.E., Effgen, S., Ibrahim, H.H., Pozzi, C., Rohde, W., Salamini, F., 2000. On the Origin and Domestication History of Barley (*Hordeum vulgare*). *Mol. Biol. Evol.* 17, 499–510. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026330>
- Betancur, G., Pereira Jr, N., 2010. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: Diluted acid pretreatment optimization. *Electron. J. Biotechnol. - ELECTRON J BIOTECHNOL* 13. <https://doi.org/10.2225/vol13-issue3-fulltext-3>
- Bianco, A., Budroni, M., Zara, S., Mannazzu, I., Fancello, F., Zara, G., 2020. The role of microorganisms on biotransformation of brewers' spent grain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 8661–8678. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10843-1>
- Birsan, R.I., Wilde, P., Waldron, K.W., Rai, D.K., 2019. Recovery of Polyphenols from Brewer's Spent Grains. *Antioxidants* 8. <https://doi.org/10.3390/antiox8090380>
- Bochmann, G., Drogg, B., Fuchs, W., 2015. Anaerobic digestion of thermal pretreated brewers' spent grains. *Environ. Prog. Sustain. Energy* 34, 1092–1096. <https://doi.org/10.1002/ep.12110>
- Canedo, M.S., de Paula, F.G., da Silva, F.A., Vendruscolo, F., 2016. Protein enrichment of brewery spent grain from *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 39, 1105–1113. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1587-8>
- Carvalho, F., Duarte, L., Lopes, S., Parajó, J., Pereira, H., Gírio, F., 2006. Supplementation requirements of brewery's spent grain hydrolysate for biomass and xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCM1 941. *J. Ind. Microbiol. Amp Biotechnol.* 33, 646—654. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0101-8>
- Castro, L.E.N., Colpini, L.M.S., 2021. All-around characterization of brewers' spent grain. *Eur. Food Res. Technol.* 247, 3013–3021. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03860-5>
- Chandrasekaran, M., Nout, M.J.R., Sarkar, P.K. (Eds.), 2012. Valorization of food processing by-products, *Fermented Foods and Beverages*. CRC.
- Chetrariu, A., Dabija, A., 2020. Brewer's Spent Grains: Possibilities of Valorization, a Review. *Appl. Sci.* 10. <https://doi.org/10.3390/app10165619>
- Choi, M.-S., Choi, Y.-S., Kim, H.-W., Hwang, K.-E., Song, D.-H., N Lee, S.-Y., Kim, C.-J., 2014. Effects of Replacing Pork Back Fat with Brewer's Spent Grain Dietary Fiber on Quality Characteristics of Reduced-fat Chicken Sausages. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 34, 158–165. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2014.34.2.158>
- Cooray, S.T., Chen, W.N., 2018. Valorization of brewer's spent grain using fungi solid-state fermentation to enhance nutritional value. *J. Funct. Foods* 42, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.027>

- de Castro, A.M., Castilho, L.R., Freire, D.M.G., 2015. Multivariate Optimization and Supplementation Strategies for the Simultaneous Production of Amylases, Cellulases, Xylanases, and Proteases by *Aspergillus awamori* Under Solid-State Fermentation Conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175, 1588–1602. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1368-2>
- Esfandi, R., Walters, M.E., Tsopmo, A., 2019. Antioxidant properties and potential mechanisms of hydrolyzed proteins and peptides from cereals. *Heliyon* 5. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01538>
- Eßlinger, H.M., 2009. Fermentation, Maturation and Storage, in: *Handbook of Brewing*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 207–224. <https://doi.org/10.1002/9783527623488.ch8>
- Evans, D.E., Goldsmith, M., Redd, K.S., Nischwitz, R., Lentini, A., 2012. Impact of Mashing Conditions on Extract, its Fermentability, and the Levels of Wort Free Amino Nitrogen (FAN), β -Glucan, and Lipids. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 70, 39–49. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2012-0103-01>
- Faccenda, A., Zambom, M., Castagnara, D., Sanches, A., Fernandes, T., Eckstein, E., Anschau, F., Schneider, C., 2017. Use of dried brewers' grains instead of soybean meal to feed lactating cows. *Rev. Bras. Zootec.* 46, 39–46. <https://doi.org/10.1590/s1806-92902017000100007>
- Faulds, C., Sancho, A., Bartolomé, B., 2002. Mono- and dimeric ferulic acid release from brewer's spent grain by fungal feruloyl esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 489–494. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1140-3>
- Feldsine, P., Abeyta, C., Andrews, W.H., 2002. AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. *J. AOAC Int.* 85, 1187–1200. <https://doi.org/10.1093/jaoac/85.5.1187>
- Ferraz Eduardo, Coroado João, Gamelas José, Silva Joaquim, Rocha Fernando, Velosa Ana, 2013. Spent Brewery Grains for Improvement of Thermal Insulation of Ceramic Bricks. *J. Mater. Civ. Eng.* 25, 1638–1646. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)MT.1943-5533.0000729](https://doi.org/10.1061/(ASCE)MT.1943-5533.0000729)
- Formela, K., Hejna, A., Zedler, Ł., Przybysz, M., Ryl, J., Saeb, M.R., Piszczyk, Ł., 2017. Structural, thermal and physico-mechanical properties of polyurethane/brewers' spent grain composite foams modified with ground tire rubber. *Ind. Crops Prod.* 108, 844–852. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.07.047>
- Francis, F., Sabu, A., Nampoothiri, K.M., Ramachandran, S., Ghosh, S., Szakacs, G., Pandey, A., 2003. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Biochem. Eng. J.* 15, 107–115. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00192-4](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00192-4)
- Górska, E.B., Jankiewicz, U., Dobrzyński, J., Agnieszka Gałązka, Sitarek, M., Gozdowski, D., Russel, S., Kowalczyk, P., 2015. Production of ligninolytic enzymes by cultures of white rot fungi. *Pol. J. Microbiol.* 63, 461–5.
- Guarda, E.C., Oliveira, A.C., Antunes, S., Freitas, F., Castro, P.M.L., Duque, A.F., Reis, M.A.M., 2021. A Two-Stage Process for Conversion of Brewer's Spent Grain into Volatile Fatty Acids through Acidogenic Fermentation. *Appl. Sci.* 11, 3222. <https://doi.org/10.3390/app11073222>
- Guido, L.F., Moreira, M.M., 2017. Techniques for Extraction of Brewer's Spent Grain Polyphenols: a Review. *Food Bioprocess Technol.* 10, 1192–1209. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1913-4>
- Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., Van Otterdijk, R., Meybeck, A., 2011. Global food losses and food waste.

- Handoyo, T., Morita, N., 2006. Structural and Functional Properties of Fermented Soybean (Tempeh) by Using *Rhizopus oligosporus*. *Int. J. Food Prop.* 9, 347–355. <https://doi.org/10.1080/10942910500224746>
- Hashemi, M., Razavi, S.H., Shojaosadati, S.A., Mousavi, S.M., 2011. The potential of brewer's spent grain to improve the production of α -amylase by *Bacillus* sp. KR-8104 in submerged fermentation system. *N Biotechnol* 28, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.10.009>
- Humbird, D., Davis, R., Tao, L., Kinchin, C., Hsu, D., Aden, A., Schoen, P., Lukas, J., Olthof, B., Worley, M., Sexton, D., Dudgeon, D., 2011. Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol: Dilute-Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover. <https://doi.org/10.2172/1013269>
- Jennessen, J., Nielsen, K., Houbraken, J., Lyhne, E., Schnürer, J., Frisvad, J., Samson, R., 2005. Secondary Metabolite and Mycotoxin Production by the *Rhizopus microsporus* Group. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1833–40. <https://doi.org/10.1021/jf048147n>
- Jennessen, J., Schnürer, J., Olsson, J., Samson, R.A., Dijksterhuis, J., 2008. Morphological characteristics of sporangiospores of the tempe fungus *Rhizopus oligosporus* differentiate it from other taxa of the *R. microsporus* group. *Mycol. Res.* 112, 547–563. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.11.006>
- Jones, M., Mautner, A., Luenco, S., Bismarck, A., John, S., 2020. Engineered mycelium composite construction materials from fungal biorefineries: A critical review. *Mater. Des.* 187, 108397. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2019.108397>
- Kanauchi, O., Mitsuyama, K., Araki, Y., 2001. Development of a Functional Germinated Barley Foodstuff from Brewer's Spent Grain for the Treatment of Ulcerative Colitis. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 59, 59–62. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-59-0059>
- Knob, A., Terrasan, C.R.F., Carmona, E.C., 2010. β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 389–407. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0190-4>
- Kreisz, S., 2009. Malting, in: *Handbook of Brewing*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 147–164. <https://doi.org/10.1002/9783527623488.ch6>
- Ktenioudaki, A., Chaurin, V., Reis, S.F., Gallagher, E., 2012. Brewer's spent grain as a functional ingredient for breadsticks. *Int. J. Food Sci. Technol.* 47, 1765–1771. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03032.x>
- Kunze, W., Manger, H.J., Pratt, S., 2004. *Technology Brewing and Malting*. VLB.
- Lennartsson, P.R., Taherzadeh, M.J., Edebo, L., 2014. *Rhizopus*, in: Batt, C.A., Tortorello, M.L. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition). Academic Press, Oxford, pp. 284–290. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00391-8>
- Lindemann, B., 2009. Filtration and Stabilization, in: *Handbook of Brewing*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 225–234. <https://doi.org/10.1002/9783527623488.ch9>
- Llimós, J., Martínez-Avila, O., Marti, E., Corchado-Lopo, C., Llenas, L., Gea, T., Ponsá, S., 2020. Brewer's spent grain biotransformation to produce lignocellulolytic enzymes and polyhydroxyalkanoates in a two-stage valorization scheme. *Biomass Convers. Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00918-4>
- Lonsane, B.K., Ghildyal, N.P., Budiartman, S., Ramakrishna, S.V., 1985. Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 7, 258–265. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(85\)90083-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(85)90083-3)
- Lu, Z.X., Walker, K.Z., Muir, J.G., Mascara, T., O'Dea, K., 2000. Arabinoxylan fiber, a byproduct of wheat flour processing, reduces the postprandial glucose response in normoglycemic subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 1123–1128. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.5.1123>

- Lynch, K.M., Steffen, E.J., Arendt, E.K., 2016. Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. *J. Inst. Brew.* 122, 553–568.
<https://doi.org/10.1002/jib.363>
- Maheshwari, G., Ahlborn, J., Rühl, M., 2021. Role of Fungi in Fermented Foods, in: Zaragoza, Ó., Casadevall, A. (Eds.), *Encyclopedia of Mycology*. Elsevier, Oxford, pp. 590–600. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819990-9.00015-9>
- Marcus, A., Fox, G., 2021. Fungal Biovalorization of a Brewing Industry Byproduct, Brewer's Spent Grain: A Review. *Foods* 10. <https://doi.org/10.3390/foods10092159>
- Mbagwu, J.S.C., Ekwealor, G.C., 1990. Agronomic potential of brewers' spent grains. *Biol. Wastes* 34, 335–347. [https://doi.org/10.1016/0269-7483\(90\)90034-P](https://doi.org/10.1016/0269-7483(90)90034-P)
- McCarthy, A.L., O'Callaghan, Y.C., Piggott, C.O., FitzGerald, R.J., O'Brien, N.M., 2013. Brewers' spent grain; bioactivity of phenolic component, its role in animal nutrition and potential for incorporation in functional foods: a review. *Proc. Nutr. Soc.* 72, 117–125. <https://doi.org/10.1017/S0029665112002820>
- Meeting, J.F.E.C. on F.A., Organization, W.H., 2014. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. World Health Organization.
- Meneses, N.G.T., Martins, S., Teixeira, J.A., Mussatto, S.I., 2013. Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Sep. Purif. Technol.* 108, 152–158.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.02.015>
- Moore, D., Robson, G.D., Trinci, A.P.J., 2011. 21st Century Guidebook to Fungi with CD, 21st Century Guidebook to Fungi. Cambridge University Press.
- Muller, R., 1991. THE EFFECTS OF MASHING TEMPERATURE AND MASH THICKNESS ON WORT CARBOHYDRATE COMPOSITION. *J. Inst. Brew.* 97, 85–92. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1991.tb01055.x>
- Mussatto, S., 2009. Biotechnological Potential of Brewing Industry By-Products, in: *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. pp. 313–326.
https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9942-7_16
- Mussatto, S.I., 2014. Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. *J. Sci Food Agric* 94, 1264–1275. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6486>
- Mussatto, S.I., Dragone, G., Roberto, I.C., 2006. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *J. Cereal Sci.* 43, 1–14.
<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.06.001>
- Mussatto, S.I., Dragone, G., Roberto, I.C., 2005. Kinetic Behavior of *Candida guilliermondii* Yeast during Xylitol Production from Brewer's Spent Grain Hemicellulosic Hydrolysate. *Biotechnol. Prog.* 21, 1352–1356. <https://doi.org/10.1021/bp0501118>
- Nazzaro, J., Martin, D.S., Perez-Vendrell, A.M., Padrell, L., Iñarra, B., Orive, M., Estévez, A., 2021. Apparent digestibility coefficients of brewer's by-products used in feeds for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 530, 735796. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735796>
- Neylon, E., Arendt, E.K., Zannini, E., Sahin, A.W., 2021. Fermentation as a Tool to Revitalise Brewers' Spent Grain and Elevate Techno-Functional Properties and Nutritional Value in High Fibre Bread. *Foods* 10.
<https://doi.org/10.3390/foods10071639>
- Nigam, P.S., 2017. An overview: Recycling of solid barley waste generated as a by-product in distillery and brewery. *Waste Manag.* 62, 255–261.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.02.018>
- Nocente, F., Taddei, F., Galassi, E., Gazza, L., 2019. Upcycling of brewers' spent grain by production of dry pasta with higher nutritional potential. *LWT* 114, 108421.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108421>

- Okamoto, H., Sato, K., Yagi, N., Inoue, M., Yamasaki, S., Ishida, S., Shibata, J., 2002. Development of production process of charcoal bricks from spent grain. *Kagaku Kogaku Ronbunshu* 28, 137–142.
- Osman, A.I., O'Connor, E., McSpadden, G., Abu-Dahrieh, J.K., Farrell, C., Al-Muhtaseb, A.H., Harrison, J., Rooney, D.W., 2020. Upcycling brewer's spent grain waste into activated carbon and carbon nanotubes for energy and other applications via two-stage activation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 95, 183–195. <https://doi.org/10.1002/jctb.6220>
- Özvural, E.B., Vural, H., Gökbulut, İ., Özboy-Özbaş, Ö., 2009. Utilization of brewer's spent grain in the production of Frankfurters. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44, 1093–1099. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.01921.x>
- Panagiotou, G., Granouillet, P., Olsson, L., 2006. Production and partial characterization of arabinoxylan-degrading enzymes by *Penicillium brasilianum* under solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 1117–1124. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0394-6>
- Pandey, A., 2003. Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13, 81–84. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3)
- Pedro Silva, J., Sousa, S., Rodrigues, J., Antunes, H., Porter, J.J., Gonçalves, I., Ferreira-Dias, S., 2004. Adsorption of acid orange 7 dye in aqueous solutions by spent brewery grains. *Sep. Purif. Technol.* 40, 309–315. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2004.03.010>
- Pham, T.P.T., Kaushik, R., Parshetti, G.K., Mahmood, R., Balasubramanian, R., 2015. Food waste-to-energy conversion technologies: Current status and future directions. *Waste Manag.* 38, 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.12.004>
- Puligundla, P., Mok, C., 2021. Recent advances in biotechnological valorization of brewers' spent grain. *Food Sci. Biotechnol.* 1–13.
- Robertson, J.A., I'Anson, K.J.A., Brocklehurst, T.F., Faulds, C.B., Waldron, K.W., 2010a. Effect of storage conditions on the microbial ecology and biochemical stability of cell wall components in brewers' spent grain. *J. Agric. Food Chem.* 58, 7266–7272. <https://doi.org/10.1021/jf1001099>
- Robertson, J.A., I'Anson, K.J.A., Treimo, J., Faulds, C.B., Brocklehurst, T.F., Eijsink, V.G.H., Waldron, K.W., 2010b. Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. *LWT - Food Sci. Technol.* 43, 890–896. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.01.019>
- Rojas-Chamorro, J.A., Cara, C., Romero, I., Ruiz, E., Romero-García, J.M., Mussatto, S.I., Castro, E., 2018. Ethanol Production from Brewers' Spent Grain Pretreated by Dilute Phosphoric Acid. *Energy Fuels* 32, 5226–5233. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.8b00343>
- Roth, M., Jekle, M., Becker, T., 2019. Opportunities for upcycling cereal byproducts with special focus on Distiller's grains. *Trends Food Sci. Technol.* 91, 282–293. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.041>
- Russ, W., Mörtel, H., Meyer-Pittroff, R., 2005. Application of spent grains to increase porosity in bricks. *Constr. Build. Mater.* 19, 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2004.05.014>
- Sajjadi, B., Chen, W.-Y., Egiebor, N.O., 2019. A comprehensive review on physical activation of biochar for energy and environmental applications. *Rev. Chem. Eng.* 35, 735–776. <https://doi.org/doi:10.1515/revce-2017-0113>
- Salihu, A., Bala, M., 2011. Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 324–331.
- San Martin, D., Orive, M., Iñarra, B., Castelo, J., Estévez, A., Nazzaro, J., Iloro, I., Elortza, F., Zufia, J., 2020. Brewers' Spent Yeast and Grain Protein Hydrolysates as Second-

- Generation Feedstuff for Aquaculture Feed. *Waste Biomass Valorization* 11, 5307–5320. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01145-8>
- Sežun, M., Grilc, V., Zupančič, G.D., Marinšek-Logar, R., 2011. Anaerobic digestion of brewery spent grain in a semi-continuous bioreactor: inhibition by phenolic degradation products. *Acta Chim. Slov.* 58, 158–166.
- Steiner, J., Procopio, S., Becker, T., 2015. Brewer's spent grain: source of value-added polysaccharides for the food industry in reference to the health claims. *Eur. Food Res. Technol.* 241, 303–315. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2461-7>
- Suman, G., Nupur, M., Anuradha, S., Pradeep, B.P., 2015. Single Cell Protein Production: A Review.
- Thiago, R. dos S.M., Pedro, P.M. de M., Eliana, F.C.S., 2014. Solid wastes in brewing process: A review. *J. Brew. Distill.* 5, 1–9. <https://doi.org/10.5897/JBD2014.0043>
- Truswell, A., 2002. Cereal grains and coronary heart disease. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56, 1–14. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601283>
- Vanderheyden, S.R.H., Vanreppelen, K., Yperman, J., Carleer, R., Schreurs, S., 2018. Chromium(VI) removal using in-situ nitrogenized activated carbon prepared from Brewers' spent grain. *Adsorption* 24, 147–156. <https://doi.org/10.1007/s10450-017-9929-7>
- Wang, H., Tao, Y., Temudo, M., Bijl, H., Kloek, J., Ren, N., van Lier, J.B., de Kreuk, M., 2015. Biomethanation from enzymatically hydrolyzed brewer's spent grain: impact of rapid increase in loadings. *Bioresour. Technol.* 190, 167–174.
- Wierzba, S., Kłos, A., 2019. Heavy metal sorption in biosorbents – Using spent grain from the brewing industry. *J. Clean. Prod.* 225, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.03.286>
- Xiros, C., Topakas, E., Katapodis, P., Christakopoulos, P., 2008a. Evaluation of *Fusarium oxysporum* as an enzyme factory for the hydrolysis of brewer's spent grain with improved biodegradability for ethanol production. *Ind. Crops Prod.* 28, 213–224. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.02.004>
- Xiros, C., Topakas, E., Katapodis, P., Christakopoulos, P., 2008b. Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*. *Bioresour. Technol.* 99, 5427–5435. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.010>
- Xu, H., Sun, L., Zhao, D., Zhang, B., Shi, Y., Wu, Y., 2008. Production of α -amylase by *Aspergillus oryzae* As 3951 in solid state fermentation using spent brewing grains as substrate. *J. Sci. Food Agric.* 88, 529–535. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3118>
- Zoghalmi, A., Paës, G., 2019. Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. *Front. Chem.* 7, 874. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00874>
- G. Zanker, W, Kepplinger, 2002 “The utilization of spent grains in the brewery integrated system”, *Brauwelt*, vol. 142, pp. 1742-1747

6. Appendice

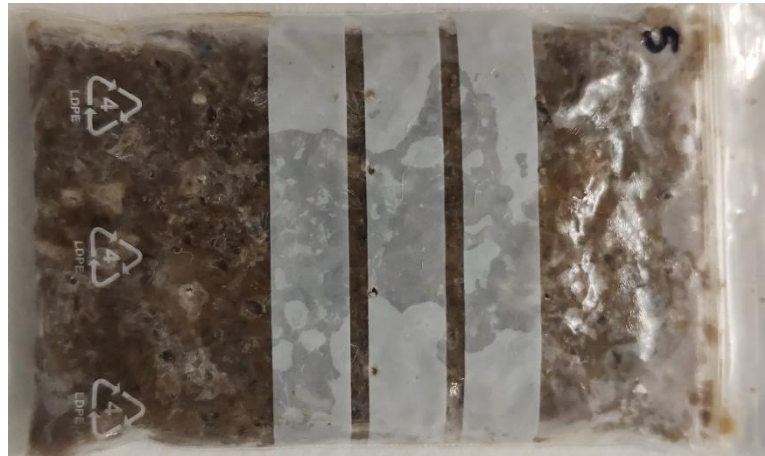


Figura 3.14 Foto esemplificativa della crescita del micelio indicata come ‘-‘



Figura 3.15 Foto esemplificativa della crescita del micelio indicata come ‘+‘



Figura 3.16 Foto esemplificativa della crescita del micelio indicata come ‘++‘

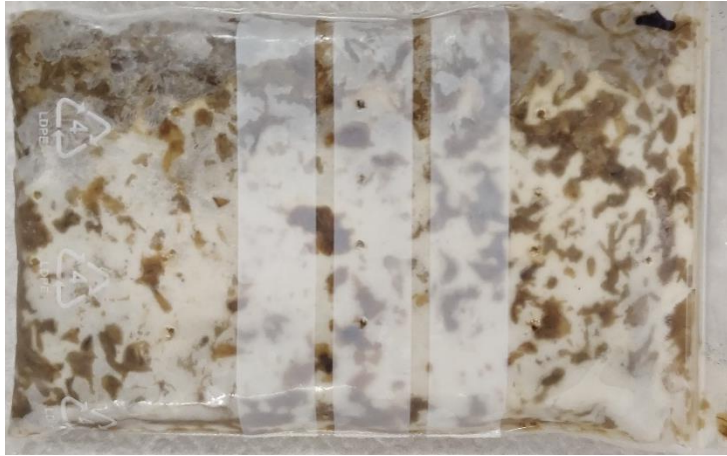


Figura 3.17 Foto esemplificativa della crescita del micelio indicata come ‘+++’

7. Ringraziamenti

Al termine di questo percorso universitario e di questa parte della mia vita vorrei fare alcuni sentiti e doverosi ringraziamenti.

Ringrazio i miei genitori per non avermi mai fatto mancare il loro affetto e il loro sostegno, li ringrazio per essere il miglior esempio che io possa seguire. Spero di riuscire in tutta la vita a restituirvi almeno un decimo di quello che mi avete dato e che mi darete.

Ringrazio mio fratello e mia sorella per essere così diversi da me ma comunque sempre dalla mia parte.

Ringrazio le mie nonne, Clementina e Grazia, per aver sempre creduto in me così tanto da convincermi a non arrendermi mai e per avermi mostrato cosa vuol dire “voler bene incondizionatamente”.

Ringrazio i miei nonni, Sergio ed Ermanno, per essere stati due uomini incredibili. Cercherò di rendervi fieri di me come io lo sono di voi.

Ringrazio il resto della mia famiglia per essere sempre i miei primi sostenitori.

Ringrazio Roberta per avermi supportato e sopportato (molto) in questi ultimi mesi, per farmi vivere il miglior presente possibile ed immaginare un domani ancora più bello.

Ringrazio tutti i miei amici per ogni momento passato insieme, senza di voi non sarei la persona che sono oggi. Come regalo vi lascio liberi di decidere se abbiate fatto un buon lavoro o meno.