

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:
processi di fermentazione con *R. mucilaginosa*
per la produzione di carotenoidi**



Relatore

prof.ssa Francesca Bosco

Candidato

Davide Forna

Ottobre 2022

*Un ringraziamento speciale ai Birrifici Artigianali
Edit e Leumann (TO) per la gentile concessione
delle trebbie impiegate nella presente tesi*

Indice

1. Introduzione	1
1.1 <i>La produzione della birra</i>	2
1.1.1 L'orzo e il processo di maltazione	2
1.1.2 La produzione della birra	4
1.1.3 Molitura del malto	4
1.1.4 Ammostamento.....	4
1.1.5 Filtrazione e Sparging	5
1.1.6 Bollitura, luppolatura e Whirlpool.....	5
1.1.7 Raffreddamento e Fermentazione.....	6
1.2 <i>Brewers' spent grain</i>	6
1.2.1 Composizione	7
1.2.2 Possibili applicazioni del BSG	8
1.2.3 Nutrizione animale e umana.....	8
1.2.4 Produzione di energia	9
1.2.5 Produzione di mattoni da costruzione e carta.....	10
1.2.6 Applicazioni biotecnologiche.....	10
1.3 <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	11
1.4 <i>Carotenoidi</i>	12
1.4.1 Composizione e caratteristiche chimiche.....	13
1.4.3 Sintesi chimica.....	14
1.4.4 Estrazione da matrici vegetali	15
1.4.5 Processi biotecnologici	15
1.4.6 Funzionalità e applicazioni dei carotenoidi.....	17
1.5 <i>Scopo del lavoro</i>	17
2. Materiali e metodi	19
2.1 <i>Informazioni preliminari e caratterizzazione del BSG</i>	19
2.1.1 Impianto e ricetta di produzione del BSG Forna	19
2.1.2 Contenuto di umidità	21
2.1.3 Valutazione di pH.....	21
2.2 <i>Caratterizzazione degli estratti di BSG</i>	22

2.2.1	Estrazione.....	22
2.2.2	Valutazione di pH, °Br e contenuto proteico	22
2.4	<i>Coltura in multiwell</i>	27
2.4.1	Coltura su estratti di BSG Edit e Leumann	27
2.4.2	Coltura su sciroppi di BSG Forna - PROVA 1	29
2.4.3	Coltura su sciroppi di BSG Forna - PROVA 2	31
2.5	<i>Coltura in beuta</i>	33
2.5.1	Coltura su terreno YM.....	33
2.5.2	Coltura su estratti di BSG Edit e Leumann	34
2.5.3	Coltura su sciroppi di BSG Forna	34
2.6	<i>Coltura in bioreattore</i>	35
2.7	<i>Estrazione dei carotenoidi</i>	38
2.7.1	Estrazione da biomassa umida	38
2.7.2	Estrazione da biomassa secca	39
3.	Analisi e discussione dei risultati.....	40
3.1	<i>Caratterizzazione del BSG</i>	40
3.2	<i>Caratterizzazione degli estratti di BSG (con acqua)</i>	41
3.3	<i>Coltura su piastre di Petri</i>	42
3.4	<i>Coltura in multiwell</i>	45
3.4.1	Coltura su estratti di BSG Edit e Leumann	45
3.4.2	Coltura su sciroppi di BSG Forna (DOE) - PROVA 1.....	49
3.4.3	Coltura su sciroppi di BSG Forna (DOE) - PROVA 2.....	54
3.4.4	Confronto tra le prove in multiwell.....	63
3.5	<i>Coltura in beuta</i>	67
3.5.1	Coltura su terreno YM.....	67
3.5.2	Coltura su estratti di BSG Edit e Leumann.....	70
3.5.3	Coltura su sciroppi di BSG Forna	71
3.6	<i>Coltura in bioreattore</i>	81
3.7	<i>Estrazione dei carotenoidi</i>	92
3.7.1	Ottimizzazione del processo estrattivo	92
3.7.2	Estrazione da colture contenenti sciroppo di BSG Forna.....	94
4.	Conclusioni e prospettive future.....	99
5.	Bibliografia.....	102

1. Introduzione

Nel mondo contemporaneo, caratterizzato da attività industriali volte allo sfruttamento delle risorse naturali, con la conseguente produzione di ingenti quantitativi di rifiuti, è nata un'attenzione marcata al riciclo e al riutilizzo dei sottoprodotti di lavorazione con la finalità di dar loro nuova vita. Quest'idea si allinea con le strategie connesse alla sostenibilità e al concetto di economia circolare, che da alcuni decenni si stanno facendo strada all'interno di un mercato sempre più industrializzato, guidato dagli obiettivi di massimizzare la produttività e il ricavo, ponendo però l'attenzione a come questi vengono perseguiti. Oltre alle emissioni di CO₂ in atmosfera, di fondamentale importanza sono gli scarti di produzione i cui smaltimenti spesso si configurano come un costo aggiuntivo gravante sulle aziende. Infatti, proprio i sottoprodotti alle volte possono essere impiegati come materie prime in processi secondari, volti alla generazione di prodotti ad elevato valore aggiunto. L'utilizzo di questi rifiuti non solo valorizza i problemi di smaltimento degli stessi, ma riduce anche l'inquinamento ambientale (Kaur et al., 2019).

Fra i principali scarti si annoverano quelli legati alle produzioni agroalimentari: soia, mais, canna da zucchero, manioca, caffè, frutta e molti altri. Queste attività sono responsabili della generazione di enormi quantità di residui giornalieri, come la manioca e la bagassa di canna da zucchero, la lolla di riso e la buccia di caffè. Questi ultimi sono ricche fonti di energia rinnovabile e possono essere utilizzati come substrati per prodotti di interesse industriale (Lopes & Ligabue-Braun, 2021).

Sicuramente, anche il processo di produzione della birra non è esente dalla generazione di scarti che potrebbero acquisire una seconda vita. Prime fra tutti sono le trebbie (*Brewers' spent grain* o *BSG*).

Il mercato mondiale brassicolo è in continua espansione (*Figura 1.1*) e ha raggiunto nel 2019 una media di 194 miliardi di litri all'anno prodotti (dato misurato prima della pandemia da COVID-19) con una conseguente creazione di circa 39 milioni di tonnellate

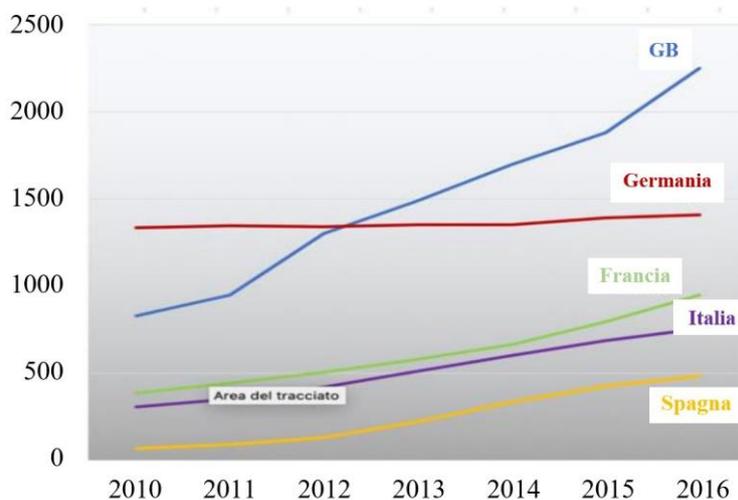


Figura 1.1 – Numero birrifici attivi in alcuni paesi europei fino al 2016 (Unionbirrai, 2018)

di BSG (Birsan et al., 2019). Anche in Italia, nell'ultimo ventennio, i birrifici artigianali sono aumentati esponenzialmente in numero, sintomo del fatto che la birra sta trovando nel nostro paese un terreno fertile su cui crescere; pertanto, risulta sempre più importante e attuale ideare nuovi metodi sostenibili per riutilizzare le trebbie, attribuendo loro una seconda esistenza più fruttuosa di quanto non venga fatto oggi.

1.1 La produzione della birra

La birra è certamente una delle bevande più antiche nella storia dell'umanità. Si tratta di un prodotto alcolico fermentato ad opera di lieviti quali *Saccharomyces carlsbergensis* o *Saccharomyces cerevisiae* che prevede l'introduzione di tre ingredienti principali: il malto d'orzo o di frumento, l'acqua e il luppolo.

1.1.1 L'orzo e il processo di maltazione

L'orzo è da sempre il cereale più utilizzato per la produzione della birra. Dal punto di vista qualitativo si prediligono quelli "distici", caratterizzati da spighe aventi solo due file di chicchi (*Figura 1.1.1*); questi ultimi risultano essere più uniformi e di maggiore dimensione. Negli Stati Uniti è abbastanza diffuso l'uso degli orzi "polistici", in particolare i cosiddetti "esastici", costituiti da spighe con sei file di cariossidi grazie alle quali si raggiungono rese superiori durante la coltivazione. L'orzo, tuttavia, non viene utilizzato direttamente nella produzione della birra, ma subisce un processo (detto "maltazione") in grado di conferirgli una serie di caratteristiche fondamentali per la sua applicazione.

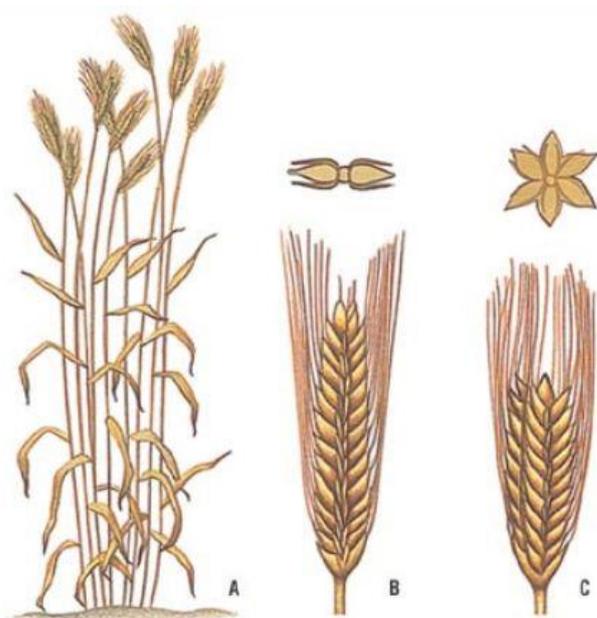


Figura 1.1.1 – Spighe di orzo “distico” (a sinistra) ed “esastico” (a destra)

<https://nicedie.eu/home/dizionario-parole-difficili-italiano-cosa-che-vuol-dire-conosci-etimologia-e-significato-di-distico.html>

La maltazione consiste nel riportare in attività il chicco di orzo che si trova in uno stato di quiescenza. In altre parole, si simula ciò che avverrebbe in natura nel momento in cui il chicco viene seminato e genera una nuova pianta d'orzo (Figura 1.1.2). È un procedimento che avviene in diverse fasi (Bertinotti & Faraggi, 2015; Unionbirrai, 2018):

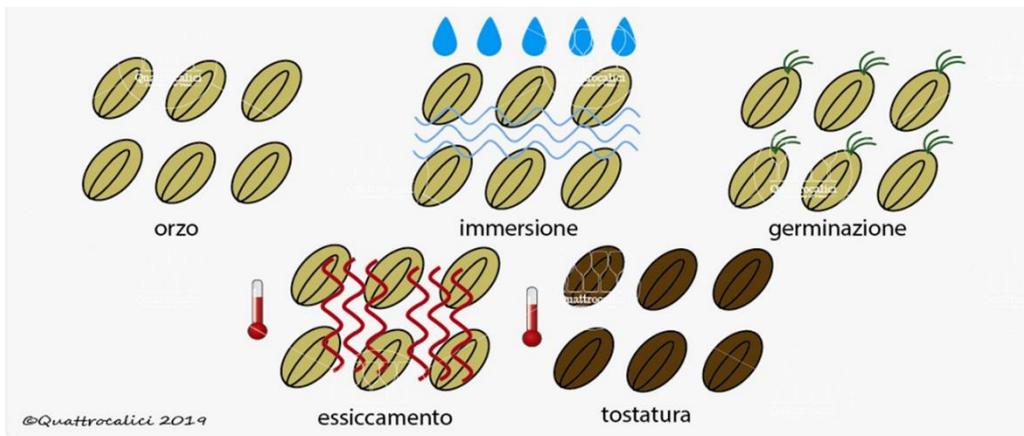


Figura 1.1.2 – Schema di un processo di maltazione;

<https://www.quattroclici.it/birra/malto-dorzo-materie-prime-della-birra/>

- *Pulitura*: le cariossidi vengono separate dalle impurità;
- *Calibratura*: discriminazione sulla base della grandezza dei chicchi per ottenere un prodotto omogeneo;
- *Bagnatura*: l'orzo viene bagnato con acqua fino al raggiungimento di un determinato grado di umidità;
- *Germinazione*: l'orzo bagnato viene immesso in apposite vasche di germinazione nelle quali sosta per alcuni giorni. In questa fase avvengono delle trasformazioni all'interno del chicco che causano l'attivazione degli enzimi utili per l'estrazione degli zuccheri dall'amido di partenza. La germinazione è accompagnata dallo spuntare della piumetta (la prima fogliolina della futura pianta d'orzo) e della radichetta (il primo abbozzo di radice). Questo stadio del processo termina quando le lunghezze della piumetta e della radichetta raggiungono circa quella del chicco. La durata di questa fase è di fondamentale importanza, poiché, se protratta per tempi eccessivamente lunghi, gli enzimi comincerebbero a degradare l'amido in zuccheri (il nutrimento nei primi istanti di accrescimento della pianta);
- *Essiccazione e tostatura*: al termine della germinazione, il chicco viene essiccato in modo da fermare l'azione enzimatica e per rendere conservabile il prodotto. Il trattamento consiste in un essiccamento con aria calda per un certo periodo di tempo. È soprattutto in questa fase che si ottiene una corretta caratterizzazione del prodotto. Ad esempio, un malto chiaro (tipo *Pilsner*) riceve un trattamento a circa 60°C, uno più scuro (come il *Monaco*) viene sottoposto ad una temperatura di circa 80 °C, ecc.; In questa fase avviene

anche l'eliminazione della piumetta e della radichetta per mezzo di macchinari appositi;

- *Confezionamento*: il malto viene confezionato in sacchi da 25-50 kg, in “big bag” da 850-1000 kg, oppure trasportato direttamente in cisterne fino al birrificio.

1.1.2 La produzione della birra

Il processo produttivo segue le seguenti operazioni unitarie (*Figura 1.1.3*) volte alla trasformazione delle materie prime nel mosto, il quale sarà sottoposto a fermentazione per trasformarsi finalmente in birra (Bertinotti & Faraggi, 2015; Unionbirrai, 2018).

1.1.3 Molitura del malto

Il malto viene macinato con un mulino a rulli in modo da ridurre le dimensioni delle cariossidi per favorire la successiva solubilizzazione in acqua di ciò che è in esse contenuto. Le scorze (glume) devono rimanere il più possibile integre per poter agire da pannello filtrante nella fase di filtrazione del mosto e delle trebbie (la produzione di farine è da evitare il più possibile). Se non si rispetta questa regola si avrà una compattazione del pannello e di conseguenza una lunghissima filtrazione con scarsa limpidezza del mosto. Il grado di schiacciamento ottenuto dipende da vari fattori: tipo di mulino usato, molitura a secco o a umido, velocità dei cilindri del mulino, distanza fra i cilindri.

1.1.4 Ammostamento

Nel tino di ammostamento vengono miscelati malto triturato e acqua fredda di rete (circa tre parti di acqua per una di malto). A miscelazione avvenuta si comincia a riscaldare secondo uno specifico procedimento *multistep* che rappresenta la ricetta di fabbricazione. Il riscaldamento della miscela favorisce l'operato degli enzimi contenuti nel malto. Questi, variando opportunamente i valori di temperatura e pH del brodo, saranno attivati in contemporanea oppure alternativamente apportando alcune trasformazioni alla miscela di partenza. Tra i principali enzimi impiegati nel processo si distinguono proteasi e amilasi. Le prime (attive a 45-55°C e pH 4,5-5,0) hanno il compito di degradare le proteine ad amminoacidi e peptidi, mentre le seconde (attive a 55-70°C e pH 5,0-5,5), idrolizzano l'amido in zuccheri a più corta catena. Tra le amilasi si distinguono alfa e beta amilasi: le prime scindono il legame 1-4 glicosidico convertendo l'amido in maltodestrine; le seconde sono in grado di generare molecole di maltosio e maltotriosio facilmente metabolizzabili dal lievito durante la fase fermentativa. Una volta terminato l'ammontamento si procede con il cosiddetto *mash out* innalzando la temperatura della

miscela a 78°C al fine di inattivare gli enzimi ed evitare trasformazioni successive da essi catalizzate.

1.1.5 Filtrazione e Sparging

La filtrazione ha il compito di separare il mosto zuccherino dalle trebbie fino all'ottenimento di un liquido il più limpido possibile. Questa finalità viene raggiunta tramite un apposito tino contenente una griglia in acciaio inox sulla quale si deposita il letto filtrante; quest'ultimo è composto dalla stessa fase solida che accumulandosi attua la filtrazione della miscela che viene ricircolata nel tino al di sopra della griglia. Al termine della filtrazione il mosto limpido viene trasferito al successivo tino di bollitura mentre le trebbie sono risciacquate, tramite il processo di *Sparging*, con acqua calda alla temperatura di circa 70°C per favorire un'ulteriore estrazione delle sostanze zuccherine ancora contenute nella fase solida. Questa operazione cessa quando nel bollitore viene raggiunto il grado saccarometrico di progetto. La fase solida costituita dalle trebbie esauste (*Brewers' spent grain* o *BSG*) potrà essere quindi smaltita dal birrificio, configurandosi come un prodotto di scarto.

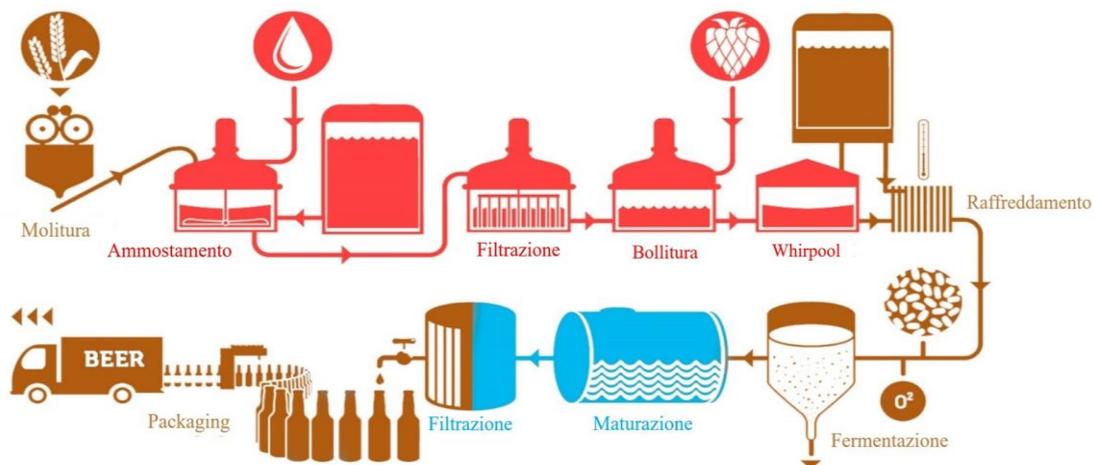


Figura 1.1.3 – Schema di un processo di produzione della birra modificato da <https://www.silvateam.it/prodotti-e-servizi/ingredienti-alimentari/tannini-la-produzione-di-birra.html>

1.1.6 Bollitura, luppolatura e Whirlpool

La bollitura permette il raggiungimento delle seguenti finalità:

- “Sterilizzazione” del mosto;
- Concentrazione del mosto a seguito della diluizione effettuata precedentemente tramite *Sparging*;
- Denaturazione a caldo delle proteine presenti con successiva precipitazione (chiarificazione del mosto);

- Promozione delle reazioni di *Maillard* volte all'aromatizzazione del mosto;
- Isomerizzazione degli alfa acidi contenuti nel luppolo in iso-alfa acidi, responsabili dell'amaricatura della birra.

Nella fase di bollitura è anche possibile caratterizzare il prodotto inserendo all'interno del tino di *boil* spezie, bucce di agrumi, ecc.

Conclusa questa fase appare nuovamente necessario rimuovere il particolato solido presente in sospensione (in primis particelle di luppolo e agglomerati proteici); per fare ciò si mette in rotazione il fluido (processo di *Whirlpool*) tramite un agitatore o una pompa esterna così da concentrare nel centro del tino le particelle solide.

1.1.7 Raffreddamento e Fermentazione

Il mosto limpido e sterile viene raffreddato fino alla temperatura di fermentazione e pompato nel fermentatore dove avverrà la trasformazione del mosto in birra. Qui, a seguito dell'inoculo con lievito *Saccharomyces carlsbergensis* o *Saccharomyces cerevisiae*, la sospensione verrà mantenuta in condizioni di temperatura, pH e pressione controllate per circa 10-15 giorni; tale procedura risulta necessaria per trasformare chimicamente le sostanze (tra cui zuccheri) presenti nel mosto in etanolo, CO₂ e sottoprodotti fermentativi in grado di caratterizzare il profilo organolettico del prodotto. Infine, la birra verrà affinata in appositi tini di maturazione o imbottigliata direttamente.

1.2 Brewers' spent grain

Le trebbie (BSG), come preannunciato, si configurano come il sottoprodotto più abbondante del processo di birrificazione. Solo in Italia vengono prodotte circa 300.000 tonnellate all'anno di BSG (Bianco et al., 2020) e di queste il 70% viene utilizzato nel settore zootecnico come mangime per animali, il 10% è impiegato nella produzione di biogas, mentre il restante 20% smaltito in discariche.

Una delle più grandi difficoltà relative al riutilizzo del BSG prodotto dai birrifici risiede nella sua conservabilità. Esso, infatti, risulta composto da molti nutrienti e sostanze zuccherine che lo rendono un ottimo terreno di crescita per molti microrganismi. In aggiunta a quanto appena detto, è necessario ricordare che il BSG contiene circa il 70% di acqua al suo interno. Questo elevato livello di umidità è fonte di due problematiche piuttosto rilevanti. In primo luogo, il trasporto di BSG umido dal birrificio di produzione risulta maggiormente costoso e difficoltoso (si predilige la fornitura ad allevatori locali impiegando il BSG come mangime); in secondo luogo, il quantitativo di acqua contenuta nelle trebbie promuove la crescita microbica provocandone un rapido deterioramento.

Un metodo valido, seppur costoso, per prolungare il tempo di conservazione del BSG è l'essiccamento post-produzione, raggiungendo un contenuto di umidità di circa il 10% (Lynch et al., 2016). Anche il congelamento a -20°C si configura come una valida alternativa.

1.2.1 Composizione

Il BSG è una matrice composta soprattutto da materiale lignocellulosico, porzioni fibrose (cellulosa ed emicellulosa), proteine e lignina (Figura 1.2.1). La fibra costituisce circa la metà in peso del BSG secco e all'interno di quest'ultimo si può avere fino al 30% di proteine. Chiaramente, queste caratteristiche rendono le trebbie una materia prima dalle elevate potenzialità in differenti campi di applicazione (Lynch et al., 2016).

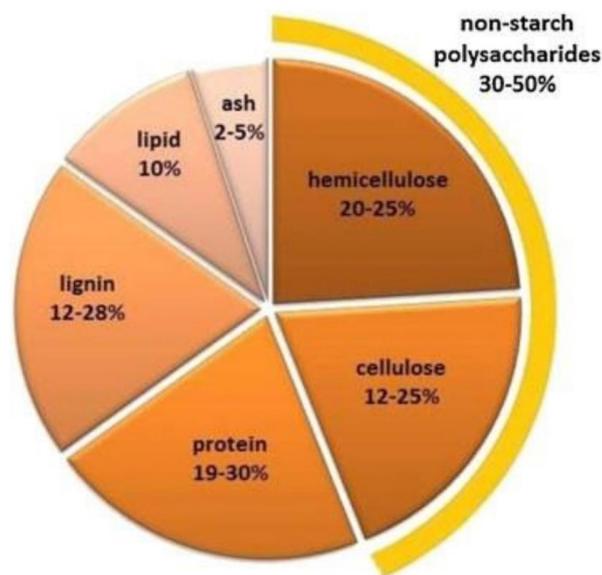


Figura 1.2.1 – Composizione standard di BSG derivante da malto d'orzo (Lynch et al., 2016)

Una classificazione più completa delle componenti che sostituiscono il BSG è riportata nella seguente Tabella 1.2.1

Tutti i valori sono espressi in g per 100g di materiale secco(%p/p); n.d., non determinato.

Componente	BSG n°1	BSG n°2	BSG n°3	BSG n°4	BSG n°5	BSG n°6	BSG n°7
Emicellulosa	21,8	n.d.	29,6	41,9	28,4	22,5	40
Cellulosa	25,4	n.d.	21,9	25,3	16,8	0,3	12,0
Proteine	24	31	24,6	n.d.	15,2	26,7	14,2
Lignina	11,9	16,0	21,7	16,9	27,8	n.d.	11,5
Cenere	2,4	4,0	1,2	4,6	4,6	3,3	3,3

Tabella 1.2.1 – Composizione chimica di BSG di diversa provenienza (indicati nella prima riga con numeri crescenti al fine di distinguerli tra loro) derivanti da malto d'orzo (Lynch et al., 2016)

L'emicellulosa è il componente presente in maggior quantità nel BSG (fino al 40% in peso secco); essa è costituita principalmente dal polisaccaride arabinosilano (AX) caratterizzato da residui di xilosio β -(1,4) legati a residui di arabinosio. Tra i monosaccaridi più abbondanti si annoverano xilosio, glucosio e arabinosio, mentre galattosio e ramnosio sono presenti solamente in tracce. Un'altra componente del BSG è certamente la lignina (10-28% in peso secco): essa si configura come una macromolecola polifenolica caratterizzata da una struttura complessa. La funzione principale della lignina è quella di conferire rigidità strutturale e robustezza alle pareti cellulari delle piante. Questo composto è formato da tre monomeri (*l'alcool p-cumarilico*, *l'alcool coniferico* e *l'alcool sinapilico*) legati tra loro mediante reazioni di condensazione (Lynch et al., 2016).

Il contenuto proteico del BSG varia notevolmente in base alla strategia adoperata nel processo di ammostamento: l'attivazione prolungata delle proteasi porta a ridurre il quantitativo di proteine presenti sia nel mosto, sia nelle trebbie. Di solito circa il 20% in peso di BSG secco è costituito da proteine, ripartite tra ordeine, gluteine, globuline e albumine. Un terzo del contenuto proteico totale è rappresentato da amminoacidi essenziali, prima fra tutti la lisina (14,3%) (Lynch et al., 2016). In ultima analisi, nelle trebbie sono presenti anche alcuni minerali quali calcio, magnesio, fosforo, silicio e zinco (Mussatto et al., 2006). Questi ultimi, derivanti principalmente dal malto d'orzo e dall'acqua adoperata nel processo di birrificazione, risultano fondamentali qualora il BSG venisse impiegato come terreno di coltura per microrganismi.

Osservando la *Tabella 1.2.1* appare evidente come il BSG mostra caratteristiche differenti in termini di composizione chimica. Queste derivano soprattutto dalla varietà di orzo utilizzata, dall'annata di produzione e da processi e tecnologie di maltazione e birrificazione impiegati.

1.2.2 Possibili applicazioni del BSG

Malgrado le trebbie siano il sottoprodotto presente in maggior quantità a seguito del processo di produzione della birra, il loro valore commerciale risulta piuttosto basso e spesso si configurano addirittura come un costo aggiuntivo per il birrifico che si trova a doverlo smaltire. In seguito, vengono riportate alcune delle possibili applicazioni che fanno uso del BSG come materia prima, in quanto la sua composizione chimica, come espresso nel paragrafo precedente, è piuttosto variegata e ricca di componenti utili per svariate applicazioni.

1.2.3 Nutrizione animale e umana

Grazie al suo contenuto elevato di fibre e proteine, il BSG trova ampiamente utilizzo nel settore zootecnico come mangime per animali; questo, infatti, può essere prelevato dal birrifico ancora umido e utilizzato tal quale, senza la necessità di sottoporlo a processi (di solito costosi) per prolungarne la conservazione. Per questa finalità spesso il BSG viene abbinato a composti azotati poco costosi, come l'urea, in modo da garantire

l'adeguata somministrazione di tutti gli amminoacidi essenziali. Un enorme vantaggio dell'integrazione del BSG nella dieta di bovini risiede nella sua capacità di stimolare maggiormente la produzione di latte, aumentando le rese e i quantitativi di solidi e grasso presenti nel latte stesso (Mussatto et al., 2006). Pertanto, non è difficile intuire come questo sia il principale utilizzo delle trebbie nel settore dell'allevamento animale; inoltre, grazie alla presenza di fibre e proteine, il BSG può essere facilmente integrato nella dieta di altri animali, quali suini, pollame e pesci.

I grani esausti, derivanti dal processo di birrificazione, sono abitualmente addizionati anche ad alcuni prodotti da forno destinati al consumo umano, come pane integrale, biscotti e barrette. Il vantaggio principale di aggiungere BSG nella preparazione dei suddetti prodotti risiede nell'apporto proteico che le trebbie sono in grado di garantire. Queste di solito, a causa delle dimensioni dei grani, devono essere triturate e impiegate sotto forma di farine. Tuttavia, esistono anche alcuni svantaggi nell'utilizzo del BSG per la fabbricazione di prodotti da forno, primo fra tutti la sua colorazione bruna, poco adatta per la preparazione di alimenti di colore chiaro (Mussatto et al., 2006).

1.2.4 Produzione di energia

In quanto materiale organico, il BSG può trovare impiego anche nella produzione di energia. Ad oggi, esistono due vie principali attraverso cui esso viene utilizzato: combustione diretta e fermentazione anaerobica per produrre biogas, una miscela composta in gran parte da metano, anidride carbonica e piccoli quantitativi di idrogeno, azoto e monossido di carbonio (Ezeonu & Okaka, 1996).

Il processo di combustione necessita di un essiccamento preliminare delle trebbie, ma questo non è l'unico svantaggio; la problematica principale, infatti, risiede nell'emissione durante la combustione di NO_x e di SO_2 , entrambi gas caratterizzati da una certa tossicità (Mussatto et al., 2006).

La seconda via, la digestione anaerobica, è certamente più complicata e si suddivide in due fasi: una prima idrolitica, seguita da una metanogenica. Nella prima fase, microrganismi idrolitici attuano l'idrolisi del materiale fibroso, caratterizzante il BSG, in macromolecole più semplici; queste saranno successivamente convertite da microrganismi acidogenici in acidi grassi volatili, acetato, butirrato e propionato. Nella seconda fase (quella metanogenica), saranno proprio gli acidi organici volatili ad essere convertiti in metano ad opera dei microrganismi metanigeni. L'efficienza operativa di un digestore funzionante con questa metodologia si attesta a circa il 25-30% (Ezeonu & Okaka, 1996). La combustione e la generazione di biogas tramite digestione anaerobica potrebbero essere impiegate per sopperire al fabbisogno energetico dello stesso birrifico produttore di BSG, il quale potrebbe trarre un vantaggio economico non trascurabile, abbattendo i costi di gestione relativi all'impianto di produzione della birra (Mussatto et al., 2006).

1.2.5 Produzione di mattoni da costruzione e carta

Grazie alle sue caratteristiche fibrose date dalla presenza di cellulosa, emicellulosa e lignina e dal basso quantitativo di ceneri, il BSG potrebbe essere impiegato nella produzione di mattoni destinati al settore dell'edilizia. Esso, infatti, sarebbe in grado di sostituire la segatura introdotta generalmente per aumentare la porosità dei mattoni; inoltre, questa aggiunta non causerebbe una variazione rilevante nel processo produttivo e nelle apparecchiature utilizzate per la produzione dei mattoni stessi (Russ et al., 2005). Le trebbie possono anche essere utilizzate come materia prima nell'industria cartaria grazie al quantitativo elevato di cellulosa e fibre che le caratterizzano (Mussatto et al., 2006).

1.2.6 Applicazioni biotecnologiche

Appena prodotto, il BSG presenta generalmente un livello di contaminazione microbica piuttosto basso (circa 10^2 - 10^3 CFU/g) a causa del processo di ammostamento precedentemente effettuato; quest'ultimo, infatti, è caratterizzato da rampe di temperatura che culminano a valori prossimi a 80°C, configurandosi come una vera e propria pastorizzazione. Tuttavia, lasciando riposare le trebbie per alcuni giorni e attendendone il raffreddamento fino alla temperatura di 20°C circa, si osserva un aumento non indifferente del quantitativo di microrganismi cresciuti sulla matrice (10^6 CFU/g dopo soli 4-5 giorni) (Bianco et al., 2020). Osservando questo comportamento, risulta evidente come il BSG sia un ottimo substrato per la crescita microbica, poiché ricco di molti polisaccaridi, proteine e oligoelementi. Da qui nasce l'idea di impiegarlo come terreno di coltura per la crescita selettiva di lieviti, funghi e batteri volti alla produzione di metaboliti di interesse.

A tal proposito, il BSG può essere adoperato per lo sviluppo di specie quali *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus pentosus* e *Lactobacillus rhamnosus* con la finalità di produrre acido lattico tramite processi biotecnologici, anziché di sintesi (Bianco et al., 2020). Un'altra applicazione di interesse industriale è la produzione di bioetanolo e biobutanolo tramite fermentazione con batteri appartenenti al genere *Clostridium* aventi BSG come principale terreno di coltura (Plaza et al., 2017).

Per quanto concerne la crescita fungina, è stato dimostrato che alcune specie appartenenti ai generi *Pleurotus*, *Agrocybe* e *Lentinus* sono in grado di svilupparsi molto rapidamente se inoculate su un terreno a base di BSG. In particolar modo, ad apportare beneficio alla coltura non sono solamente gli elevati contenuti di zuccheri e proteine, bensì anche l'alto quantitativo di umidità e le proprietà fisiche come la dimensione dei grani, la porosità e la capacità di trattene l'acqua (Mussatto et al., 2006).

Le trebbie, proprio come le crusche appartenenti a cereali di simile composizione, sono anche impiegabili come substrato per la produzione di enzimi commerciali. Un esempio di tale applicazione è certamente la produzione di *xilanasi* da parte di *Aspergillus awamori* o *Streptomyces avermitilis* (Mussatto et al., 2006).

In ultima analisi, di particolare valore sono le produzioni biotecnologiche di pigmenti di origine naturale. A questo proposito, *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula mucilaginosa*,

ceppi particolarmente indicati per la produzione di carotenoidi, sono in grado di crescere efficacemente su BSG tal quale e su sciroppi derivanti da esso (Casas-Godoy et al., 2020). Quest'ultima strategia fermentativa, a valle di sperimentazioni di laboratorio, verrà approfondita in dettaglio nel presente elaborato.

1.3 *Rhodotorula mucilaginosa*

La scoperta della prima specie appartenente al genere *Rhodotorula* risale al 1928, quando venne individuata da Harrison. Oggi si conoscono ben 34 specie che differiscono tra loro principalmente per quanto concerne l'assimilazione di sostanze nutritive, la tipologia dei pigmenti prodotti e la loro morfologia. *Rhodotorula mucilaginosa* è un lievito estremamente diffuso nell'ambiente che ci circonda. È stato ritrovato all'interno di differenti alimenti, quali pollame, pesce e formaggi; infatti, *Rhodotorula* è in grado di crescere efficacemente sulle superfici di piante e animali. Questo lievito non gode della capacità di effettuare fermentazioni, in quanto caratterizzato da un metabolismo aerobico (Cutzu, 2013).

Il riconoscimento di una coltura di *Rhodotorula* risulta piuttosto agevole grazie alla caratteristica colorazione arancione; questa è il risultato dell'azione dei pigmenti (carotenoidi) che il lievito è in grado di produrre se esposto a radiazioni con lunghezze d'onda definite (620-750 nm) che potrebbero danneggiare le cellule, compromettendone la vitalità (Pozo et al., 2018).

I pigmenti prodotti da *R. mucilaginosa* in queste circostanze sono principalmente tre: β -carotene, torulene e torularodina. È stato osservato che questi ultimi, essendo metaboliti



Figura 1.3.1 – Coltura di *R. mucilaginosa* su piastra di Petri

<https://en.wikipedia.org/wiki/Rhodotorula>



Figura 1.3.2 – *R. mucilaginosa* visionata tramite SEM

<https://www.sciencephoto.com/media/800038/view/fungus-rhodotorula-mucilaginosa-sem>

secondari, vengono a prodursi durante la tarda fase esponenziale per poi accumularsi per tutta la durata della fase stazionaria caratteristica della crescita cellulare (El-Banna et al., 2012). A causa di questa peculiarità, *R. mucilaginosa* e *R. glutinis* sono piuttosto studiate per la produzione biotecnologica di carotenoidi, oggi ottenuti principalmente tramite estrazione da fonti vegetali o mediante via sintetica (certamente più ottimizzata). Inoltre, entrambe le specie hanno attirato l'attenzione per la capacità di produrre rapidamente grandi quantità di biomassa, nonché per la produzione di enzimi.

Rhodotorula, fino a qualche decennio fa, era considerato un lievito non patogeno; tuttavia, recentemente, alcune specie appartenenti a questo genere di lievito sono state inserite all'interno della categoria dei patogeni emergenti e potrebbero risultare dannose soprattutto per pazienti con sistema immunitario non perfettamente funzionante; tale classificazione non riguarda la specie presa in esame nella presente sperimentazione (Miceli et al., 2011).

1.4 Carotenoidi

Tra i pigmenti presenti in natura, sicuramente i carotenoidi si configurano come la classe più nota e diffusa. Essi sono i principali fattori delle colorazioni gialla, rossa e arancione di molti vegetali e animali. Tra gli organismi sopra citati, solamente alcuni sono in grado di sintetizzarli autonomamente; infatti, questi ultimi possiedono nel loro patrimonio le sequenze geniche codificanti gli enzimi relativi alla via carotenogena. Gli altri esseri viventi, privi di questa caratteristica, necessitano di introdurli attraverso l'alimentazione. La tonalità della colorazione esibita è causata dalla combinazione di diversi carotenoidi, ad oggi quelli conosciuti superano i 750 (Igreja et al., 2021).

Il mercato mondiale di questi pigmenti nel 2017 ammontava a circa 1,5 miliardi di dollari, con una previsione di crescita nel 2022 che avrebbe portato a 2,0 miliardi di dollari. Il più noto, nonché consumato, è sicuramente il β -carotene (Figura 1.4.1) (precursore della vitamina A e antiossidante), il quale nel 2018 è stato prodotto con un valore di mercato di ben 334 milioni di dollari (Rodrigues et al., 2019).

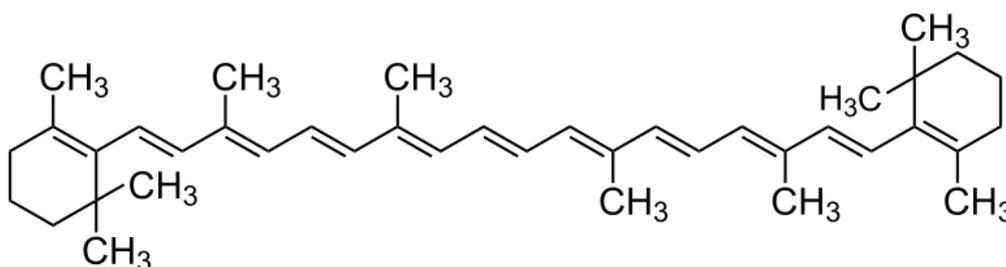


Figura 1.4.1 – Formula di struttura del β -carotene
<https://it.wikibooks.org/wiki/File:Beta-carotene.svg>

1.4.1 Composizione e caratteristiche chimiche

I carotenoidi presentano dal punto di vista chimico una catena costituita da 40 atomi di carbonio, caratterizzata da doppi legami coniugati che possono fungere da siti reattivi per l'aggiunta di gruppi. Le principali differenze tra i pigmenti sono imputabili alle modifiche che coinvolgono questa struttura; fra le principali si annoverano reazioni di ciclizzazione alle estremità, ossidazioni, aggiunta di gruppi funzionali e idrogenazioni. I carotenoidi si dividono in due gruppi: i caroteni, costituiti dalla sola catena idrocarburica (contenente carbonio e idrogeno) e le xantofille, aventi almeno un atomo di ossigeno all'interno della struttura (Figura 1.4.2 e Figura 1.4.3) (Igreja et al., 2021). La nomenclatura, secondo la Commission on Biochemical Nomenclature, permette di identificare queste molecole in relazione ai loro gruppi terminali tramite l'utilizzo delle lettere greche β , γ , ϵ , χ , ϕ ecc. seguite dal sostantivo "carotene".

Poiché costituiti dalla lunga catena carboniosa, i carotenoidi sono tipicamente lipofili e vengono portati in soluzione (ad esempio durante i processi di estrazione) da solventi organici come acetone, dimetilsolfossido (DMSO), etere etilico, cloroformio, etilacetato, esano e toluene.

I doppi legami sono responsabili della disposizione spaziale della molecola, nonché della sua reattività e della capacità di assorbire le radiazioni luminose in corrispondenza di lunghezze d'onda definite (400-500 nm). Poiché sono le insaturazioni coniugate a costituire la porzione cromofora delle molecole, i carotenoidi assorbono a lunghezze d'onda crescenti in base al numero di doppi legami coniugati che possiedono. Inoltre, al fine di esibire una colorazione percepibile, le strutture molecolari devono essere costituite da almeno sette insaturazioni.

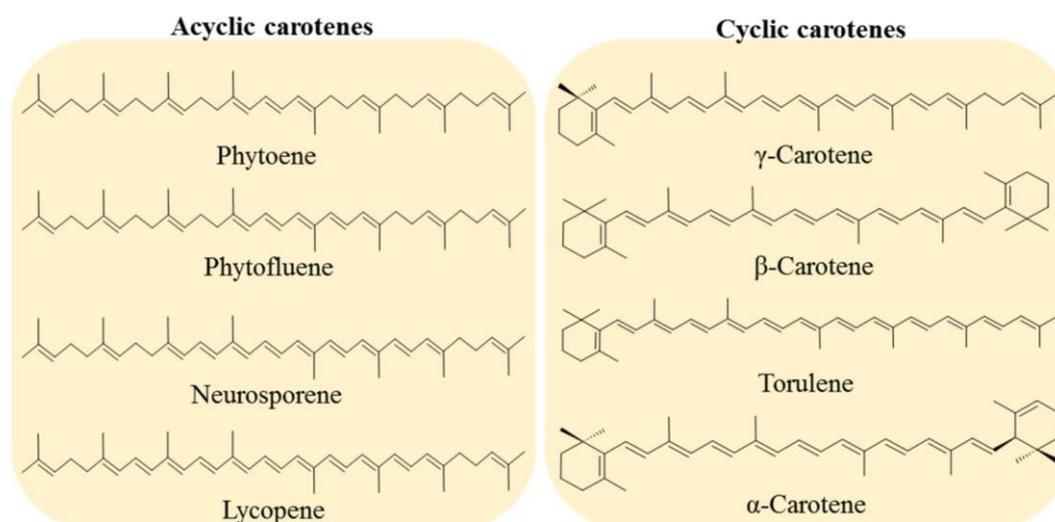


Figura 1.4.2 – Esempi di caroteni alifatici (sinistra) e ciclici (destra). (Igreja et al., 2021)

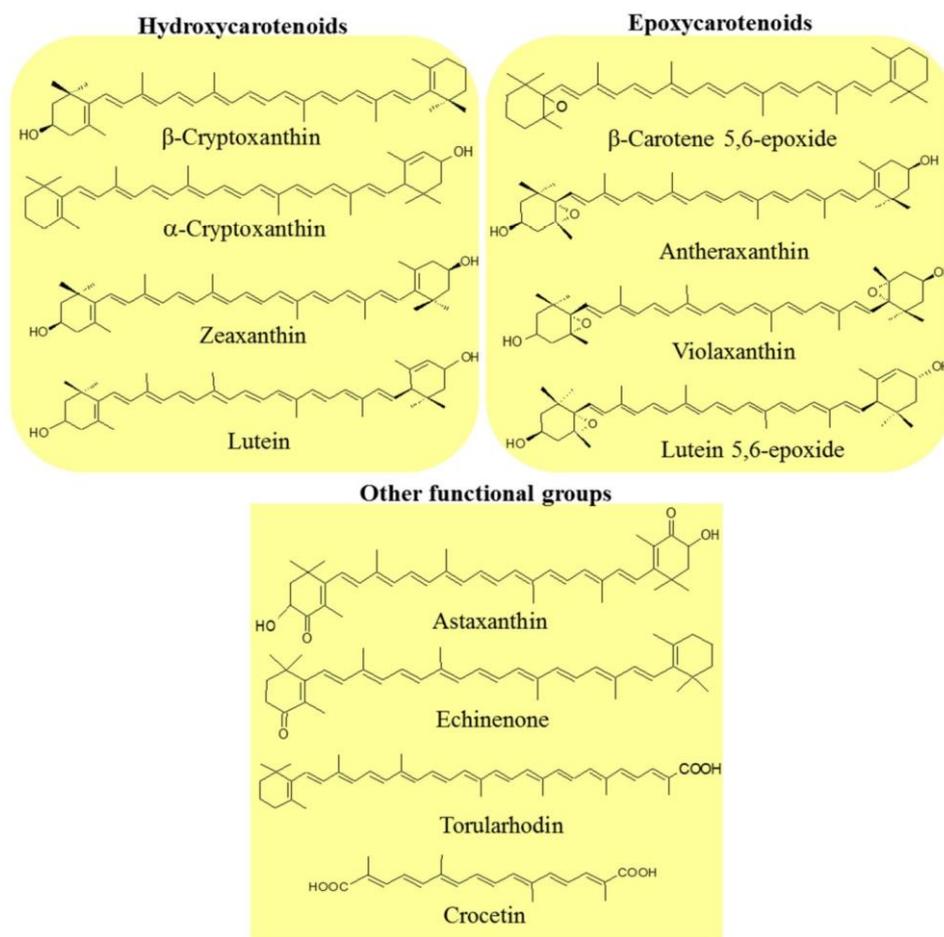


Figura 1.4.3 – In alto sono riportati esempi di caroteni alifatici (a sinistra) e ciclici (a destra); in basso sono rappresentati esempi di xantofille con i relativi gruppi funzionali. (Igreja et al., 2021)

1.4.2 Produzione di carotenoidi

Attualmente i principali metodi di ottenimento dei carotenoidi sono i seguenti: sintesi chimica, estrazione da matrici vegetali e produzione tramite processi biotecnologici.

1.4.3 Sintesi chimica

A partire dalla metà del 1900, alcune aziende chimiche, prime fra tutte Roche e BASF, hanno iniziato a produrre industrialmente il β -carotene originato dal medesimo composto: il β -ionone, un tempo sintetizzato a partire dall'olio di citronella, oggi ricavato dall'acetone o dal butadiene.

Attualmente il processo più utilizzato per produrre carotenoidi simmetrici è quello introdotto dalla BASF basato sulla reazione di Wittig. Quest'ultima è utilizzata in sintesi organica per sostituire un gruppo carbonilico con uno alchenico; nello specifico, si

favorisce la reazione di condensazione tra i sali di fosfonio, precedentemente derivatizzati con trifenilfosfina, e un'aldeide con la finalità di generare un doppio legame e allungare così la catena polienica. Questo metodo viene iterato fino al raggiungimento della lunghezza di catena opportuno (Ribeiro et al., 2011).

Al giorno d'oggi il β -carotene di sintesi viene prodotto principalmente dalla DSM, BASF, Roche e Merk.

1.4.4 Estrazione da matrici vegetali

Fino al 1950, data in cui vennero introdotti i metodi di sintesi chimica del β -carotene, i carotenoidi venivano estratti da fonti vegetali (ad esempio dalle carote). L'estrazione tramite l'utilizzo di solventi organici polari, quali acetone, esano, etilacetato, etanolo ed etil-lattato, consente il raggiungimento di purezze dell'estratto piuttosto elevate (Ribeiro et al., 2011); tuttavia, tale processo estrattivo è caratterizzato da molti svantaggi, primo fra tutti la stagionalità della materia prima; seguito dalla necessità di utilizzare grandi quantitativi di materiale vegetale, non sempre disponibile.

1.4.5 Processi biotecnologici

Certamente, negli ultimi decenni, le biotecnologie hanno acquisito sempre maggior terreno nella produzione di componenti dall'elevato valore aggiunto grazie alle tecnologie di cui si servono. Anche la produzione di carotenoidi non fa eccezione e la possibilità di produrli tramite colture di microrganismi ha destato molto interesse. Infatti, tali pigmenti possono essere sintetizzati naturalmente sia da microrganismi fotosintetici come alghe e cianobatteri, sia da funghi e lieviti (Ribeiro et al., 2011).

Tra le alghe, la più nota ed efficiente nella produzione di carotenoidi è *Dunaliella*; si tratta di una microalga alotollerante in grado di accumulare grandi quantità di β -carotene nei cloroplasti.

Per quanto riguarda i lieviti, essi godono di particolare interesse grazie alla capacità di crescere su substrati a basso costo; tra questi si annoverano *Phaffia rhodozyme*, *Sporobolomyces*, *Rhodospiridium* e *Rhodotorula*. Sarà proprio quest'ultima a possedere un ruolo da protagonista all'interno della presente sperimentazione.

In particolare, sono molti i processi (ad oggi su scala di laboratorio) riportati in letteratura riguardanti la produzione di carotenoidi ad opera di lieviti appartenenti al genere *Rhodotorula*. A titolo di esempio, Cheng e Yang (2016) hanno effettuato una coltura di *R. mucilaginosa* a partire da scarti di tipo agroindustriale (principalmente melasse derivanti da canna da zucchero). Il processo fermentativo è stato condotto in beute da 250 mL, mantenute in agitazione a 120 rpm, valutando l'influenza di temperatura, pH iniziale e aggiunta di sali sulla crescita e produzione di carotenoidi. Una volta ottimizzati i parametri di coltura (25°C, pH iniziale di 5,5 e addizione di 0,1 g/L di $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), è stata effettuata un'estrazione dei carotenoidi ottenendo una resa di 2500 μg per litro di coltura. Un'altra sperimentazione simile, portata avanti tramite l'utilizzo di scarti agricoli (quali acqua di macerazione del granturco, melassa di canna da zucchero e glicerolo) e

basata sulla realizzazione di una coltura di *R. mucilaginosa* in beute da 500 mL, è stata effettuata da Rodrigues et al. (2019). Il processo *batch* (svolto a 25°C con un'agitazione di 150 rpm), a seguito dell'estrazione dei carotenoidi dalla biomassa, ha permesso di raggiungere una resa pari a 1248,5 µg di carotenoidi totali per litro di coltura.

In ultimo, El-Banna et al. (2012), al fine di produrre carotenoidi, hanno realizzato un processo biotecnologico basato sulla fermentazione in beuta del lievito *R. glutinis* a partire da un *medium* complesso. L'obiettivo della ricerca è la determinazione dei parametri chimico-fisici (temperatura, pH iniziale, concentrazione salina, rapporto C/N) in grado di massimizzare la produzione di carotenoidi. L'estrazione di questi ultimi, realizzata tramite solventi organici, ha portato a rese comprese tra 890 e 2810 µg/L, in base alle condizioni di processo impiegate.

Di fondamentale importanza sono i meccanismi metabolici alla base della produzione dei carotenoidi e la loro conoscenza può portare all'ottimizzazione dei processi biotecnologici in cui tali pigmenti sono coinvolti, migliorandone le rese. I carotenoidi rientrano nella categoria dei terpeni; pertanto, la loro sintesi ha inizio con la formazione della catena isoprenica. Prendendo in considerazione la via carotenogenica del lievito (*Figura 1.4.4*), il precursore è l'acido mevalonico (MVA), ottenuto a partire da 3 molecole di Acetil-CoA attraverso la via metabolica del mevalonato. Quest'ultimo, subendo una reazione di fosforilazione, si trasforma in mevalonil pirofosfato, per poi reagire nuovamente convertendosi in D₃-isopentenilpirofosfato (IPP). A questo punto, attraverso la via di biosintesi isoprenica, IPP reagisce chimicamente tramite complesse reazioni enzimatiche in sequenza producendo il geranyl-geranyl pirofosfato (GGPP);

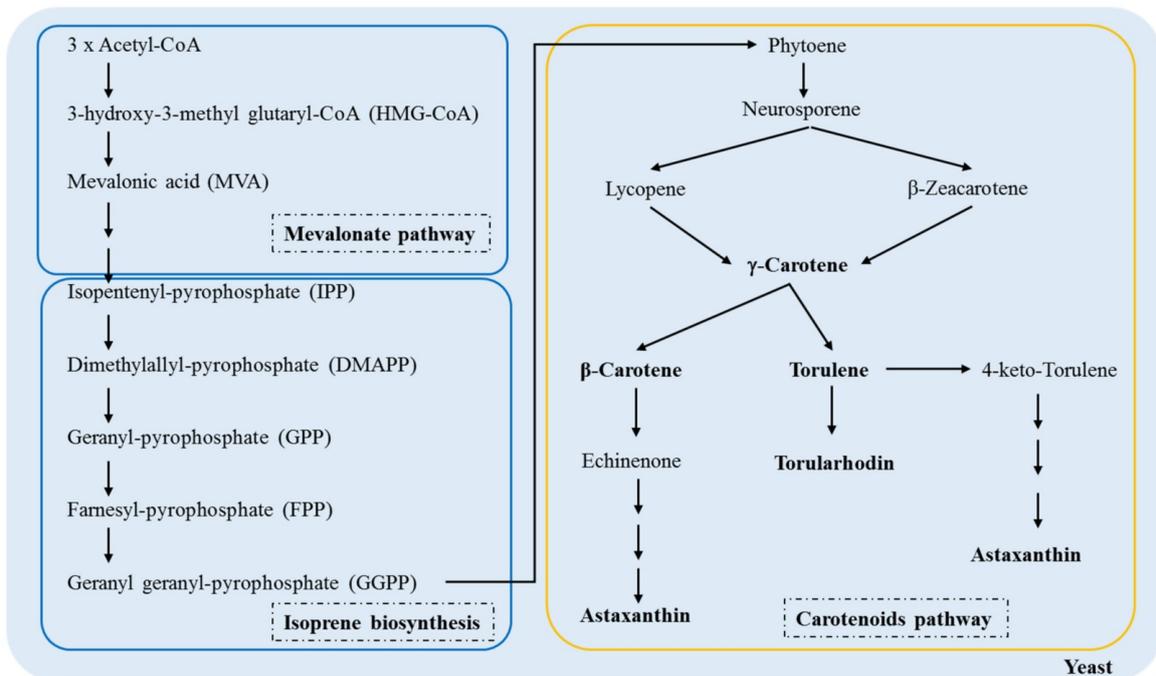


Figura 1.4.4 – Cammino biosintetico per la produzione di carotenoidi in lievito. (Igreja et al., 2021)

la condensazione di due molecole di GGPP porta alla formazione del fitoene, un composto incolore costituito da 40 atomi di carbonio e 3 insaturazioni. Il fitoene, subendo alcune reazioni di deidrogenazione, si trasforma in fitofluene, neurosporene e licopene, il quale presenta undici doppi legami coniugati. Il licopene è precursore di alcuni carotenoidi ciclici; pertanto, la sua ciclizzazione porta alla produzione di γ -carotene, β -carotene, torulene e torularodina (Igreja et al., 2021).

1.4.6 Funzionalità e applicazioni dei carotenoidi

In natura i carotenoidi vengono prodotti dagli esseri viventi per ottemperare a svariate funzioni. Essi, all'interno degli organismi fotosintetici (ad esempio piante e microalghe), ricoprono alcuni ruoli fondamentali quali: (i) *scavenging* di specie reattive dell'ossigeno e di altri radicali liberi; (ii) pigmenti accessori per la fotosintesi clorofilliana in grado di proteggere l'apparato fotosintetico dalle radiazioni luminose in eccesso; (iii) precursori della sintesi dell'acido abscissico, componente di rilevante importanza nella fisiologia delle piante.

Per quanto riguarda gli organismi non fotosintetici, i carotenoidi esercitano un'azione antiossidante nei confronti di specie particolarmente reattive dell'ossigeno e fungono da precursori per la produzione di vitamine (Cutzu, 2013).

Il mercato dei carotenoidi è piuttosto fiorente; ciò è imputabile alle molte funzionalità che essi svolgono migliorando perfino la salute umana come: (i) azione fotoprotettiva contro i raggi UV; (ii) capacità di difendere l'organismo da malattie croniche e degenerative; (iii) proprietà antinfiammatorie; (iv) integratori alimentari. Inoltre, i carotenoidi sono abitualmente impiegati nel campo dei cosmetici, come conservanti, oppure all'interno delle creme solari e nell'industria alimentare (coloranti e antiossidanti) (Cutzu, 2013).

Tutte queste applicazioni fanno sì che i carotenoidi trovino un posto ben consolidato e redditizio all'interno del settore nutraceutico e nel mercato globale.

1.5 Scopo del lavoro

L'obiettivo della presente tesi di laurea è la valorizzazione delle trebbie (BSG), originate come sottoprodotto nel processo di produzione della birra, generando composti dall'elevato valore aggiunto: i carotenoidi. Per perseguire questa finalità risulta necessario sfruttare l'azione di un lievito, *Rhodotorula mucilaginosa* (isolato nel laboratorio biotecnologico del Politecnico di Torino), identificato con il ceppo *CBS316*, operando fermentazioni allo stato liquido.

Nello specifico, inizialmente è stata condotta una caratterizzazione di BSG (ottenuti da processi di produzione differenti) grazie alla quale è stato possibile effettuare un confronto, stabilendo quali tra le trebbie disponibili fossero maggiormente indicate per produrre un estratto su cui coltivare *Rhodotorula*. La scelta è ricaduta su un BSG autoprodotta. Successivamente, a partire da quest'ultimo, si è realizzato un estratto che, in un secondo momento, è stato inoculato con il lievito. Al termine delle fermentazioni si

è indagato un metodo efficace per estrarre i carotenoidi prodotti dalla biomassa, valutandone il quantitativo tramite spettrofotometria UV-Vis.

Gli scopi della tesi e delle sperimentazioni condotte sono molteplici:

- Individuare il miglior terreno di coltura (estratto liquido di BSG t.q. o addizionato di una fonte azotata) per favorire la crescita di *R. mucilaginosa* e la produzione di carotenoidi;
- Determinare i parametri chimici e fisici ottimali per la coltivazione del lievito (DOE);
- Effettuare lo *scale-up* del processo fermentativo: da piastre multiwell a 96 pozzetti si prosegue in beute (200 mL), terminando la sperimentazione in bioreattore (circa 3,5 L).
- Valutare il quantitativo di carotenoidi prodotti nelle diverse colture realizzate;
- Individuare quale tra alcuni dei protocolli di estrazione presenti in letteratura permette l'ottenimento del maggior quantitativo di carotenoidi;

Valorizzare gli scarti di produzione industriale ricopre un ruolo non solo etico, bensì porta anche a vantaggi di tipo economico; integrando i processi in un concetto più ampio di economia circolare è possibile ridurre gli sprechi e talvolta l'inquinamento ambientale connesso con la produzione di materie prime tradizionali. Pertanto, l'obiettivo principale di questo progetto consiste nel fornire un'idea di come il sottoprodotto preponderante di un'industria in continua crescita, il BSG, possa essere reimpiegato, attribuendogli una seconda vita più sostenibile.

2. Materiali e metodi

2.1 Informazioni preliminari e caratterizzazione del BSG

In questa sperimentazione si è utilizzato del BSG derivante da tre fonti differenti: una porzione delle trebbie esauste è stata gentilmente fornita dai birrifici artigianali Edit e Leumann situati rispettivamente a Torino e a Collegno (TO), mentre la restante parte è stata autoprodotta tramite un impianto di produzione semiprofessionale presentato in seguito con maggior dettaglio.

Tali BSG derivano dalla creazione di tre birre chiare: una Lager Hell denominata “Mia” e una Pilsener chiamata “Smemorata” prodotte rispettivamente dai birrifici artigianali Edit e Leumann, mentre le trebbie di autoproduzione, che in questo elaborato acquisiranno il nome di BSG “Forna” (in accordo con la nomenclatura utilizzata in fase di sperimentazione), fanno riferimento ad una birra chiara contenente frumento prodotta in data 22 aprile 2022.

Tutte e tre le trebbie sono state prelevate dal locale di produzione ancora calde, fatte raffreddare per qualche ora e successivamente congelate alla temperatura di -20°C per permetterne la conservazione ed evitare la proliferazione microbica. Nel paragrafo successivo verrà descritto in modo più approfondito il processo di ottenimento del BSG *Forna*, in quanto quest’ultimo, grazie alla sua facilità di reperimento, risulta essere il più utilizzato nel presente studio.

2.1.1 Impianto e ricetta di produzione del BSG *Forna*

Il BSG autoprodotta è stato originato in un impianto di produzione di birra semiprofessionale (*Figura 2.1.1*) realizzato con finalità puramente hobbistiche.

La sala cottura è composta da quattro tini da 300 L ciascuno, non coibentati, prodotti dall’azienda Polsinelli Enologia S.r.l., riscaldati con fiamma diretta e sostenuti da una struttura in ferro autonomamente costruita. La fase di ammostamento (*mash*) è gestita automaticamente tramite un microcontrollore in grado di ottimizzare le rampe di temperatura.

Il tino di *mash*, in acciaio inox AISI 304, è costituito da un agitatore (volto al miscelare la sospensione di acqua e grani) e dotato di una termoresistenza pt100 per misurare e conseguentemente mantenere la temperatura ai valori di *set-point* impostati tramite PC.

Conclusa la prima fase del processo, il trasferimento della massa al tino filtro avviene per gravità e il processo di filtrazione viene protratto fino a quando il mosto filtrato non presenta la corretta limpidezza; a questo punto, le trebbie sono lavate con circa 53 L di acqua calda a 70°C per favorire l’estrazione delle sostanze zuccherine ancora presenti all’interno di esse. Una volta portato a termine lo *Sparging*, il BSG è lasciato riposare, permettendo alla fase liquida ancora contenuta di separarsi per percolazione; quindi

raffreddato fino a temperatura ambiente ed infine porzionato e congelato a -20°C (*Figura 2.1.2*).

Il BSG *Forna* è stato prodotto a partire da una ricetta comprendente per il 70% malto Château Pilsener e per il restante 30% malto di frumento Château Wheat Blanc, macinati tramite mulino a martelli in fase di utilizzo.



Figura 2.1.1 – Sala cottura dell'impianto utilizzato per produrre il BSG *Forna*



Figura 2.1.2 – Rimozione del BSG *Forna* al termine del processo di *filtrazione e sparging*

2.1.2 Contenuto di umidità

Come prima caratterizzazione delle trebbie, di diversa provenienza, è stato valutato il contenuto di umidità presente all'interno di esse servendosi di un metodo gravimetrico. Piccoli quantitativi di BSG (circa 10 g) sono stati scongelati a temperatura ambiente e successivamente pesati utilizzando una bilancia di precisione *SCALTEC SBC 31*; in seguito, sono stati essiccati in stufa (modello *ISCO 9000*) per 24 ore alla temperatura di 105°C. Terminato questo periodo, i campioni privati del loro contenuto di acqua sono stati pesati nuovamente. Dalla sottrazione tra le masse umide (ricavate prima dell'essiccamento) e secche si determina il quantitativo di acqua relativo a ciascun campione di BSG; inoltre, eseguendo il rapporto $\frac{\text{massa acqua}}{\text{massa umida TOT}}$ e moltiplicandolo per cento si può determinare il valore percentuale identificativo della frazione di acqua rispetto alla massa totale scongelata. Questi risultati sono poi mediati aritmeticamente al fine di identificare un unico valore esplicativo per l'intero lotto di trebbie prodotte.

2.1.3 Valutazione di pH

Al fine di ottenere una completa caratterizzazione dei differenti BSG esaminati, è stata effettuata una misurazione del pH. Sono stati, dunque, scongelati a temperatura ambiente i tre campioni di BSG da 20 g ciascuno ed inseriti in becher contenenti 50 mL di tre solventi differenti: acqua, KCl 1M e CaCl₂ 0,01M. Le sospensioni così ottenute sono state messe in agitazione a 150 rpm per due ore (mediante agitatore magnetico IKA® C-MAG HS4) e successivamente filtrate con garza per separare le fasi solida e liquida. Quest'ultima è stata poi sottoposta a misura del pH, operata tramite il pH-metro inoLab® pH 730 con elettrodo manuale SenTix® 81.



Figura 2.1.3 – BSG Forna umida dopo scongelamento

2.2 *Caratterizzazione degli estratti di BSG*

Nell'ottica di voler condurre una fermentazione in fase liquida, risulta di fondamentale importanza effettuare uno studio preliminare sulle caratteristiche delle soluzioni ottenute a partire dalle trebbie. A tal proposito, per operare un confronto, è stato preparato un estratto per ciascun BSG considerato (*Edit, Leumann e Forna*).

2.2.1 *Estrazione*

Come prima operazione si scongela un piccolo quantitativo di trebbie lasciandolo a temperatura ambiente per qualche ora; quindi, si ripone in stufa a 60°C per 24 ore al fine di allontanare il volume di acqua in esse contenuto. Per la preparazione degli estratti, si procede aggiungendo 75 mL di acqua deionizzata a 4 g di BSG precedentemente essiccato (Piccolo, 2021). La sospensione così ottenuta viene messa in agitazione (150 rpm) per due ore, durante le quali parte dei componenti contenuti all'interno della fase solida vengono solubilizzati dal solvente acquoso. A valle di questo processo estrattivo, risulta necessario separare le due fasi coinvolte; per realizzare ciò si mette in atto una centrifugazione a 15000 rpm per 20 minuti, avendo cura di mantenere la temperatura degli estratti a 20 °C. Tale operazione viene realizzata servendosi di una centrifuga refrigerata ad alta velocità *Centrikon T-42 K*, la quale permette la sedimentazione di gran parte dei solidi sospesi; tuttavia, per aumentare ulteriormente la limpidezza del surnatante, è necessario operare una filtrazione con carta qualitativa, mentre il pellet viene essiccato in stufa a 60°C. Solo a seguito delle operazioni sopra citate è possibile ottenere un estratto qualitativamente accettabile su cui effettuare le misurazioni di pH, °Br e contenuto proteico.

2.2.2 *Valutazione di pH, °Br e contenuto proteico*

Una volta ottenuti gli estratti di BSG, sono state effettuate le misurazioni di pH (tramite il pH-metro inoLab® pH 730) e di °Br (determinazione espressa in Brix %, operata mediante il rifrattometro *ATAGO Pocket PALI*). I risultati ottenuti sono presentati nella sezione "*Analisi e discussione dei risultati*".

Per la valutazione del contenuto di proteine, è stata condotta una prova spettrofotometrica UV-Vis.

Tale tecnica si basa sulla capacità di alcune sostanze di interagire con le onde elettromagnetiche, assorbendone una porzione; nello specifico, più è elevato l'assorbimento della radiazione incidente sul campione e maggiore sarà la concentrazione dei composti indagati presenti all'interno di esso. Infatti, sulla base della tipologia dei legami chimici che costituiscono una molecola, questa presenterà solo determinati livelli energetici, assorbendo preferenzialmente la luce incidente in corrispondenza di lunghezze d'onda ben definite. Nel caso in esame, le proteine sono in grado di manifestare un picco di assorbimento marcato in corrispondenza di una lunghezza d'onda pari a 280 nm; ciò

avviene soprattutto grazie alla presenza di tre amminoacidi aromatici: tirosina, fenilalanina e triptofano.

La conduzione di una misura spettrofotometrica prevede anzitutto la lettura dell'assorbanza (in corrispondenza di una data lunghezza d'onda) relativa al solo solvente, privo delle molecole di interesse. Quest'azione, identificata con il nome di "bianco", permette di rimuovere dalla successiva misurazione spettrofotometrica del campione il "rumore" di fondo, ovvero l'assorbanza relativa a tutte quelle componenti presenti insieme a quella di interesse che potrebbe falsare la misura.

Per determinare l'assorbanza in corrispondenza di una lunghezza d'onda pari a 280 nm, si fa uso dello spettrofotometro *LAMBDA 465 UV/Vis PerkinElmer*. A seguito della lettura del bianco, realizzato con sola acqua deionizzata, si procede con l'immissione di 3 mL di estratto all'interno di un'apposita cuvette; quindi, si procede con la misurazione. Affinché si possa applicare la legge di Lambert Beer (una relazione empirica che correla l'assorbanza di un campione con la sua concentrazione), è importante diluire con il solvente specifico (acqua) la soluzione esaminata, in modo tale da misurare un'assorbanza (280 nm) rientrante nel campo di linearità della legge. Questo dettaglio risulta di fondamentale importanza al fine di confrontare, tramite una retta di taratura opportunamente realizzata, l'avvenuta misurazione di assorbanza con la concentrazione delle proteine presenti nel campione. Nel caso in esame, si è fatto uso di una retta di taratura costruita a partire da una soluzione contenente un mix di proteine commerciali ricavate dal siero di latte (prodotte da *Milei*).

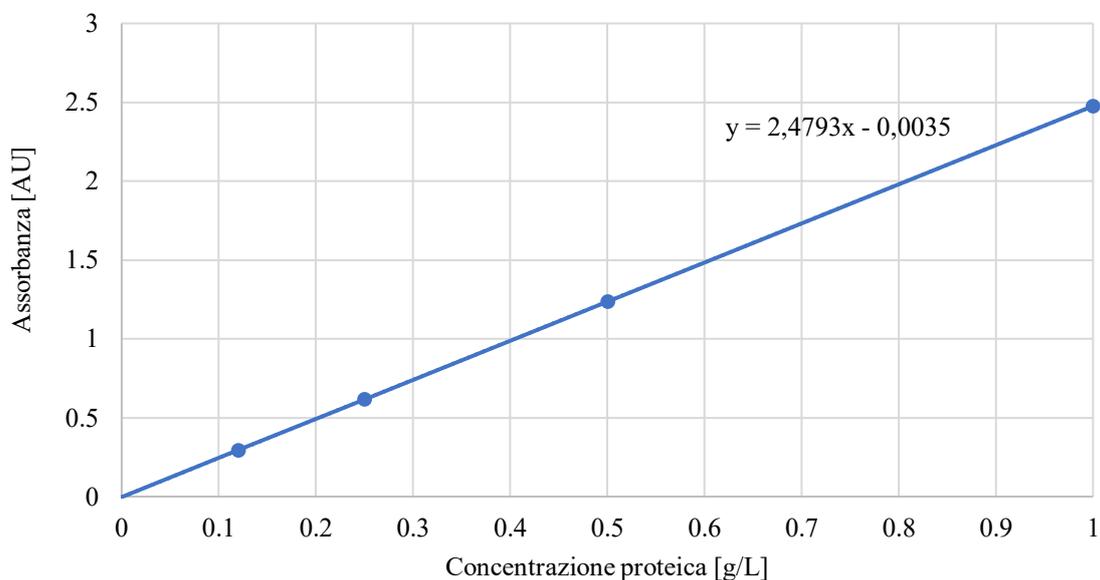


Figura 2.2.1 – Retta di taratura realizzata con una soluzione contenente un mix di proteine commerciali ricavate dal siero di latte (*Milei*) tramite lettura spettrofotometrica a 280 nm.

2.3 Coltura su piastre di Petri

Il lievito utilizzato nel presente lavoro di tesi è *R. mucilaginosa* CBS316, mantenuto a 4°C su terreno YM agarizzato (Figura 2.3.1 e Figura 2.3.2).

Tale lievito è testato sugli estratti di BSG (derivante dai birrifici *Edit* e *Leumann* e di autoproduzione) in terreno di coltura agarizzato (capsula di Petri) e liquido (multiwell, beuta e bioreattore), al fine di individuare quale tra questi sia più idoneo per la crescita della biomassa e la produzione di carotenoidi,



Figura 2.3.1 – *R. mucilaginosa* cresciuta su terreno YM osservata al microscopio ottico



Figura 2.3.2 – *R. mucilaginosa* coltivata su terreno YM in piastra di Petri dopo 72 ore dall'inoculo

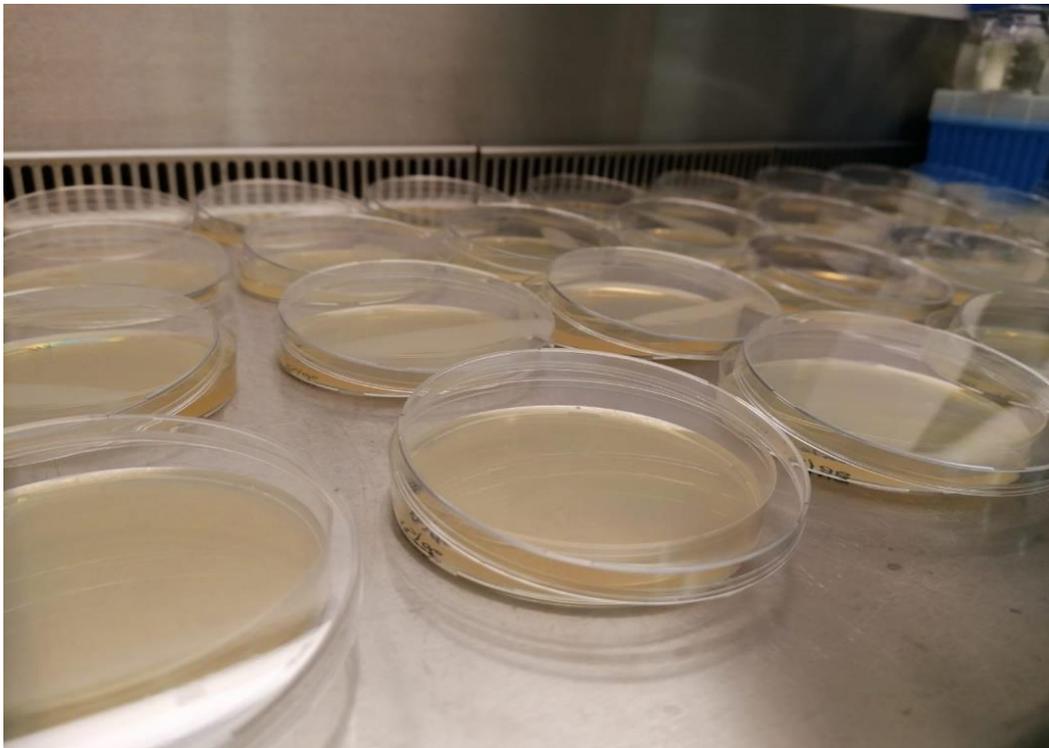


Figura 2.3.3 – Preparazione delle piastre di Petri composte da terreno YM agarizzato

La piastra - anche detta capsula - di Petri è stata ideata nel 1877 dal batteriologo Julius Richard Petri: essa consiste in un recipiente di forma circolare, tipicamente in materiale plastico o vetro, che offre come principale vantaggio la possibilità di osservare direttamente a occhio nudo una coltura microbica proliferante all'interno di essa.

La preparazione di una coltura su Petri è caratterizzata in primo luogo dalla formulazione di un adeguato terreno di coltura che, addizionato di agar, si configurerà come la fonte solida di substrati e sostanze nutritive di cui il lievito necessiterà per sopravvivere (*Figura 2.3.3*).

Nella presente sperimentazione sono stati realizzati quattro terreni differenti:

- Terreno YM;
- Estratto di BSG *Edit*;
- Estratto di BSG *Leumann*;
- Sciroppo di BSG *Forna*;

Il terreno YM (nome derivante all'acronimo degli estratti di lievito e di malto impiegati nella preparazione) è un terreno complesso creato abbinando 10 g/L di Glucosio (*Fluka* codice 49140), 5 g/L di Peptone (*Oxoid* codice LP0034), 3 g/L di estratto di lievito (*Oxoid* codice LP0021) e 3 g/L di estratto di malto (*Oxoid* codice LP0039). Questi nutrienti, disponibili sotto forma di polvere, sono miscelati con acqua deionizzata tramite un agitatore magnetico fino al loro completo scioglimento.

Gli estratti di BSG *Edit* e *Leumann* sono ottenuti con la medesima metodologia riportata al punto 2.2.1 (75 mL acqua/ 4 g BSG secca), pertanto verranno confrontati tra loro; invece, lo sciroppo di BSG *Forna* viene formulato in modo differente. Quest'ultimo risulta circa 4 volte più concentrato rispetto agli estratti *Edit* – *Leumann* e viene prodotto addizionando 75 mL di acqua Milli-Q a 12,9 g di BSG *Forna* essiccata in stufa a 60°C. L'agitazione desiderata (220 rpm) viene ottenuta attraverso il termostato *Thermo Scientific MaxQ™ 6000* dotato di shaker orbitale e in grado di mantenere la temperatura al valore di 24°C (temperatura ambiente) per tutta la durata dell'estrazione (2 ore). Per favorire la miscelazione, la sospensione viene introdotta in una beuta di vetro dotata di frangiflutti laterali, facilmente inseribile negli alloggiamenti del termostato. A causa del volume della beuta, per massimizzare la resa di estrazione è necessario operare con un quantitativo di sospensione maggiore rispetto a quello che verrà utilizzato (indicato in precedenza) pari a 242 mL di acqua con 50 g di BSG secca (il rapporto acqua/BSG rimane il medesimo). Una volta terminata l'estrazione, si è proceduto non la separazione delle fasi coinvolte. Ad una prima filtrazione con tessuto non tessuto (TNT) per separare grossolanamente la fase solida (*Figura 2.3.4*), è seguita una centrifugazione a 15000 rpm per 10 minuti (24°C) nella centrifuga refrigerata *Centrikon T-42 K*. Terminata l'operazione, si è proceduto con una seconda filtrazione mediante TNT che ha permesso il raggiungimento della limpidezza desiderata e l'ottenimento di circa 120 mL di sciroppo (*Figura 2.3.5*), da cui si è prelevata solamente la porzione utilizzata nella preparazione delle Petri. La fase solida rimossa a seguito della prima filtrazione (conservata a -20°C) viene utilizzata a sua volta, previo scongelamento, come terreno di crescita per il fungo *Phanerochaete*

chrysosporium, con la finalità di produrre enzimi. Questo obiettivo è perseguito in un'altra tesi di laurea magistrale; pertanto, non sarà approfondito nel presente elaborato. Tutti e quattro i terreni di coltura vengono addizionati di agar (20 g/L) e successivamente sterilizzati in autoclave a 121°C per 20 minuti.

Le piastre si preparano versando in ciascuna di esse circa 20 mL di terreno con una temperatura superiore a 25°C circa; infatti, una volta raffreddato, l'agar in esso contenuto espleterà la sua funzione gelificante. Per realizzare l'inoculo di *R. mucilaginosa* per gli estratti di BSG *Edit* e *Leumann* agarizzati sono state effettuate in precedenza tre precolture in beuta (costituite dai terreni YM, estratto di BSG *Edit* e *Leumann*), dalle quali, servendosi di una micropipetta *Eppendorf*, si sono prelevati 150 µL per l'inoculo di ciascuna piastra. Ognuna delle tre beute è stata riempita con 180 mL del rispettivo terreno di coltura e con 20 mL di inoculo di lievito ottenuto attraverso la procedura che verrà descritta nel paragrafo 2.5.2. Le tre beute sono state poi incubate a 25°C, mantenendo un'agitazione di 150 rpm, per 65 ore, al termine delle quali si sono prelevati i volumi per realizzare gli inoculi da depositare sulla superficie dei terreni agarizzati contenuti nelle Petri.

Per produrre l'inoculo della capsula avente come terreno di coltura lo sciroppo di BSG *Forna*, si è partiti da una Petri contenente *Rhodotorula*, cresciuta su YM. Agendo sotto la cappa aspirante a flusso laminare *Labogene SCANLAF MARS*, le cellule di lievito presenti sulla superficie della piastra sono state diluite con pochi millilitri di acqua precedentemente sterilizzata e risospese mediante l'utilizzo di un'ansa altrettanto sterile. Parte della sospensione così prodotta (150 µL) è stata poi prelevata tramite una micropipetta e iniettata sulla superficie della capsula da inoculare contenente lo sciroppo di BSG *Forna* agarizzato.

Le sei piastre di Petri realizzate prevedono molteplici combinazioni tra terreno impiegato e inoculo come presentato nella *Tabella 2.3.1*.

Le piastre così prodotte sono incubate in termostato alla temperatura di 25°C.

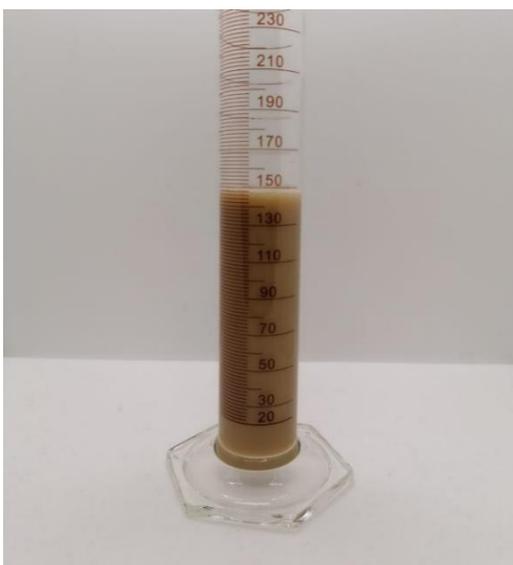


Figura 2.3.4 – Sciroppo di BSG *Forna* al termine della prima filtrazione su TNT

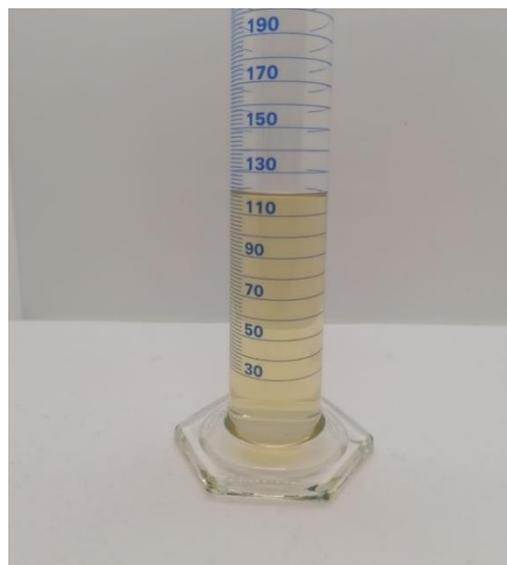


Figura 2.3.5 – Sciroppo di BSG *Forna* al termine della seconda centrifugazione

Terreno agarizzato	Inoculo con <i>R. mucilaginosa</i>
YM	Precoltura con YM
Estratto di BSG <i>Edit</i>	Precoltura con estratto di BSG <i>Edit</i>
	Precoltura con YM
Estratto di BSG <i>Leumann</i>	Precoltura con estratto di BSG <i>Leumann</i>
	Precoltura con YM
Sciroppo di BSG <i>Forna</i>	Inoculo da Petri con YM

Tabella 2.3.1 – Combinazione di terreni e inoculi impiegati nella preparazione delle sei piastre di Petri

2.4 Coltura in multiwell

Le piastre multiwell si configurano come un ottimo strumento di laboratorio per realizzare in contemporanea più colture, valutandone le differenze; tale applicazione è alla base del concetto di *Design of Experiment* (DOE). Esse, prodotte di solito con materiali plastici, sono caratterizzate da un numero variabile di pozzetti (6, 12, 24, 48, 96), ciascuno dei quali può ospitare potenzialmente una coltura microbica contrassegnata da differenti caratteristiche. Nel caso in esame sono state sempre impiegate multiwell da 96 pozzetti per ridurre drasticamente i tempi di sperimentazione.

2.4.1 Coltura su estratti di BSG *Edit* e *Leumann*

Il primo esperimento prevede che si preparino tre piastre multiwell, ciascuna delle quali è costituita da una sola tipologia di terreno di coltura (YM, estratto di BSG *Edit* o *Leumann*). L'obiettivo della presente prova è di comprendere quale tra i tre terreni permette la crescita cellulare più marcata. Ogni piastra, composta da 12 colonne e 8 righe,

viene suddivisa virtualmente in due parti come schematizzato nella *Figura 2.4.1*. I 32 pozzetti posizionati nel mezzo delle due fasi rimangono vuoti e hanno, in questo caso, lo scopo di limitare le possibili contaminazioni microbiche tra le due suddivisioni. L'introduzione della fase abiotica è necessaria al fine di effettuare il bianco durante le letture spettrofotometriche, nonché per poter comprendere, mediante confronto visivo con la fase biotica, l'evoluzione della coltura di lievito al procedere della fermentazione.

Fase abiotica con solo medium di coltura

Fase biotica (inocolata)

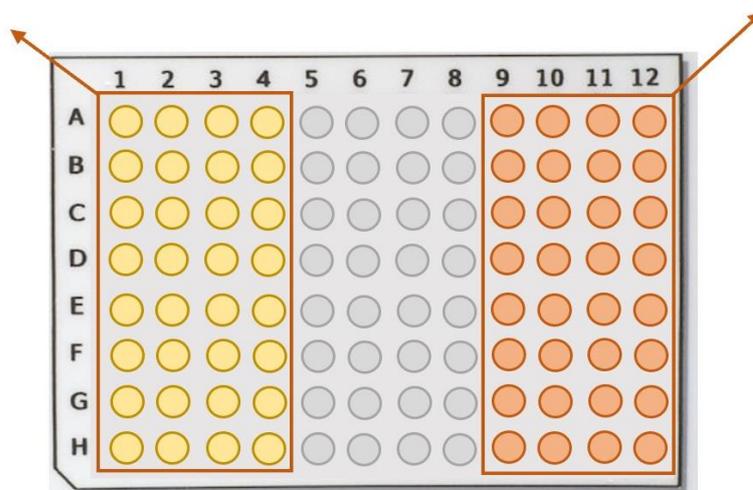


Figura 2.4.1 – Schema della multiwell contenente terreno di coltura tale quale (colonne sulla sinistra) e inocolato (colonne sulla destra)

Per cominciare, sono stati prodotti e sterilizzati in autoclave i tre terreni di coltura sopra citati seguendo le procedure riportate nei paragrafi 2.2.1 (produzione degli estratti di BSG) e 2.3 (formulazione del terreno YM); quindi, avendo cura di operare in sterilità sotto cappa microbiologica, sono stati versati in ciascun pozzetto destinato al riempimento 270 μ L di terreno. Questa procedura, messa in atto per ciascuna delle tre piastre, viene velocizzata tramite l'utilizzo della pipetta multicanale. Per preparare l'inoculo si sono prelevati tre campioni da colture liquide costituite da *Rhodotorula* cresciuta rispettivamente su terreno YM e su estratti di BSG *Edit* e *Leumann*. Questi, inseriti in tre provette *Falcon*, vengono analizzati allo spettrofotometro al fine di determinare la corretta percentuale di inoculo da introdurre nelle colture in multiwell. La misurazione spettrofotometrica ha il compito di misurare l'assorbanza della sospensione ad una lunghezza d'onda di 600 nm, in corrispondenza della quale le cellule microbiche manifestano un picco in relazione alla loro concentrazione (densità ottica). Anche in questo caso, per la realizzazione di un inoculo "standardizzato", si è proceduto diluendo i campioni fino a rientrare in un range di assorbanza compreso tra 0,8 e 1,0. Nello specifico, si sono effettuate diluizioni 1:20 per gli inoculi derivanti dalle colture di lievito cresciuto sugli estratti di BSG *Edit* e *Leumann*; mentre, per l'inoculo ottenuto dalla beuta

contenete il terreno YM in fermentazione è necessario diluire fino a 1:50 con l'opportuno *medium* di coltura. Una volta effettuate tali diluizioni, è possibile procedere inoculando le colture. Per ciascun pozzetto il volume di inoculo corrispondente è pari a 30 μL (un decimo del volume totale). Per compensare al minor volume presente nei pozzetti delle porzioni abiotiche (270 μL), si è proceduto con l'aggiunta di 30 μL dell'opportuno terreno di coltura.

Al termine del riempimento delle piastre, queste vengono inserite in termostato dove saranno mantenute in condizione di agitazione (150 rpm) alla temperatura di 25 °C per 190 ore (parametri ritenuti ottimali per favorire contemporaneamente la crescita cellulare e la produzione di carotenoidi) (Cheng & Yang, 2016).

Nel corso della prova, si sono effettuati campionamenti dalle tre piastre in corrispondenza di 20, 24, 45 e 190 ore, al fine di eseguire le misurazioni di pH, °Br (espressi come Brix %) e densità ottica (OD 600) i cui valori sono riportati nel paragrafo 3.4.1. Quest'ultima misura viene realizzata attraverso il lettore per multiwell *Thermo Scientific MULTISKAN Sky High*.

2.4.2 Coltura su sciroppi di BSG *Forna* - PROVA 1

In questa prova sperimentale vengono preparate due piastre multiwell, ciascuna costituita da 8 differenti terreni di coltura. Lo scopo della prova è la discriminazione tra più sciroppi, con diversa formulazione, derivanti da BSG *Forna*, individuandone uno, o più di uno, in grado di manifestare una produzione di biomassa e di carotenoidi più elevata rispetto agli altri. Nello specifico vengono effettuate 8 linee colturali, come presentato in *Figura 2.4.2*, delle quali 6 costituite da sciroppi di BSG tal quale o addizionati secondo le informazioni trovate in letteratura (Casas-Godoy et al., 2020). La disposizione dei terreni all'interno delle piastre e le aggiunte effettuate sono espresse in seguito:

- 1) Terreno sintetico (Casas-Godoy et al., 2020) (controllo);
- 2) Sciroppo di BSG *Forna* tal quale;
- 3) Sciroppo di BSG *Forna* addizionato di xilosio (xyl);
- 4) Sciroppo di BSG *Forna* addizionato di xilosio ed estratto di lievito (YE);
- 5) Sciroppo di BSG *Forna* addizionato di xilosio e NH_4Cl ;
- 6) Sciroppo di BSG *Forna* addizionato di xilosio, estratto di lievito e peptone (PEP);
- 7) Sciroppo di BSG *Forna* addizionato di xilosio, estratto di lievito, peptone e NH_4Cl ;
- 8) Terreno YM (controllo).

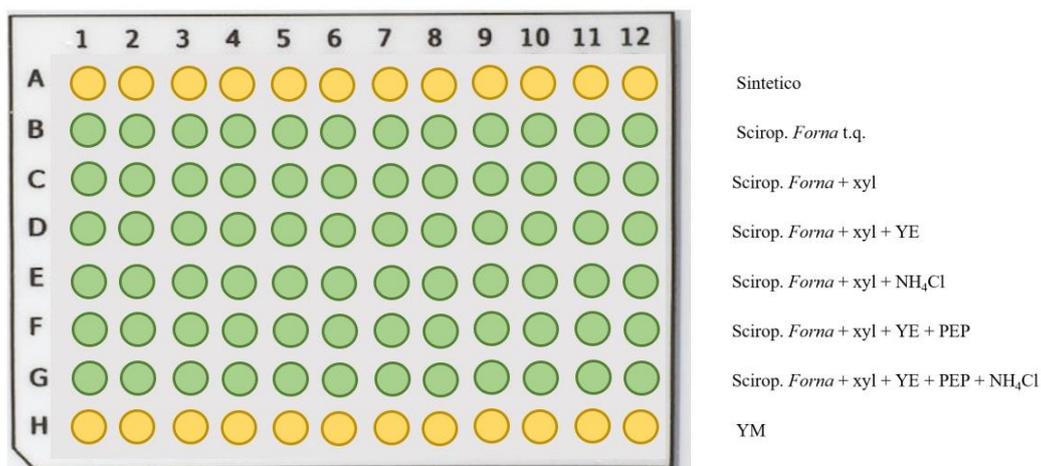


Figura 2.4.2 – Schema della multiwell contenente gli sciroppi di BSG (in verde) e i terreni (in giallo) sopra citati. Sulla destra si ricorda sinteticamente il contenuto di ogni riga adiacente

Lo sciroppo di BSG *Forna* impiegato nella prova viene prodotto seguendo la procedura proposta nel paragrafo 2.3 con una differenza: la prima centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti viene abolita poiché rivela di scarsa utilità ai fini della chiarificazione dell'estratto. Il terreno YM, utilizzato con la finalità di controllo, viene formulato secondo le indicazioni di Hernández-Almanza et al. (2014) come espresso nel medesimo paragrafo 2.3. In ultimo, il terreno sintetico (Casas-Godoy et al., 2020), anch'esso adoperato come controllo, è composto da 25 g/L di glucosio, 5 g/L di xilosio, 1,5 g/L di NH₄Cl, 2 g/L di estratto di lievito e 5 g/L di peptone. Lo xilosio, aggiunto in quest'ultimo terreno di coltura, ha il compito di simulare la composizione emicellulosica caratteristica del BSG. Esso viene anche addizionato agli sciroppi di BSG *Forna* per determinarne il contributo nella fermentazione condotta da *Rhodotorula*. Il cloruro d'ammonio è aggiunto per fornire un'ulteriore fonte azotata alla coltura che, per crescere rapidamente, necessita di un rapporto N/C elevato (Casas-Godoy et al., 2020). Inoltre, estratto di lievito e peptone, caratterizzati da una composizione piuttosto complessa, forniscono composti proteici azotati, oligoelementi e vitamine utili alla crescita del lievito.

Delle due multiwell realizzate, una costituisce la fase abiotica, caratterizzata dai soli terreni e sciroppi non inoculati; l'altra è composta dai medesimi *media* di coltura inoculati con *R. mucilaginosa* (fase biotica). La sterilizzazione dei terreni sintetico e YM avviene mediante autoclave (121°C per 20 minuti), mentre per gli sciroppi di BSG (realizzati tramite estrazione in shaker a 24°C) si opera una microfiltrazione a 0,2 µm sotto cappa servendosi di un apposito filtro per siringa (*Sartorius stedim Minisart*®).

Per la preparazione delle due multiwell, si è proceduto immettendo in un primo momento 270 µL di terreno o sciroppo di BSG in ciascun pozzetto delle piastre; quindi, è stato realizzato l'inoculo. Da una capsula di Petri, allestita con *Rhodotorula* cresciuta su sciroppo di BSG *Forna* agarizzato, si sono risospese le cellule di lievito, mediante

un'ansa sterile, previa diluizione con acqua precedentemente sterilizzata, per dare origine ad una sospensione concentrata (operazioni svolte sotto cappa aspirante a flusso laminare). Quest'ultima, opportunamente diluita, ha costituito gli inoculi (30 μ L ciascuno) che verranno introdotti all'interno dei 96 pozzetti della piastra biotica con un volume pari al 10% del volume totale di coltura. Nella multiwell abiotica, al fine di raggiungere i 300 μ L per pozzetto, ai già presenti 270 μ L di *medium* si sono addizionati 30 μ L di acqua Milli-Q sterile, la medesima impiegata nella realizzazione dell'inoculo. Terminata la procedura preparativa, le colture sono mantenute a 25°C con un'agitazione di 150 rpm. Durante la fermentazione (dopo 20, 48, 72 e 90 ore) si sono effettuati campionamenti per misurare i valori di pH, °Br (espressi come Brix %) e densità ottica (OD 600); in aggiunta a questi ultimi, dopo 72 ore, si sono determinati i valori di OD 457 e OD 490, in corrispondenza dei quali si individuano i picchi di assorbanza relativi rispettivamente al β -carotene e ai carotenoidi nel loro complesso (Cheng & Yang, 2016).

2.4.3 Coltura su sciroppi di BSG Forna - PROVA 2

In questa seconda prova in multiwell, si sono preparate 2 piastre inoculate, con i rispettivi controlli abiotici, per un totale di 4 multiwell. Similmente alla *PROVA 1* riportata nel paragrafo precedente, si sono effettuate 8 linee colturali (*Figura 2.4.3*), delle quali 5 costituite da sciroppi di BSG tal quale o addizionati secondo le informazioni esplicitate in letteratura (Casas-Godoy et al., 2020) e 3 composti da terreni di controllo. I componenti aggiunti agli sciroppi e la disposizione dei terreni all'interno delle piastre sono riportati nelle righe successive:

- 1) Terreno sintetico (Casas-Godoy et al., 2020) (controllo);
- 2) Terreno sintetico privato dello xilosio (controllo);
- 3) Sciroppo di BSG *Forna* tal quale;
- 4) Sciroppo di BSG *Forna* addizionato di estratto di lievito (YE);
- 5) Sciroppo di BSG *Forna* addizionato di NH₄Cl;
- 6) Sciroppo di BSG *Forna* addizionato di estratto di lievito e peptone (PEP);
- 7) Sciroppo di BSG *Forna* addizionato di estratto di lievito, peptone e NH₄Cl;
- 8) Terreno YM (controllo).

I terreni sintetico e YM sono formulati in modo analogo a quanto presentato nel paragrafo 2.4.2. Per quanto riguarda gli sciroppi ottenuti a partire da BSG *Forna*, in due delle quattro multiwell rimangono prodotti come indicato nella *PROVA 1* (in shaker a 24°C, 220 rpm per 2 ore), mentre nelle restanti due piastre si è attuata un'estrazione da BSG seguendo un protocollo di sterilizzazione in autoclave (121°C per 20 minuti). Le operazioni di separazione e chiarificazione dell'estratto a valle del processo termico rimangono i medesimi effettuati per l'ottenimento dello sciroppo di BSG attraverso shaker.

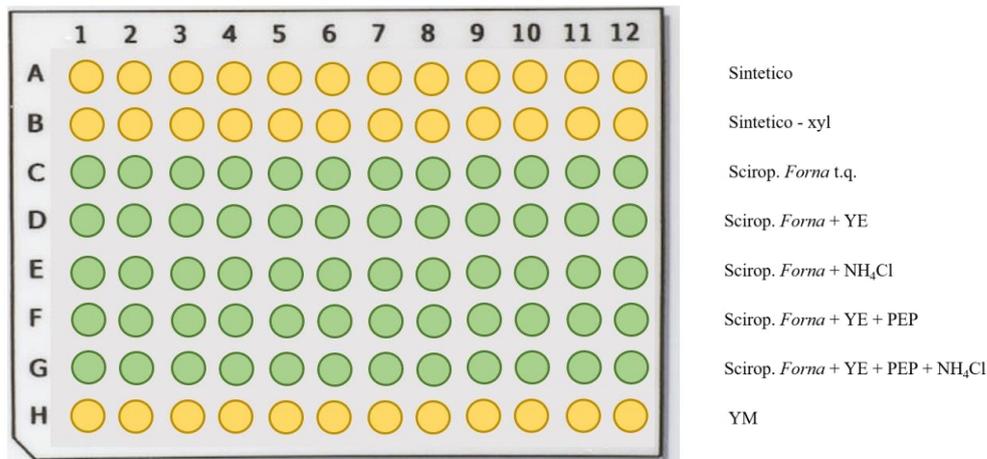


Figura 2.4.3 – Schema della multiwell contenente gli sciroppi di BSG (in verde) e i terreni (in giallo) sopra citati. Sulla destra si ricorda sinteticamente il contenuto di ogni riga adiacente

Gli obiettivi principali del presente esperimento sono due:

- Individuare quale delle due metodologie estrattive porta alla produzione di uno sciroppo in grado di favorire maggiormente la crescita di *R. mucilaginosa* e la produzione di carotenoidi;
- Determinare, a parità di estratto, le linee colturali più performanti circa la produzione di biomassa e di carotenoidi.

In questa seconda prova, lo xilosio viene rimosso da tutti gli sciroppi di BSG.

Questa volta la sterilizzazione di tali sciroppi, diversamente da quanto fatto nel paragrafo 2.4.2, viene effettuata in autoclave. Si nota che quelli ottenuti mediante estrazione in autoclave sono complessivamente sottoposti a due trattamenti termici.

Per la preparazione delle 4 multiwell, essendo la procedura e la metodologia impiegata analoghe a quanto espresso relativamente alla *PROVA 1*, si rimanda al paragrafo precedente 2.4.2.

Anche in questo caso le quattro colture sono mantenute alla temperatura di 25°C e agitate a 150 rpm per tutta la durata della prova (90h). Durante tale periodo (dopo 72 e 90 ore) sono effettuati campionamenti volti alle misurazioni di pH, °Br (espressi come Brix %), OD 600, OD 457 e OD 490 per seguire l'evoluzione della crescita di *Rhodotorula*, nonché la sua produzione di carotenoidi (risultati esplicitati nella sezione 3.4.3).

2.5 *Coltura in beuta*

2.5.1 *Coltura su terreno YM*

La prova di laboratorio qui presentata ha come finalità la realizzazione di una coltura di *R. mucilaginosa* su scala più ampia rispetto a quelle condotte in multiwell. L'obiettivo principale di questa sperimentazione su terreno YM è la costruzione di una curva di crescita, ricavata tramite il prelievo della biomassa a tempi di fermentazione crescenti.

Come prima operazione si sono preparati 1,5 L di terreno YM (formulazione analoga a quella espressa nel paragrafo 2.3) con cui si sono riempite sei beute da 500 mL dotate di frangiflutti laterali opportunamente distribuiti. Ogni beuta è costituita da 180 mL di terreno e 20 mL di inoculo (il 10% del volume di coltura totale); quest'ultimo viene realizzato a partire da una capsula di Petri, allestita con *Rhodotorula* cresciuta su YM agarizzato, seguendo la procedura riportata nel paragrafo 2.4.1. Al fine di coprire con i campionamenti tutta la durata delle fermentazioni e poter così realizzare una curva di crescita precisa, si è deciso di inoculare tre beute all'inizio della prova e le restanti tre dopo 15 ore. Tutte le sei colture sono mantenute in termostato in continua agitazione a 150 rpm alla temperatura di 25°C. Quasi ogni ora, dall'inizio delle fermentazioni, si sono effettuati campionamenti volti alla determinazione dei valori di pH, OD 600 e OD 490; inoltre, in aggiunta alla misurazione di densità ottica, per monitorare il quantitativo di biomassa prodotta nel corso del tempo si è effettuato il sacrificio di alcune colture; nello specifico, per raggiungere tale finalità, si sono interrotte le fermentazioni condotte all'interno delle sei beute dopo rispettivamente 21, 24, 40, 48 e 63 ore.

La procedura seguita per il prelievo della totalità del contenuto di ogni beuta è estrapolata da letteratura (Cheng & Yang, 2016) con alcune modifiche. Come prima operazione, la coltura viene versata in un cilindro graduato per misurarne il volume (diminuito a circa 180 mL a causa dei prelievi effettuati): questo dato è utile al fine di determinare la concentrazione della biomassa presente nel volume di ogni beuta; successivamente, avendo cura di distribuire la sospensione all'interno di alcuni provettoni da centrifuga da 80 mL ciascuno, si è proceduto con una centrifugazione (mediante la *Centrikon T-42 K*) a 8000 rpm per 10 minuti (4°C) per favorire la sedimentazione della biomassa. Una volta rimosso il surnatante, si è risospeso il pellet con acqua deionizzata per promuovere il lavaggio delle cellule e si è effettuato un nuovo ciclo di centrifugazione, a valle del quale si è rimosso il surnatante e si è pesato il pellet umido attraverso la bilancia di precisione *SCALTEC SBC 31*. Tutti i risultati ottenuti a cui si è fatto riferimento, nonché le curve di crescita di biomassa e di produzione dei carotenoidi, sono riportati nel relativo paragrafo 3.5.1.

2.5.2 Coltura su estratti di BSG Edit e Leumann

Si sono preparate tre colture, versando all'interno di tre beute da 500 mL (dotate di frangiflutti laterali) rispettivamente i due estratti derivanti da BSG *Edit* e *Leumann* e il terreno YM utilizzato come controllo. L'obiettivo di questa prova è confrontare qualitativamente e quantitativamente (tramite la pesata della biomassa prodotta) l'evoluzione delle due colture ottenute a partire dalle trebbie esauste, osservandone le differenze con quella cresciuta sul terreno ricco YM. La preparazione degli estratti di BSG e del *medium* di controllo è avvenuta applicando le sequenze di operazioni riportate rispettivamente nei paragrafi 2.2.1 e 2.3. In ciascuna delle tre beute adoperate si è inserito un volume di brodo pari a 180 mL (precedentemente sterilizzato in autoclave) al quale si aggiungono 20 mL di inoculo; per la realizzazione di quest'ultimo, al fine di evitare ripetizioni, si rimanda al paragrafo 2.5.1, in quanto la procedura impiegata risulta la medesima per entrambe le sperimentazioni. Infatti, anche in questo caso la diluizione della sospensione concentrata di cellule di lievito, ottenuta risospesando queste ultime da una Petri adeguatamente conservata, è effettuata con terreno YM. Le tre beute sono quindi inserite negli appositi alloggiamenti del termostato *Thermo Scientific MaxQ™ 6000*, dove sono rimaste in agitazione (150 rpm) alla temperatura di 25 °C per tutta la durata della fermentazione (65 ore), al termine della quale si è prelevata da esse la biomassa secondo la procedura esplicitata nel paragrafo 2.5.1.

È importante ricordare come, a causa dei ripetuti prelievi effettuati per realizzare gli inoculi per le prove su Petri e in multiwell (paragrafi 2.3 e 2.4.1), i volumi di coltura recuperati da ciascuna beuta si attestano a circa 150 mL.

2.5.3 Coltura su sciroppi di BSG Forna

Questa prova di laboratorio si configura come l'ultimo passo prima dello *scale-up* in bioreattore. Infatti, a seguito della sperimentazione in multiwell realizzata a partire da sciroppo di BSG *Forna* (paragrafo 2.4.3), si sono identificate quattro linee colturali particolarmente promettenti su cui effettuare gli studi della presente prova. A questo proposito, si realizzano due linee contenenti rispettivamente gli sciroppi di BSG tal quale e addizionato di estratto di lievito e peptone, prodotti a partire da un'estrazione di BSG *Forna* mediante shaker (24°C, 220 rpm per 2 ore) e due costituite da sciroppi di ugual formulazione, ottenuti tramite estrazione in autoclave (121°C per 20 minuti). Per ogni linea, inoltre, si è deciso di portare avanti quattro colture, al fine di monitorare nel tempo il quantitativo di biomassa prodotta da ciascuna di esse. Quindi, in totale si realizzano 16 colture in beuta come viene presentato schematicamente nella *Figura 2.5.1*.

Per realizzare quanto indicato, viene effettuata una precoltura in beuta su terreno YM; in particolare si sono allestite tre beute da 500 mL aventi al loro interno 180 mL di *medium* YM adeguatamente sterilizzato e 20 mL di inoculo; la loro preparazione è la medesima descritta nel paragrafo 2.5.1. Servendosi della curva di crescita di *Rhodotorula mucilaginosa* su terreno YM, raffigurata nella sezione 3.5.1, è stato possibile individuare

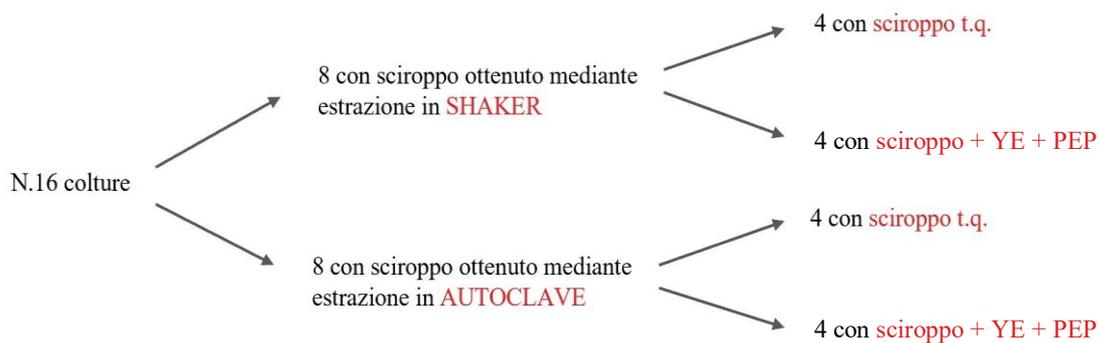


Figura 2.5.1 – Rappresentazione schematica della suddivisione complessiva delle colture in beute realizzate nella prova

l'istante di tempo più consono al fine di utilizzare tali precolture come inoculo per le 16 colture costituite dagli sciroppi di BSG. Il prelievo del contenuto delle tre beute con YM è stato realizzato dopo 15 ore dall'inizio della coltivazione, in modo da ricadere nella piena fase esponenziale della crescita del lievito. Questa sospensione cellulare molto concentrata viene diluita con gli opportuni sciroppi di BSG fino al raggiungimento della corretta concentrazione d'inoculo (assorbanza di quest'ultimo compresa tra 0,8 e 1,0); quindi, si è proceduto versando 20 mL dell'inoculo così preparato all'interno di ciascuna delle 16 beute precedentemente riempite con 180 mL di sciroppo di BSG *Forna* secondo quanto indicato nello schema rappresentato in precedenza.

Tutte e 16 le colture realizzate sono state poste in termostato contemporaneamente e mantenute a 25°C con un'agitazione di 150 rpm. Dopo 24, 48 e 72 ore si è sacrificata rispettivamente una beuta per ciascuna linea colturale, al fine di misurarne il quantitativo di biomassa generata (procedura analoga a quanto fatto nel paragrafo 2.5.1).

2.6 Coltura in bioreattore

Nell'ottica di trasferire un processo fermentativo dalla scala di laboratorio a quella industriale (*scale-up*), risulta di fondamentale importanza osservare il comportamento di tale coltura all'interno di un bioreattore. Quest'ultimo, seppur di dimensioni ridotte (6 L), presenta molte analogie fluidodinamiche e costruttive con i fermentatori dedicati alla produzione su larga scala. L'apparato in questione, realizzato dall'azienda svizzera *Bioengineering®* (modello *R'ALF*), si presenta come un reattore, costruito interamente in vetro borosilicato, chiuso superiormente con una copertura in acciaio inox sulla quale è ancorato l'agitatore. Il fermentatore è dotato di una camicia esterna, anch'essa in vetro, finalizzata alla circolazione dell'acqua di rete per il raffreddamento/riscaldamento del brodo di coltura, mentre il coperchio metallico appare costellato di aperture volte all'inserimento delle sonde per monitorare l'evoluzione della fermentazione. Tra queste ultime si annoverano principalmente il pH-metro (*METTLER TOLEDO®*) e un opportuno sensore di ossigeno disciolto. Il sistema di agitazione è costituito da due turbine Rushton

a sei pale calettate sull'albero ad una distanza facilmente variabile in base all'utilizzo. In ultimo, in prossimità dell'agitatore inferiore sono posizionati un tubo di prelievo campioni e lo *sparger*: un tubicino forato, modellato con forma circolare, dedicato all'aerazione del *medium*. Per favorire la miscelazione del mezzo liquido ci sono anche quattro frangiflutti disposti lungo il perimetro interno del reattore.

A corredo dell'apparato bioreattoristico, è presente un sistema di controllo PID dedicato al monitoraggio e al mantenimento dei parametri operativi (temperatura, pH, pO₂, agitazione e portata di alimentazione dell'agente antischiuma) ai valori di *set-point*.

In *Figura 2.6.1* è raffigurata l'apparecchiatura sopra descritta.



Figura 2.6.1 – Fotografia del bioreattore impiegato nella sperimentazione

Per la presente sperimentazione si è deciso di utilizzare come terreno di coltura lo sciroppo di BSG *Forna* ottenuto mediante estrazione in autoclave (121°C per 20 minuti); questa scelta deriva soprattutto dalla facilità di produrre tale *medium* in quantità maggiori rispetto alla realizzazione tramite estrazione in shaker (24°C, 220 rpm per 2 ore). Una volta formulato lo sciroppo, lo si versa all'interno del reattore con un volume pari al 90% di quello totale previsto per la coltura; il restante 10% sarà infatti costituito dall'inoculo. Per la preparazione di quest'ultimo, viene realizzata una precoltura in beuta su YM seguendo la procedura già descritta nel paragrafo precedente 2.5.3. A seguito dell'ottenimento di tale inoculo (adeguatamente diluito con il medesimo sciroppo di BSG *Forna*), si procede con il suo trasferimento all'interno del reattore precedentemente sterilizzato: operazione portata a termine mediante l'uso di una pompa peristaltica. Seguendo questa procedura preliminare sono state preparate due colture in fermentatore; queste si differenziano principalmente per le condizioni operative, adottate in ciascuna prova, riportate nella *Tabella 2.6.1* seguente.

Condizioni operative	PROVA 1	PROVA 2
Volume di coltura [L]	3,5	2,2
Temperatura [°C]	25	25
Agitazione [rpm]	150	125
Saturazione del <i>medium</i> con aria prima di inoculare il lievito	Assente	Presente
Portata iniziale di aria insufflata [L/h]	50	200

Tabella 2.6.1 – Principali condizioni operative adottate nelle due prove di coltura in bioreattore

Durante l'intera durata della coltura sono effettuati campionamenti volti alle misurazioni di pH, °Br (espressi come Brix %), OD 600, OD 457, OD 490 e peso secco di biomassa al fine di seguire l'evoluzione della crescita di *R. mucilaginosa*, nonché la sua produzione di carotenoidi (risultati e confronti tra le due prove esplicitati nella sezione 3.6).

2.7 Estrazione dei carotenoidi

Uno degli obiettivi principali del presente lavoro di tesi è la determinazione dei parametri chimico-fisici ottimali per la produzione di carotenoidi da parte del lievito *R. mucilaginosa*. A valle delle fermentazioni, per valutare il quantitativo di pigmenti prodotti, si è applicato il protocollo proposto da Cheng e Yang (2016) con alcune modifiche; al fine di massimizzare ulteriormente l'efficienza estrattiva, sono state effettuate tre prove descritte in seguito.

2.7.1 Estrazione da biomassa umida

A partire dalla biomassa recuperata nella prova in beuta con terreno YM è stato possibile effettuare un primo tentativo di estrazione. Tale biomassa, conservata a -20°C , viene inizialmente scongelata a temperatura ambiente; quindi, se ne è prelevato un quantitativo esiguo pari a 0,78 g (equivalenti a 0,1 g di biomassa secca) che viene inserito in una provetta *Falcon* in polipropilene. Queste masse sono scelte in accordo con quanto riportato in letteratura (Cheng & Yang, 2016). Poi, dato che i carotenoidi sono molecole tipicamente lipofile, solubili in solventi organici (paragrafo 1.4.1), si è proceduto con l'aggiunta all'interno della medesima provetta di 5 mL di acetone (*Fluka* codice 00570) in combinazione con 2 mL di dimetilsolfossido (DMSO), prodotto da *Riedel-de Haën* (codice 60153); questa operazione, per garantire la salute degli operatori, è svolta sotto la cappa chimica *TALASSI MA 95*. Al fine di uniformare la sospensione si è vortizzata la *Falcon* per alcuni secondi, dopodiché, la si è inserita all'interno di un bagnetto a ultrasuoni *Elmasonic S 60 H* con una frequenza di 60 KHz per 10 minuti. Terminata la procedura si è effettuato nuovamente un mescolamento della sospensione tramite vortex (30 s), a valle del quale quest'ultima è lasciata riposare per 10 minuti in posizione verticale. A questo punto, per separare le due fasi, si è attuata una centrifugazione per 10 minuti a 4100 rpm mediante la centrifuga *Thermo Scientific IEC CL30* e, terminata l'operazione, si è proceduto con il prelievo del surnatante che verrà in parte analizzato allo spettrofotometro e in parte conservato a 4°C in provette di vetro. Tale surnatante, a causa della presenza dei carotenoidi disciolti all'interno, si tinge di una colorazione rosa. Il pellet, al contrario, viene risospeso con la miscela di solventi prima citati e sottoposto nuovamente al protocollo di estrazione fin qui presentato, il quale verrà ripetuto, secondo indicazione di letteratura, fintanto che la biomassa non perderà la sua colorazione arancione/rosata, acquisendone una grigiastra. L'analisi condotta sul surnatante è basata sulla misurazione dell'assorbanza del campione liquido in corrispondenza di lunghezze d'onda pari a 457 e 490 nm. La prima è indicativa della concentrazione di β -carotene presente in soluzione, la seconda, invece, fa riferimento al quantitativo complessivo di carotenoidi senza distinguerne la tipologia. Si specifica come in questo caso il "bianco" sia stato realizzato con acetone e DMSO, nelle medesime proporzioni che costituiscono il campione, e come quest'ultimo, per l'analisi spettrofotometrica, sia stato inserito in apposite cuvette in vetro (resistenti al contatto con i solventi impiegati).

Per determinare la resa di carotenoidi estratti, si applica la seguente equazione (Cheng & Yang, 2016).

$$\text{Carotenoidi totali } [\mu\text{g/g di lievito}] = A_{max} \cdot D \cdot V / (E \cdot W)$$

Dove A_{max} è l'assorbanza dell'estratto a 490 nm, D il rapporto di diluizione del campione (pari a 1 essendo che non sono state effettuate diluizioni), V il volume in mL di solvente utilizzato (7 mL), E il coefficiente di estinzione molare relativo ai carotenoidi (0,16) e W peso secco in g del lievito (0,1 g).

I dati ottenuti attraverso la procedura qui presentata e i relativi calcoli sono descritti nel paragrafo 3.7.1.

2.7.2 Estrazione da biomassa secca

In questa sezione vengono descritti due metodi di estrazione effettuati a partire da biomassa cresciuta in beuta su terreno YM, essiccata in stufa e precedentemente congelata a -20°C. Entrambe le prove sono caratterizzate da una procedura di estrazione esattamente analoga a quella realizzata nel paragrafo precedente 2.7.1 a cui rimando. Esse differiscono unicamente nelle modalità di essiccamento: nella prima la biomassa scongelata rimane per 24 ore alla temperatura di 60°C, mentre nella seconda si opera a 35°C, mantenuti per 48 ore. Per permettere l'essiccamento, nel primo caso si sono travasati circa 3 g di biomassa umida all'interno di un becher in vetro da 5 mL, il quale verrà sistemato in stufa. Trascorse le 24 ore si è proceduto con il prelievo del corretto quantitativo (0,1 g) di biomassa secca inserendolo in una provetta *Falcon*, dando così inizio al primo ciclo di estrazione. Tuttavia, poiché la rimozione della biomassa dal becher risulta particolarmente difficoltosa (solo 0,1 g su 0,37 g si riescono a distaccare dalle superfici in vetro), si è deciso di istituire la seconda prova di essiccamento (35°C per 48 ore) al fine di verificare se tali condizioni possono influire positivamente sulla problematica riscontrata.

In entrambe le prove si effettuano tre cicli di estrazione, a valle di ognuno dei quali si praticano le misurazioni spettrofotometriche descritte nel paragrafo precedente.

Una volta individuato il protocollo estrattivo caratterizzato dal recupero maggiore, lo si applica alla biomassa generata in ciascuna fermentazione (facente uso di sciroppo di BSG *Forna* come terreno di coltura), al fine di comprendere quale tra queste risulta più idonea alla produzione di carotenoidi.

3. Analisi e discussione dei risultati

3.1 Caratterizzazione del BSG

In questo primo paragrafo, vengono presentati i risultati ottenuti dalle misurazioni atte alla caratterizzazione delle tre tipologie di BSG di cui si dispone nella sperimentazione. Come anticipato nel capitolo “*Materiali e metodi*”, come analisi preliminare è stato applicato un metodo gravimetrico, basato su pesate multiple di campioni di BSG prima e dopo dell’essiccamento in stufa (105 °C per 24 ore), per determinare il contenuto di umidità delle trebbie impiegate. Per ciascuna di esse si sono pesati cinque campioni al fine di ottenere un dato medio identificativo per l’intero lotto. Nella *Tabella 3.1.1* si mostrano i valori percentuali di acqua e solidi totali (complemento a cento del valore di umidità) contenuti in ciascun BSG.

% in peso	<i>Edit</i>	<i>Leumann</i>	<i>Forna</i>
Solidi totali	23,68 ± 0,78 %	23,82 ± 0,73 %	31,14 ± 0,42 %
Acqua	76,32 ± 0,78 %	76,18 ± 0,73 %	68,86 ± 0,42 %

Tabella 3.1.1 – Contenuto in percentuale di **solidi totali** e **acqua** all’interno dei BSG donati dai birrifici *Edit* e *Leumann* e del BSG di autoproduzione *Forna*

Si nota come i BSG derivanti da *Edit* e *Leumann* abbiano un contenuto di acqua maggiore rispetto a quello *Forna*; ciò è probabilmente imputabile al fatto che i primi due citati, essendo stati prodotti e conservati in laboratorio da più tempo, hanno subito più cicli di congelamento e scongelamento, i quali hanno contribuito ad una maggior rottura delle cellule vegetali delle trebbie promuovendone un conseguente rilascio di acqua. Certamente, anche il processo produttivo con cui il BSG è stato ottenuto gioca un ruolo fondamentale circa la sua capacità di assorbire l’acqua.

Per quanto concerne la misurazione del pH relativo a tre campioni (per ciascun BSG utilizzato) preparati con acqua distillata, KCl 1M e CaCl₂ 0,01M, si nota come tale valore di pH risulti lievemente inferiore rispetto a quello valutato nel caso dei solventi puri (*Tabella 3.1.2*), ad eccezione del campione contenente BSG *Edit* miscelato con la soluzione a base di CaCl₂ 0,01M, che esibisce un valore di pH pari a 5,82. Da queste considerazioni si può intuire che il BSG è mediamente caratterizzato da una leggera acidità.

Solvente	pH solvente puro	pH soluzione derivante da BSG		
		<i>Edit</i>	<i>Leumann</i>	<i>Forna</i>
H ₂ O	6,02 ± 0,12	5,67 ± 0,08	5,95 ± 0,06	5,90 ± 0,11
KCl 1M	6,45 ± 0,09	5,36 ± 0,08	6,34 ± 0,10	6,00 ± 0,08
CaCl ₂ 0,01M	5,33 ± 0,20	5,82 ± 0,09	5,24 ± 0,07	5,11 ± 0,13

Tabella 3.1.2 – Valori di **pH** relativi ai solventi puri e alle soluzioni con BSG derivante rispettivamente da *Edit*, *Leumann* e *Forna*

3.2 Caratterizzazione degli estratti di BSG (con acqua)

A seguito della caratterizzazione delle trebbie tal quali, si è deciso di produrre alcuni estratti in fase liquida (utilizzando acqua deionizzata come solvente) a partire da esse; infatti, saranno proprio questi ultimi, impiegati come terreno di coltura per la crescita di *Rhodotorula mucilaginosa*, a ricoprire un ruolo fondamentale all'interno della presente sperimentazione. La prima operazione da svolgere è la misurazione dei parametri principali (pH, °Br e contenuto proteico) che caratterizzano gli estratti realizzati; fare ciò risulta importante al fine di poter comprendere le peculiarità di questi ultimi ed effettuarne un confronto preliminare, individuando quale dei tre estratti (descritti nel paragrafo 2.2), ottenuti a partire dai BSG considerati, possa essere più adatto all'impiego come *medium* di coltura.

Dalla misurazione del pH, il cui risultato è espresso nella *Tabella 3.2.1*, è emerso come l'estratto con acqua, prodotto a partire da BSG *Edit*, sia caratterizzato dal valore più basso; ciò risulta in pieno accordo con quanto riportato nella *Tabella 3.1.2* in corrispondenza dell'utilizzo di acqua deionizzata come solvente. Per quanto concerne la misurazione dei °Br (in Brix %), è l'estratto di BSG *Leumann* a presentare il valore più elevato, affermandosi come il terreno di coltura più ricco di substrati carboniosi. A valle di questa prima analisi è importante notare che tutti e tre i BSG utilizzati portano ad estratti (solvente acqua) con caratteristiche simili tra loro; ciò permette di confermare la potenziale applicabilità di ciascuno di essi all'interno degli esperimenti.

	<i>Edit</i>	<i>Leumann</i>	<i>Forna</i>
pH	5,56 ± 0,08	5,69 ± 0,11	6,04 ± 0,15
Brix %	0,9	1,1	1,0

Tabella 3.2.1 – Valori di **pH** e **gradi Brix** relativi agli estratti di BSG derivanti rispettivamente da *Edit*, *Leumann* e *Forna*

Diversamente dai risultati espressi precedentemente, la concentrazione proteica relativa agli estratti realizzati risulta essere differente nei tre casi (Tabella 3.2.2). In particolare, mentre quelli derivanti da BSG *Edit* e *Leumann* esibiscono un contenuto di proteine molto simile tra loro (2,60 e 2,76 g/L), l'estratto ottenuto a partire dalle trebbie *Forna* ne possiede un quantitativo nettamente inferiore (circa 1,20 g/L). Tra le cause responsabili di tale disuguaglianza, la principale trova fondamento nelle materie prime utilizzate durante il processo produttivo delle trebbie. Il malto, infatti, in base alla tipologia, alla provenienza geografica dell'orzo, nonché alle tecniche di maltazione impiegate, può risultare piuttosto differente e portare con sé un quantitativo di proteine più o meno elevato. Inoltre, anche l'aggiunta di altri cereali nella ricetta di birrificazione può variare il contenuto proteico del BSG; ad esempio, l'aggiunta di frumento alla miscela di grani porta ad un incremento della quantità di proteine.

Come descritto nel paragrafo 2.2.2, i valori di concentrazione proteica (g/L) in seguito presentati sono stati ricavati a partire dalla valutazione dell'assorbanza (280 nm) degli estratti. Quest'ultima è stata poi correlata alla grandezza di interesse attraverso la retta di taratura di Figura 2.2.1.

	<i>Edit</i>	<i>Leumann</i>	<i>Forna</i>
Concentrazione proteica [g/L]	2,60 ± 0,24	2,76 ± 0,12	1,20 ± 0,28
Proteine estratte [mg/g _{BSG secca}]	38,93 ± 0,11	34,46 ± 0,21	19,26 ± 0,24

Tabella 3.2.2 – Valori di **contenuto proteico** per litro di estratto e di proteine ottenute per grammo di BSG secca impiegata relativi agli estratti di BSG derivanti rispettivamente da *Edit*, *Leumann* e *Forna*

3.3 Coltura su piastre di Petri

Come prima sperimentazione, è stato necessario verificare che il lievito *R. mucilaginosa* fosse in grado di crescere in maniera apprezzabile sugli estratti derivanti da BSG. Il modo migliore per definire ciò risulta nell'inoculare il lievito all'interno di piastre di Petri opportunamente preparate con i suddetti estratti agarizzati. In prima battuta, nelle Figure 3.3.1, 3.3.2, 3.3.3 sono mostrate le colture descritte nel paragrafo 2.3 costituite dal terreno YM (utilizzato come controllo) e dagli estratti di BSG *Edit* e *Leumann* inoculati con *R. mucilaginosa* cresciuta in beuta sui medesimi terreni. Il vantaggio principale di utilizzare questa metodologia di inoculo risiede nella capacità del lievito, presente all'interno di quest'ultimo, di essere già adattato alle caratteristiche del *medium*, diminuendo la durata della fase di latenza.

Oltre a voler confrontare la crescita di *R. mucilaginosa* su piastre contenenti un terreno solido di diversa tipologia, in questa prova si mira anche a valutare l'influenza della provenienza dell'inoculo; la motivazione di combinare le tipologie di terreno e di inoculi presentati sta nel voler realizzare un confronto qualitativo utile al comprendere se le capsule inoculate con *R. mucilaginosa* cresciuto su YM (terreno ricco) risultano

maggiormente colonizzate e colorate di arancione rispetto a quelle incolate con lievito proveniente da una precoltura con estratto di BSG.

Come si può notare dalle *Figure 3.3.1, 3.3.2 e 3.3.3*, la crescita cellulare è avvenuta su tutte le capsule di Petri; tuttavia, solamente quella contenente il terreno YM manifesta una colorazione aranciata (*Figura 3.3.1*), sintomo del fatto che su tale *medium R. mucilaginosa* è in grado di crescere e produrre un maggior quantitativo di carotenoidi (Hernández-Almanza et al., 2014). Parallelamente, limitandosi a questo approccio visivo, non si apprezzano particolari differenze tra le altre quattro piastre contenenti gli estratti di BSG *Edit e Leumann* (*Figure 3.3.2 e 3.3.3*).

Per quanto riguarda la coltura effettuata su sciroppo di BSG *Forna* (*Figura 3.3.4*), si nota come questa possieda una colorazione piuttosto marcata. Ciò è imputabile al fatto che tale sciroppo (descritto nel paragrafo 2.3) risulta circa quattro volte più concentrato rispetto agli estratti di BSG *Edit e Leumann*. Apparentemente, sembrerebbe che la colorazione aranciata relativa alla coltura di *Figura 3.3.4* sia più intensa di quella corrispondente al lievito cresciuto su terreno YM (*Figura 3.3.1*), seppur nella realtà entrambe le colture esibiscono un colore molto simile. Questo è dovuto al fatto che le due fotografie riportate sono state effettuate in due momenti diversi caratterizzati da una luminosità ambientale lievemente differente.

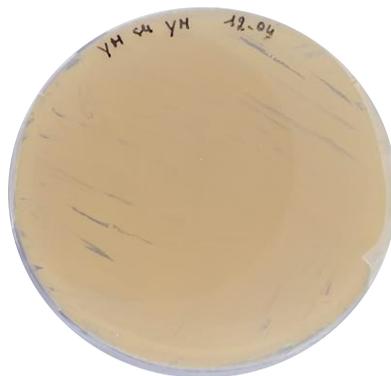


Figura 3.3.1 – Coltura di *R. mucilaginosa* su terreno solido YM



Figura 3.3.2 – Coltura di *R. mucilaginosa* su estratto di BSG *Edit* agarizzato; l'inoculo della piastra di sinistra è costituito da lievito cresciuto su estratto di BSG *Edit*, quello della piastra di destra deriva da lievito cresciuto su terreno YM

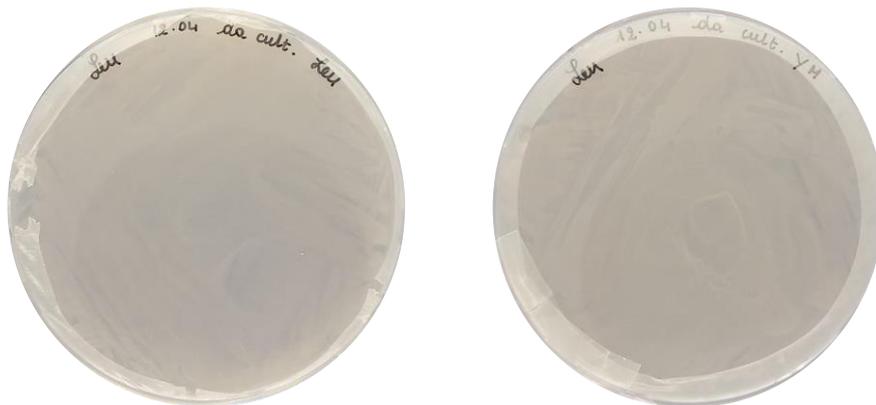


Figura 3.3.3 – Coltura di *R. mucilaginosa* su estratto di BSG *Leumann* agarizzato; l'inoculo della piastra di sinistra è costituito da lievito cresciuto su estratto di BSG *Leumann*, quello della piastra di destra deriva da lievito cresciuto su terreno YM



Figura 3.3.4 – Coltura di *R. mucilaginosa* su sciroppo di BSG *Forna*

È bene ricordare che la procedura di ottenimento dello sciroppo di BSG *Forna* utilizzato in questa fase della sperimentazione è stata ottimizzata nel tempo; infatti, in origine, dopo l'estrazione in shaker veniva effettuata una doppia centrifugazione: una prima a 3000 rpm per 10 minuti (operata tramite la centrifuga *Thermo Scientific IEC CL30*), seguita da una filtrazione con tessuto non tessuto (TNT) per separare grossolanamente la fase solida, e una seconda a 15000 rpm per 10 minuti (24°C) nella centrifuga refrigerata *Centrikon T-42 K*. Terminata l'operazione, analogamente a quanto descritto nella procedura del paragrafo 2.3, si prosegue con una seconda filtrazione mediante TNT.

Nel corso degli esperimenti, però, si è osservato che la prima centrifugazione non porta di fatto ad alcun miglioramento apprezzabile del grado di limpidezza dell'estratto; pertanto, a seguito di questa evidenza, si è deciso di abolire tale operazione, stabilendo così il protocollo di ottenimento dello sciroppo di BSG descritto nel paragrafo 2.3.

3.4 *Coltura in multiwell*

In questa sezione vengono presentati i risultati ottenuti durante le tre prove in multiwell descritte nel paragrafo 2.4; in particolare sono evidenziati i valori delle misurazioni di pH, °Br (espressi in Brix %) e densità ottica (OD 600) effettuate nel corso delle prove. Infatti, grazie ai dati raccolti, è possibile esaminare l'evoluzione delle singole colture nel tempo e confrontarne le caratteristiche.

3.4.1 *Coltura su estratti di BSG Edit e Leumann*

Come spiegato nel paragrafo 2.4.1, sono state realizzate in contemporanea tre piastre multiwell contenenti rispettivamente il terreno di coltura YM (controllo positivo) e gli estratti di BSG *Edit* e *Leumann*. Di seguito sono rappresentate le tre piastre riempite secondo la disposizione schematica presentata in *Figura 2.4.1 (a)*. Si ricorda che ciascuna piastra realizzata presenta nelle colonne di pozzetti sulla sinistra la fase abiotica e in quelle di destra la coltura inoculata.

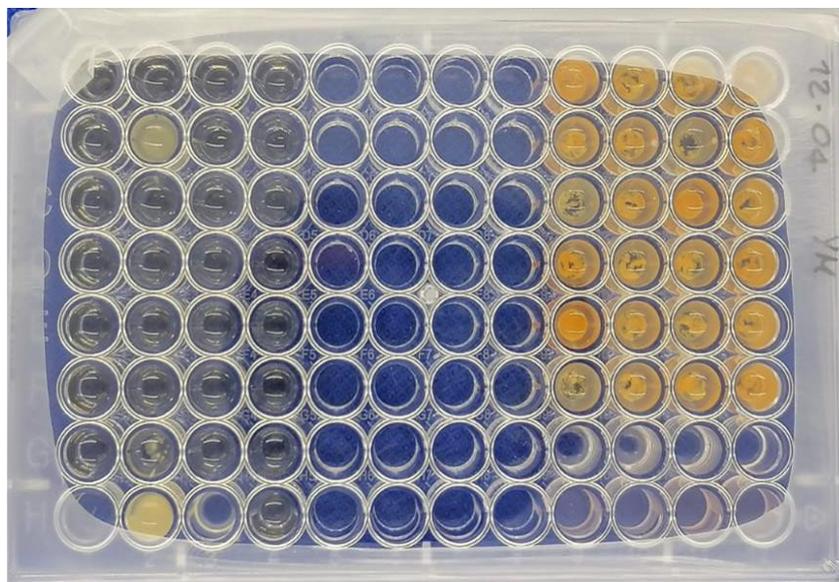


Figura 3.4.1 (a) – Coltura in multiwell contenente il terreno YM (controllo positivo) inoculato (colonne sulla destra) dopo 190 ore di fermentazione

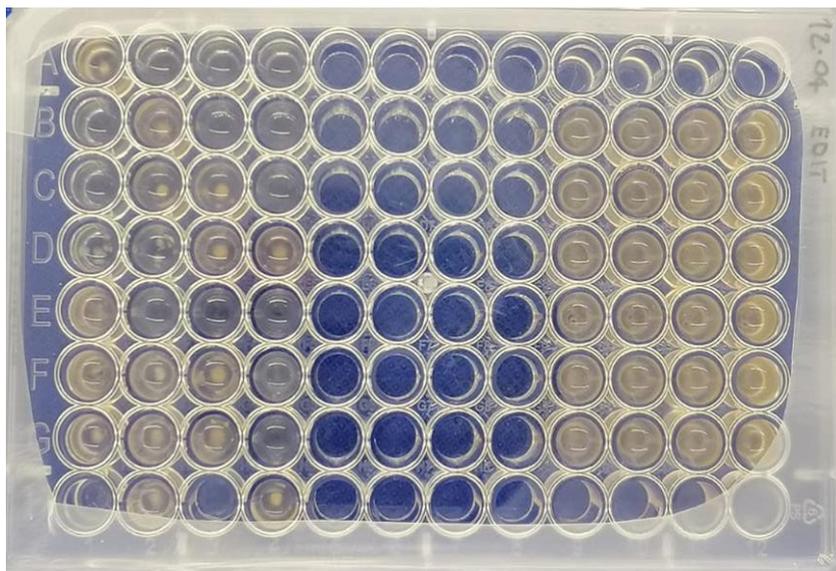


Figura 3.4.1 (b) – Coltura in multiwell contenente estratto di BSG *Edit* inoculato (colonne sulla destra) dopo 190 ore di fermentazione

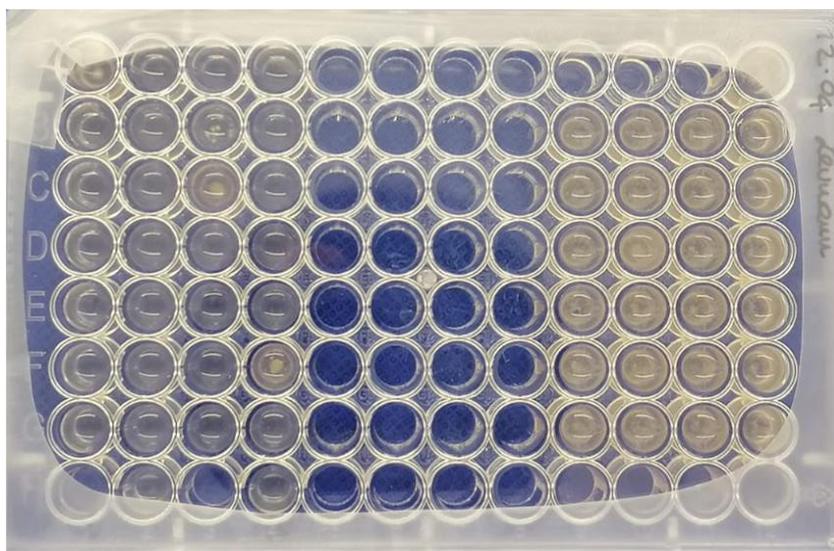


Figura 3.4.1 (c) – Coltura in multiwell contenente estratto di BSG *Leumann* inoculato (colonne sulla destra) dopo 190 ore di fermentazione

La durata delle tre fermentazioni è stata prolungata fino a 190 ore ed è facile osservare qualitativamente come anche in questo caso, similmente alla coltura in Petri descritta nel paragrafo precedente, *R. mucilaginosa* sia cresciuta in tutte e tre le piastre multiwell (limitatamente ai pozzetti inoculati disposti nelle colonne sulla destra), conferendo agli estratti una colorazione giallognola differente da quella caratteristica dei terreni non inoculati. Tuttavia, si può altresì notare che la piastra contenente al suo interno

il terreno YM (*Figura 3.4.1 (a)*) ha portato ad una crescita microbica caratterizzata da una produzione marcata di carotenoidi, individuabili mediante l'inconfondibile colore arancione. Questo risultato ottenuto è ragionevole, in quanto il *medium* YM si configura come un terreno ricco, in grado di fornire i principali nutrimenti di cui il lievito necessita per proliferare. È importante notare che, malgrado la precauzione di lasciare vuote le quattro colonne centrali di ciascuna multiwell, alcuni pozzetti della porzione abiotica di ogni piastra sono stati contaminati da *R. mucilaginosa*, che ne ha causato la variazione di colore. Questo fenomeno fa intuire come tali piastre siano ottime per effettuare un elevato numero di prove colturali in breve tempo, ma anche come sia piuttosto difficile mantenere le condizioni di sterilità all'interno dei terreni non inoculati.

Un'ultima precisazione, prima di proseguire con l'analisi dei dati raccolti nella prova, pone l'attenzione sul fatto che alcuni pozzetti appartenenti alle colonne laterali delle multiwell presentate risultano vuoti: è da essi, infatti, che la coltura è stata prelevata per essere sottoposta alle misurazioni di pH (*Tabella 3.4.1*), °Br (*Tabella 3.4.2*) e OD 600 (*Figura 3.4.2*) riportate in seguito.

Tempo di coltura [h]	YM	<i>Edit</i>	<i>Leumann</i>
0	6,06 ± 0,05	6,01 ± 0,07	6,01 ± 0,04
45	5,23 ± 0,06	6,91 ± 0,11	6,21 ± 0,07
190	7,62 ± 0,05	7,17 ± 0,09	6,44 ± 0,08

Tabella 3.4.1 – Valori di pH misurati al tempo iniziale e dopo 45 e 190 ore di coltura in multiwell contenenti terreno YM ed estratto di BSG *Edit* e *Leumann* inoculati con *R. mucilaginosa*

Tempo di coltura [h]	YM	<i>Edit</i>	<i>Leumann</i>
0	2,5	0,9	1,1
45	2,1	0,8	1,0
190	1,1	0,8	1,0
Δ_{TOT} °Br	1,4	0,1	0,1

Tabella 3.4.2 – Valori di °Br (in Brix %) misurati al tempo iniziale e dopo 45 e 190 ore di coltura in multiwell contenenti terreno YM ed estratto di BSG *Edit* e *Leumann* inoculati con *R. mucilaginosa*

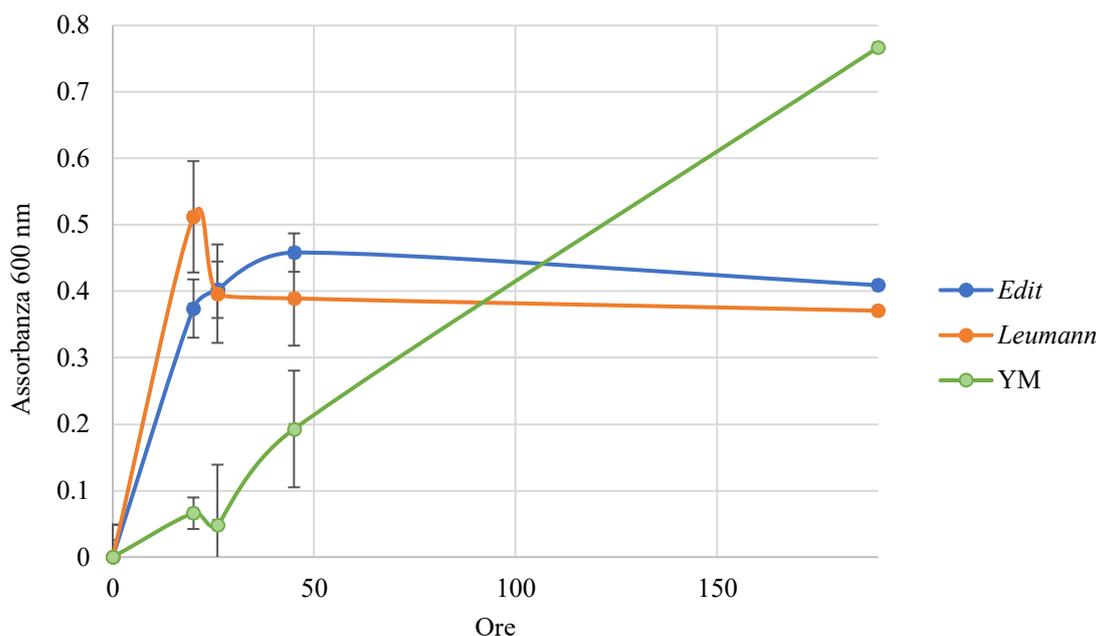


Figura 3.4.2 – Grafico dei valori di **densità ottica (OD 600)** misurati nel corso delle tre colture in multiwell contenenti terreno YM ed estratto di BSG *Edit* e *Leumann* inoculati con *R. mucilaginosa*

Da *Tabella 3.4.1*, si nota come nel caso delle colture avvenute sugli estratti di BSG *Edit* e *Leumann* l'andamento crescente del pH risulti il medesimo, con la sola differenza che quest'ultimo, nel primo dei due terreni, raggiunge un valore più elevato, pari a circa 7,17, pur partendo da un valore iniziale confrontabile. Nella coltura con terreno YM, invece, si assiste ad un comportamento differente: il pH in un primo momento diminuisce, incrementando nuovamente il suo valore (dopo 45 ore di coltura) raggiungendo 7,62 dopo 190 ore.

Per quanto riguarda i valori relativi ai °Br misurati durante il periodo di fermentazione, si nota immediatamente che il terreno YM è quello in grado di fornire il maggior approvvigionamento di carbonio al lievito (2,5 °Br); quest'ultimo, infatti, metabolizza molti degli zuccheri presenti all'interno di tale *medium* per svolgere le proprie funzioni vitali. Si ricorda, inoltre, che i carotenoidi sono caratterizzati chimicamente da uno scheletro composto per lo più da atomi di carbonio (come descritto nel paragrafo 1.4.1); perciò, è ragionevole intuire come il consumo di substrati carboniosi possa generare conseguenze sul quantitativo di carotenoidi prodotti. Questa ipotesi è corroborata dal fatto che le colture cresciute sugli estratti di BSG *Edit* e *Leumann*, a cui corrisponde un consumo di solamente 0,1°Br tra l'inizio e il termine della fermentazione, esibiscono una colorazione molto più chiara (*Figure 3.4.1 (b)* e *3.4.1 (c)*) rispetto a quella arancione caratteristica delle cellule cresciute su terreno YM (*Figura 3.4.1 (a)*). Quest'ultimo, infatti, durante l'intero periodo di coltura, ha cambiato le sue caratteristiche, passando da circa 2,5 a 1,1°Br.

L'evoluzione della crescita microbica, come evidenziato da *Figura 3.4.2*, risulta essere molto simile per il lievito coltivato sugli estratti di BSG; in particolare, considerando le barre di errore, si nota che i terreni prodotti a partire dalle trebbie fornite dai birrifici *Edit*

e *Leumann* portano ad una crescita di *R. mucilaginosa* pressoché identica. Infatti, in fase stazionaria (190 ore), entrambe le colture tendono ad un valore asintotico di assorbanza molto simile (circa 0,4).

Completamente differente è invece l'andamento della crescita di *R. mucilaginosa* su terreno YM; questa, infatti, non raggiunge la fase stazionaria nelle prime 50 ore di coltura, bensì rimane in esponenziale, giungendo al termine della prova (190 ore) ad un valore di OD quasi doppio (circa 0,77) rispetto a quello osservato per le altre due colture (*Figura 3.4.2*).

È bene ricordare come la misurazione della densità ottica sia da considerare un metodo valido al fine di tracciare indicativamente l'andamento riconducibile alla crescita del lievito presente in una coltura; tuttavia, per quantificare tale andamento, spesso si misura la concentrazione di biomassa prodotta (in g/L) durante la fermentazione, tramite la valutazione del peso secco. Ovviamente, tale metodologia non è applicabile nel presente esperimento, in quanto i volumi di coltura introdotti in ciascun pozzetto sono così limitati da presentare quantitativi di biomassa difficilmente apprezzabili.

3.4.2 Coltura su sciroppi di BSG Forna (DOE) - PROVA 1

Adottando la procedura descritta nel paragrafo 2.4.2, sono state preparate due piastre multiwell caratterizzate dalla presenza di sciroppi derivanti da BSG *Forna* (ottenuti tramite estrazione in shaker a 24°C, 220 rpm per 2 ore), tal quale o addizionati, e dei terreni YM e sintetico (Casas-Godoy et al., 2020), utilizzati come controllo.

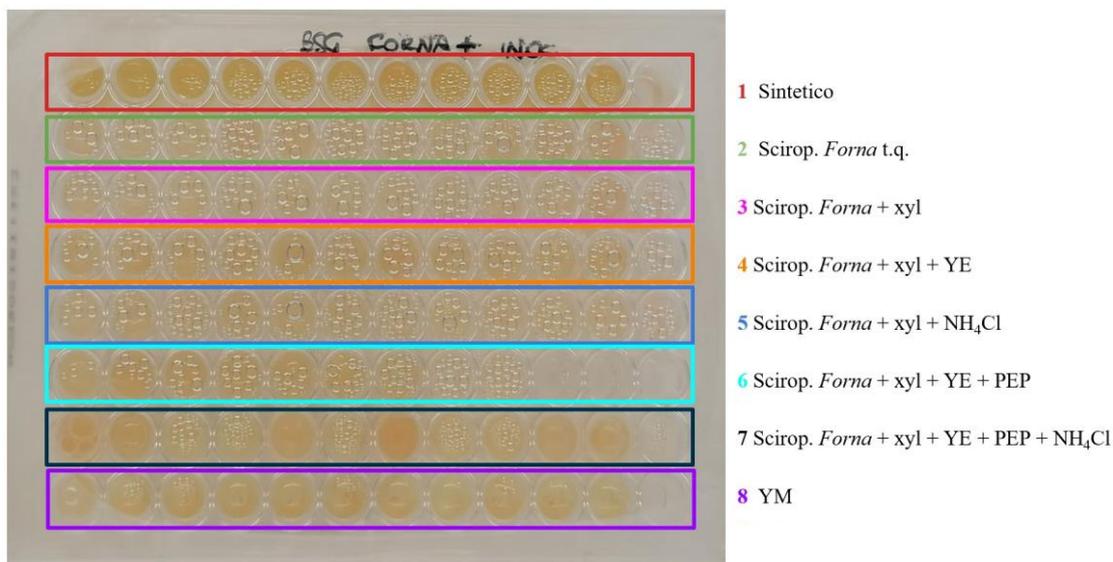


Figura 3.4.3 – Coltura in multiwell contenente i terreni e gli sciroppi di BSG *Forna* inoculati, dopo 72 ore di fermentazione

Come indicato in precedenza, solo una delle due piastre è stata inoculata con *R. mucilaginosa* (Figura 3.4.3); l'altra, invece, si configura come il relativo controllo abiotico.

Analizzando la precedente Figura 3.4.3, si nota come le linee colturali costituite dai due terreni YM e sintetico manifestino una colorazione aranciata mediamente di maggiore intensità rispetto a quella esibita dai pozzetti contenenti gli sciroppi di BSG. Inoltre, fra questi ultimi, la settima linea (costituita da sciroppo addizionato di xilosio, estratto di lievito, peptone e cloruro d'ammonio) risulta caratterizzata da alcuni pozzetti tinti maggiormente di arancione.

Medium di coltura	t 0	Dopo 72 h di coltura
Sintetico	5,51 ± 0,06	4,38 ± 0,12
Sciroppo <i>Forna</i> t.q.	5,33 ± 0,10	4,35 ± 0,09
Sciroppo <i>Forna</i> + xyl	5,32 ± 0,07	5,21 ± 0,08
Sciroppo <i>Forna</i> + xyl + YE	5,51 ± 0,15	4,84 ± 0,13
Sciroppo <i>Forna</i> + xyl + NH ₄ Cl	5,33 ± 0,11	3,30 ± 0,09
Sciroppo <i>Forna</i> + xyl + YE + PEP	5,68 ± 0,04	4,22 ± 0,06
Sciroppo <i>Forna</i> + xyl + YE + PEP + NH ₄ Cl	5,71 ± 0,11	4,68 ± 0,13
YM	5,21 ± 0,09	5,06 ± 0,07

Tabella 3.4.3 – Valori di pH misurati al tempo iniziale e dopo 72 ore di coltura in multiwell contenente i terreni YM e sintetico (Casas-Godoy et al., 2020) e gli sciroppi di BSG *Forna* (tal quali o addizionati) inoculati con *R. mucilaginosa*

Diversamente dai risultati della prova in multiwell, espressi nel paragrafo precedente (3.4.1), si nota come nel corso della presente fermentazione l'andamento del pH rimanga decrescente nel caso di ogni linea colturale; Inoltre, l'aggiunta di peptone e di cloruro d'ammonio allo sciroppo provoca un leggero aumento dei valori sopra riportati.

<i>Medium</i> di coltura	t 0	Dopo 72 h di coltura	Differenza °Br
Sintetico	4,9	3,3	1,6
Sciropo <i>Forna</i> t.q.	3,8	3,3	0,5
Sciropo <i>Forna</i> + xyl	4,1	3,4	0,7
Sciropo <i>Forna</i> + xyl + YE	4,3	3,6	0,7
Sciropo <i>Forna</i> + xyl + NH ₄ Cl	4,2	3,7	0,5
Sciropo <i>Forna</i> + xyl + YE + PEP	4,5	4,0	0,5
Sciropo <i>Forna</i> + xyl + YE + PEP + NH ₄ Cl	5,0	4,0	1,0
YM	2,0	1,7	0,3

Tabella 3.4.4 – Valori di °Br (espressi in Brix %) misurati al tempo iniziale e dopo 72 ore di coltura in multiwell contenente i terreni YM e sintetico (Casas-Godoy et al., 2020) e gli sciropi di BSG *Forna* (tal quali o addizionati) inoculati con *R. mucilaginoso*

Dalla *Tabella 3.4.4*, si evince che lo sciropo di BSG caratterizzato dalla concentrazione zuccherina iniziale più elevata (5,0) risulta essere quello addizionato di xilosio, estratto di lievito, peptone e cloruro d'ammonio. Questa concentrazione, determinata tramite la misurazione dei °Br, si avvicina di molto a quella relativa al *medium* sintetico (Casas-Godoy et al., 2020) utilizzato come confronto (4,9°Br). Viceversa, il terreno YM, come già osservato nel paragrafo 3.4.1, è caratterizzato da un valore di °Br certamente inferiore (circa 2,0 - 2,5). Tuttavia, è bene sottolineare che tale misurazione, seppur indicativa circa il contenuto totale delle sostanze zuccherine presenti all'interno di un campione, non è in grado di differenziarle per tipologia, permettendo di comprendere se la fonte carboniosa in questione sia di facile assimilazione da parte del lievito oppure no. A tal proposito, si nota come, nel corso della fermentazione, sia il terreno sintetico a vedere la diminuzione più marcata della concentrazione zuccherina (1,6°Br) e non lo sciropo addizionato prima citato (1,0 °Br). Ciò è facilmente comprensibile in quanto tale *medium* di coltura è formulato con 25 g/L di glucosio e 5 g/L di xilosio: entrambi zuccheri facilmente metabolizzabili dal lievito. Anche il terreno

YM esibisce una composizione simile; in quest'ultimo, però, il glucosio è presente in quantità inferiori, pari a 10 g/L (paragrafo 2.3).

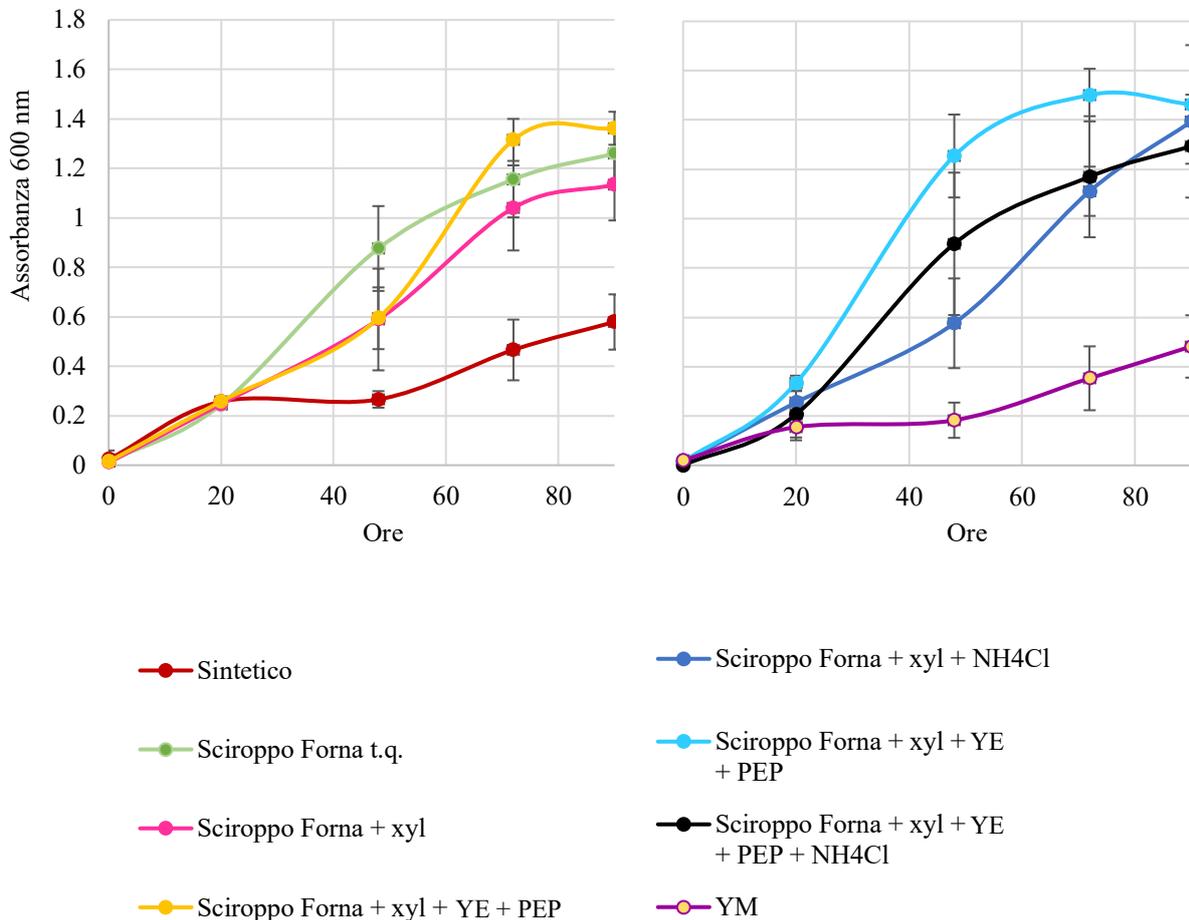


Figura 3.4.4 (a) – Grafico dei valori di **densità ottica (OD 600)** misurati nel corso della coltura in multiwell contenente i terreni YM e sintetico (Casas-Godoy et al., 2020) e gli sciropi di BSG *Forna* (tal quali o addizionati) inoculati con *R. mucilaginosa*

Dalle presenti rappresentazioni (Figure 3.4.4 (a) e 3.4.4 (b)) emerge come la crescita di *R. mucilaginosa* sia particolarmente favorita dall'utilizzo di un *medium* a base di sciropo di BSG *Forna*. Dopo 90 ore di fermentazione, infatti, l'utilizzo di quest'ultimo in coltura ha portato a misurare valori di densità ottica compresi tra 1,13 e 1,46 circa, mentre l'assorbanza valutata in corrispondenza dei campioni contenenti i terreni sintetico (Casas-Godoy et al., 2020) e YM è rimasta tra 0,48 e 0,58.

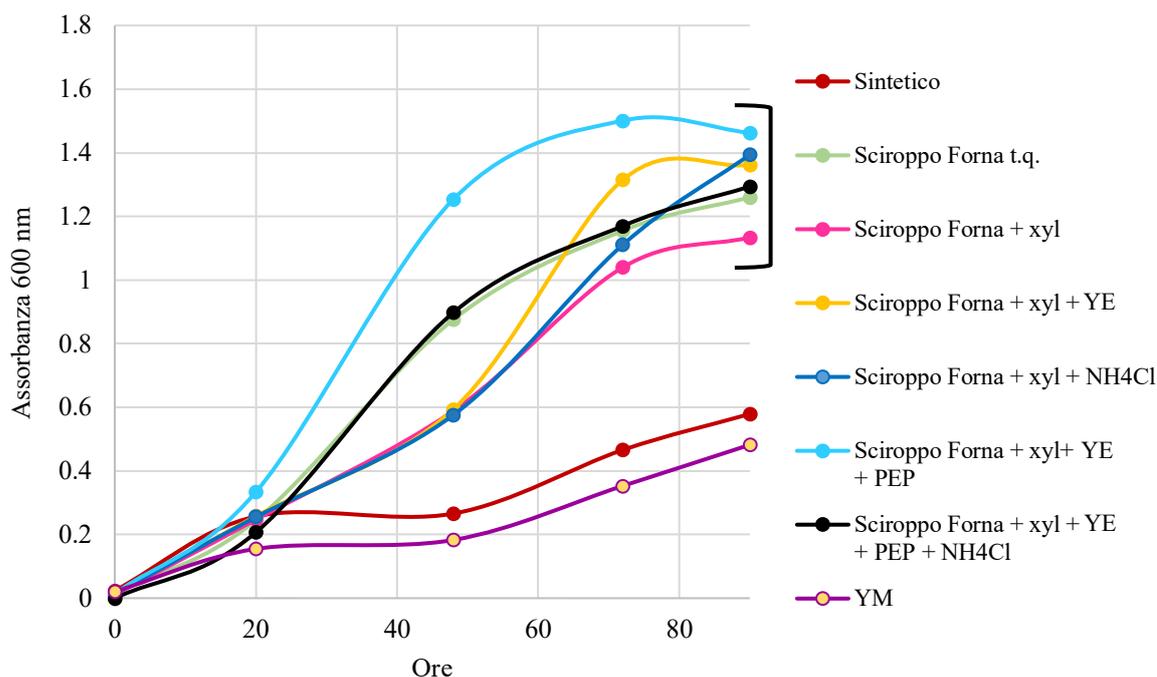


Figura 3.4.4 (b) – Grafico dei valori di **densità ottica (OD 600)** misurati nel corso della coltura in multiwell contenente i terreni YM e sintetico (Casas-Godoy et al., 2020) e gli sciroppi di BSG *Forna* (tal quali o addizionati) inoculati con *R. mucilaginosa*. Le deviazioni standard sono assenti per facilitare la comprensione dei risultati

Questo risultato, per niente scontato, ha dimostrato che, anche se derivante da un prodotto di scarto, lo sciroppo di BSG *Forna* possiede al suo interno i substrati necessari per la proliferazione di *R. mucilaginosa*, risultando addirittura più idoneo nel promuovere la crescita cellulare rispetto ai due terreni ricchi impiegati come controllo.

Un'altra evidenza, messa in luce dai grafici riportati, è che l'integrazione di estratto di lievito e peptone allo sciroppo apporta benefici più visibili - in termini di crescita cellulare - rispetto alle altre aggiunte considerate. Questo aspetto verrà nuovamente verificato nei prossimi paragrafi. Inoltre, si nota che l'aggiunzione di xilosio al brodo di coltura non è in grado di fornire vantaggi apprezzabili al fine della fermentazione; per tale motivazione si è deciso di rimuovere questo componente dagli sciroppi di BSG realizzati negli esperimenti successivi.

Un'ultima considerazione a valle della prova fa riferimento all'utilizzo di sciroppo tal quale come *medium*; infatti, si osserva che, anche senza aggiunte, questo è in grado di promuovere la crescita del lievito, portando a valori di OD confrontabili con quelli relativi agli altri sciroppi addizionati. Tale risultato è particolarmente significativo, in quanto, essendo questi sciroppi prodotti a partire da uno scarto di lavorazione (il BSG), è importante limitare i costi connessi al riutilizzo di quest'ultimo.

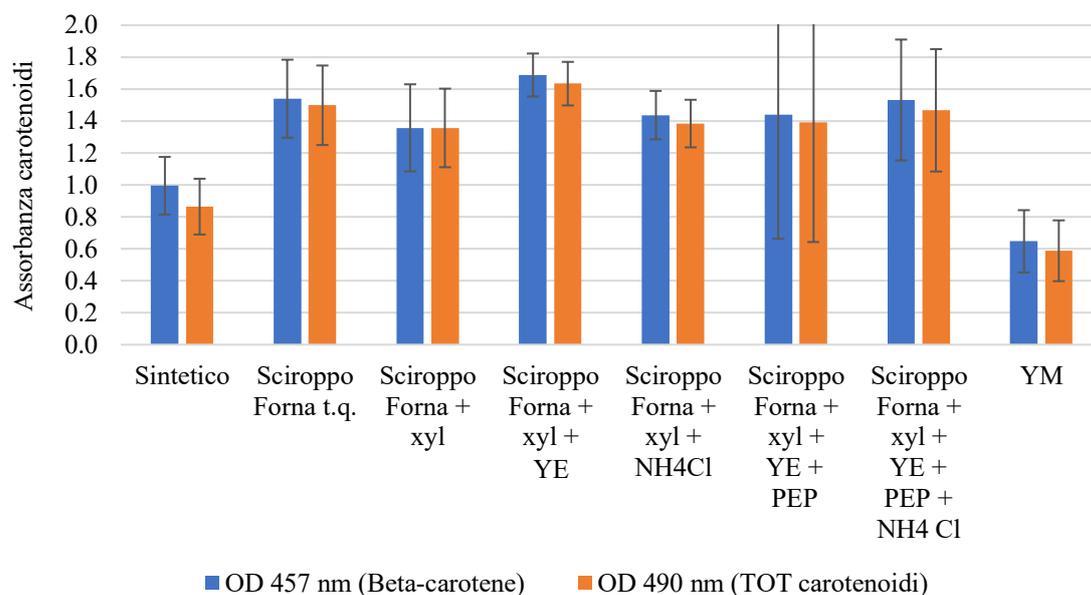


Figura 3.4.5 – Produzione dei carotenoidi (OD 457 e OD 490) misurata dopo 72 ore di coltura in multiwell contenente i terreni YM e sintetico (Casas-Godoy et al., 2020) e gli sciropi di BSG *Forna* (tal quali o addizionati) inoculati con *R. mucilaginoso*

La *Figura 3.4.5* mostra l'assorbanza misurata in corrispondenza di lunghezze d'onda pari a 457 e 490 nm, indicativa della presenza rispettivamente di β -carotene e di carotenoidi totali all'interno del brodo di coltura (Cheng & Yang, 2016). Da tale rappresentazione, si nota che tutte le linee colturali costituite da sciropo di BSG, tal quale o addizionato, sono caratterizzate dalla presenza di carotenoidi; tuttavia, emerge che l'aggiunta di estratto di lievito ne promuove particolarmente la produzione; al contrario, confrontando le due colture contenenti sciropo tal quale e con xilosio, pare che quest'ultimo peggiori le rese produttive di tali pigmenti. Si nota, in ultima analisi, come le colture caratterizzate dai terreni sintetico e YM (disposte ai due estremi del grafico precedente), in *Figura 3.4.3* visibilmente piú arancioni, in realtá presentano un'assorbanza a 457 e 490 nm inferiore rispetto a quelle costituite dagli sciropi di BSG.

3.4.3 Coltura su sciropi di BSG *Forna* (DOE) - PROVA 2

In questa prova (descritta nel paragrafo 2.4.3) si sono indagate le differenze tra le colture effettuate a partire da sciropo di BSG *Forna* ottenuto in due maniere differenti: quello relativo a due delle quattro multiwell è stato realizzato tramite estrazione per due ore in shaker (24°C e 220 rpm) (*Figura 3.4.6 (a)*), mentre nelle restanti piastre è stato adoperato uno sciropo derivante da estrazione in autoclave (121°C per 20 minuti) (*Figura 3.4.6 (b)*). L'aspetto degli estratti cosí preparati risulta alquanto differente; infatti, mentre il

trattamento termico mantiene piuttosto inalterata la morfologia del BSG, l'estrazione in shaker produce un miscuglio torbido e lattiginoso.

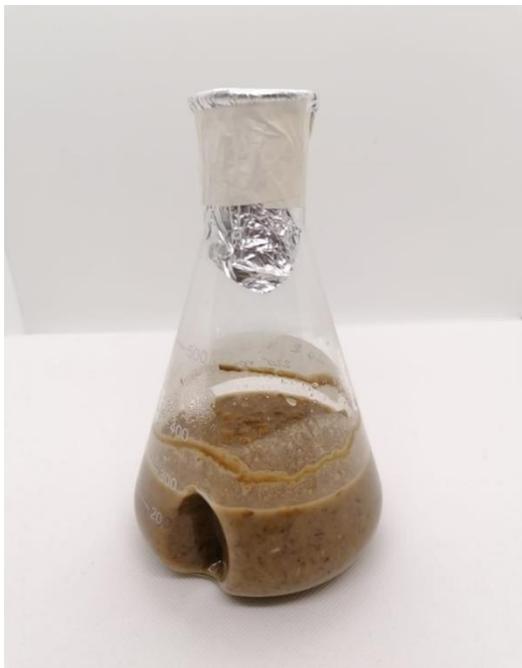


Figura 3.4.6 (a) – Estratto di BSG Forna ottenuto tramite **shaker** (24°C, 220 rpm per 2 ore)

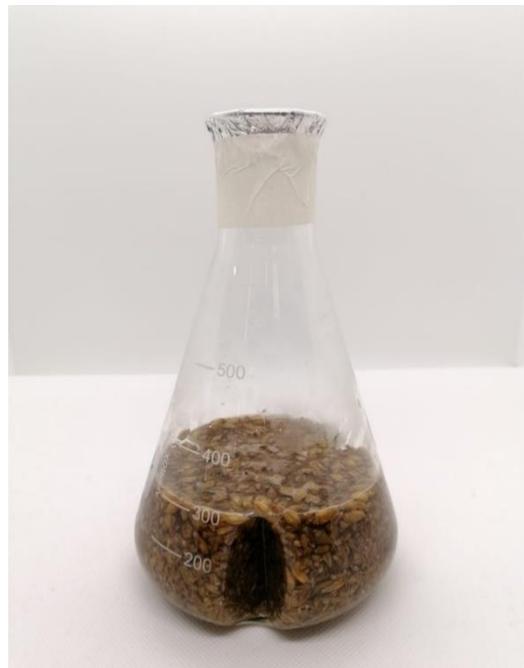


Figura 3.4.6 (b) – Estratto di BSG Forna ottenuto tramite **autoclave** (121°C per 20 minuti)

La disposizione delle linee colturali all'interno delle piastre multiwell inoculate (come descritto nel paragrafo 2.4.3) viene rappresentata nelle *Figure 3.4.7 (a)* e *3.4.7 (b)*; da queste ultime è possibile apprezzare le differenze di colorazione relative ai pozzetti che le compongono. In particolare, si evidenzia come le righe contenenti sciroppo di BSG siano caratterizzate da un colore più intenso; ciò è sia dovuto alla presenza dei carotenoidi prodotti durante l'attività fermentativa, sia causato dalle reazioni di *Maillard* avvenute in fase di sterilizzazione ad alta temperatura. Tuttavia, a parità di trattamento termico, si nota che la linea colturale costituita da sciroppo di BSG addizionato con estratto di lievito, peptone e NH_4Cl è quella caratterizzata dall'imbrunimento più marcato. Inoltre, si mostra dal punto di vista qualitativo che rimuovere lo xilosio dal terreno sintetico (Casas-Godoy et al., 2020) ne provoca lo schiarimento.

In ultima analisi, a prova del contributo delle reazioni di *Maillard* sulla colorazione degli sciroppi, si confrontano le immagini riportate in seguito. In esse sono rappresentate colture con la medesima formulazione; tuttavia, gli sciroppi mostrati in *Figura 3.4.7 (b)* (sottoposti ad un doppio trattamento termico) esibiscono una colorazione bruna più intensa rispetto ai corrispondenti di *Figura 3.4.7 (a)* che hanno subito un unico ciclo di sterilizzazione in autoclave.

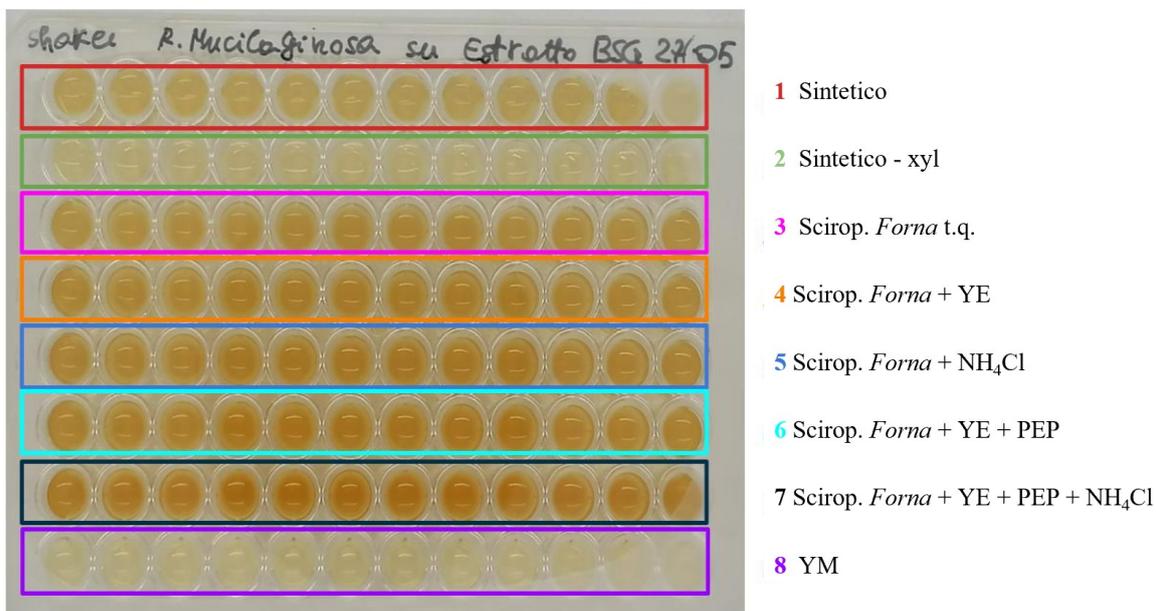


Figura 3.4.7 (a) – Coltura in multiwell contenente i terreni e gli sciropi di BSG *Forna* inoculati, dopo 72 ore di fermentazione – Sciropi derivanti da estratti prodotti tramite **shaker (24°C, 220 rpm per 2 ore)**

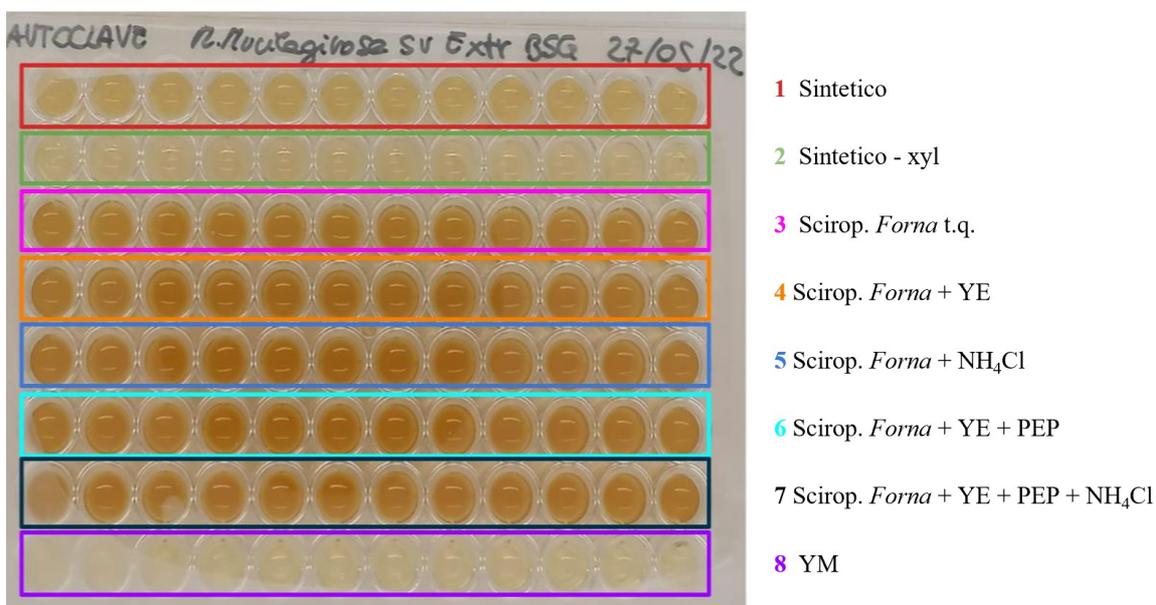


Figura 3.4.7 (b) – Coltura in multiwell contenente i terreni e gli sciropi di BSG *Forna* inoculati, dopo 72 ore di fermentazione – Sciropi derivanti da estratti prodotti tramite **autoclave (121°C per 20 minuti)**

In seguito, sono riportati i valori di pH (*Tabella 3.4.5*) e °Br (*Tabella 3.4.6*) per ciascuna linea culturale appartenente alle due multiwell inoculate (*Figure 3.4.7 (a)* e *3.4.7 (b)*).

<i>Medium</i> di coltura	Sciropi ottenuti con estrazione in shaker		Sciropi ottenuti con estrazione in autoclave	
	t 0	Dopo 72 h di coltura	t 0	Dopo 72 h di coltura
Sintetico	5,79 ± 0,07	4,20 ± 0,11	5,70 ± 0,09	4,08 ± 0,10
Sintetico - xyl	6,20 ± 0,16	4,66 ± 0,18	6,18 ± 0,13	4,47 ± 0,12
Scioppo <i>Forna</i> t.q.	5,65 ± 0,06	6,95 ± 0,13	5,33 ± 0,09	6,83 ± 0,09
Scioppo <i>Forna</i> + YE	5,67 ± 0,14	7,42 ± 0,09	5,41 ± 0,12	7,30 ± 0,11
Scioppo <i>Forna</i> + NH ₄ Cl	5,55 ± 0,09	7,09 ± 0,05	5,26 ± 0,10	6,83 ± 0,07
Scioppo <i>Forna</i> + YE + PEP	5,72 ± 0,12	7,82 ± 0,11	5,48 ± 0,18	7,62 ± 0,15
Scioppo <i>Forna</i> + YE + PEP + NH ₄ Cl	5,72 ± 0,17	7,50 ± 0,16	5,42 ± 0,13	7,22 ± 0,16
YM	6,36 ± 0,10	6,21 ± 0,08	6,35 ± 0,12	5,70 ± 0,09

Tabella 3.4.5 – Valori di **pH** misurati al tempo iniziale e dopo 72 ore di coltura nelle multiwell contenenti i terreni YM e sintetico (Casas-Godoy et al., 2020) e gli sciropi di BSG *Forna* (tal quali o addizionati) inoculati con *R. mucilaginosa*. Si riportano i risultati relativi alle due colture costituite da sciropi derivanti da estrazione in shaker (24°C, 220 rpm per 2 ore) e in autoclave (121°C per 20 minuti)

Analizzando i dati di *Tabella 3.4.5*, si assiste a due andamenti differenti. I valori di pH relativi ai terreni sintetico (con o senza xilosio) e YM vedono una diminuzione (molto lieve per quest'ultimo) con il progredire della fermentazione; al contrario le colture costituite dagli sciropi di BSG *Forna* (tal quale e addizionati) evolvono nel tempo con un aumento del pH. In particolar modo, a parità di procedura per la realizzazione degli sciropi, si evidenzia come le colture addizionate di estratto di lievito

e peptone esibiscano i valori di pH più elevati al termine delle 72 ore (7,8 e 7,6 rispettivamente se ottenuti tramite shaker o autoclave).

Confrontando gli andamenti nelle due multiwell si nota che i pH iniziali, corrispondenti ai *media* contenenti sciroppi di BSG, sono più elevati nelle colture sottoposte ad un solo ciclo di sterilizzazione (con estrazione tramite shaker); questo aspetto sembrerebbe mettere in luce che il trattamento termico aggiuntivo sia in grado di promuovere l'accumulo di alcune componenti acide nel brodo di coltura.

L'aumento del pH osservato nelle colture, secondo le indicazioni di Cheng e Yang (2016), non influisce positivamente sulla produzione di carotenoidi, la quale sarebbe favorita da un valore pari a 5,5 circa.

<i>Medium</i> di coltura	Sciroppi ottenuti con estrazione in shaker			Sciroppi ottenuti con estrazione in autoclave		
	t 0	72 h di coltura	Differenza °Br	t 0	72 h di coltura	Differenza °Br
Sintetico	3,7	3,3	0,4	3,7	3,2	0,5
Sintetico - xyl	3,4	3,1	0,3	3,4	2,9	0,5
Sciroppo <i>Forna</i> t.q.	4,3	3,8	0,5	6,0	5,6	0,4
Sciroppo <i>Forna</i> + YE	4,8	4,3	0,5	6,5	6,0	0,5
Sciroppo <i>Forna</i> + NH ₄ Cl	4,7	4,4	0,3	6,7	6,1	0,6
Sciroppo <i>Forna</i> + YE + PEP	5,2	4,8	0,4	7,0	6,4	0,6
Sciroppo <i>Forna</i> + YE + PEP + NH ₄ Cl	5,6	5,0	0,6	7,0	6,4	0,6
YM	2,3	1,4	0,9	2,6	2,3	0,3

Tabella 3.4.6 – Valori di °Br (espressi come Brix %) misurati al tempo iniziale e dopo 72 ore di coltura nelle multiwell contenenti i terreni YM e sintetico (Casas-Godoy et al., 2020) e gli sciroppi di BSG *Forna* (tal quali o addizionati) inoculati con *R. mucilaginosa*. Si riportano i risultati relativi alle due colture costituite da sciroppi derivanti da estrazione in shaker (24°C, 220 rpm per 2 ore) e in autoclave (121°C per 20 minuti)

Da quanto emerge visionando la *Tabella 3.4.6*, si evince che gli sciroppi di BSG presentano un contenuto zuccherino iniziale superiore rispetto ai terreni sintetico (con o senza xilosio) e YM; quest'ultimo, in particolare, essendo caratterizzato da circa 2,5°Br, si afferma come il terreno più povero di zuccheri tra i presenti. È importante specificare, però, che tali carboidrati sono facilmente assimilabili dal lievito, poiché costituiti per lo più da glucosio e maltosio. Al contrario, la composizione zuccherina degli sciroppi di BSG non è ben nota e potrebbe essere caratterizzata da zuccheri di diversa complessità e composizione chimica, non tutti metabolizzabili da *R. mucilaginosa*.

Confrontando i valori di °Br ottenuti nelle piastre, si osserva un aspetto molto interessante: le colture sottoposte a due cicli di sterilizzazione in autoclave presentano un contenuto glucidico iniziale più elevato. Questo risultato è comprensibile, in quanto l'alta temperatura applicata in fase di produzione degli sciroppi promuove una maggior estrazione delle componenti zuccherine, presenti in quantità più elevate all'interno degli sciroppi addizionati di estratto di lievito e peptone (circa 7,0°Br).

Passando ora all'analisi degli andamenti di densità ottica (OD 600) relativi alle linee colturali in esame (*Figure 3.4.8*), si può notare che, mentre la crescita sui terreni sintetici proposti da Casas e Godoy (2020) è rimasta contenuta, quella connessa all'utilizzo del terreno YM come *medium* ha portato a ottimi risultati (OD 600 pari a 1,2 dopo 72 ore), diversamente da quanto evidenziato nella *PROVA 1* (OD 600 pari a 0,35 dopo il medesimo tempo). Inoltre, tra le colture costituite dagli sciroppi di BSG spiccano certamente quelle caratterizzate dall'aggiunta di estratto di lievito e peptone. Tale risultato è confermato dalle considerazioni effettuate in precedenza riguardo alla valutazione dei °Br delle colture. In ultimo, si evidenzia come l'arricchimento dello sciroppo con cloruro d'ammonio non fornisca miglioramenti apprezzabili nella crescita del lievito; pertanto, il suddetto sale non sarà più addizionato ai terreni formulati negli esperimenti di *scale-up* successivi, malgrado in letteratura fosse indicato che questo promuovesse la proliferazione di *R. mucilaginosa* (Casas-Godoy et al., 2020).

Confrontando infine le *Figure 3.4.8 (b)* e *3.4.8 (c)*, esplicative delle colture realizzate a partire da sciroppi ottenuti mediante estrazione in shaker e autoclave, si nota come quest'ultima garantisca mediamente valori di OD 600 (in corrispondenza delle 72 ore di fermentazione) più alti di circa 0,2 punti rispetto ai *media* prodotti tramite shaker. Probabilmente il trattamento termico è in grado di estrarre dal BSG più componenti utili al lievito per crescere.

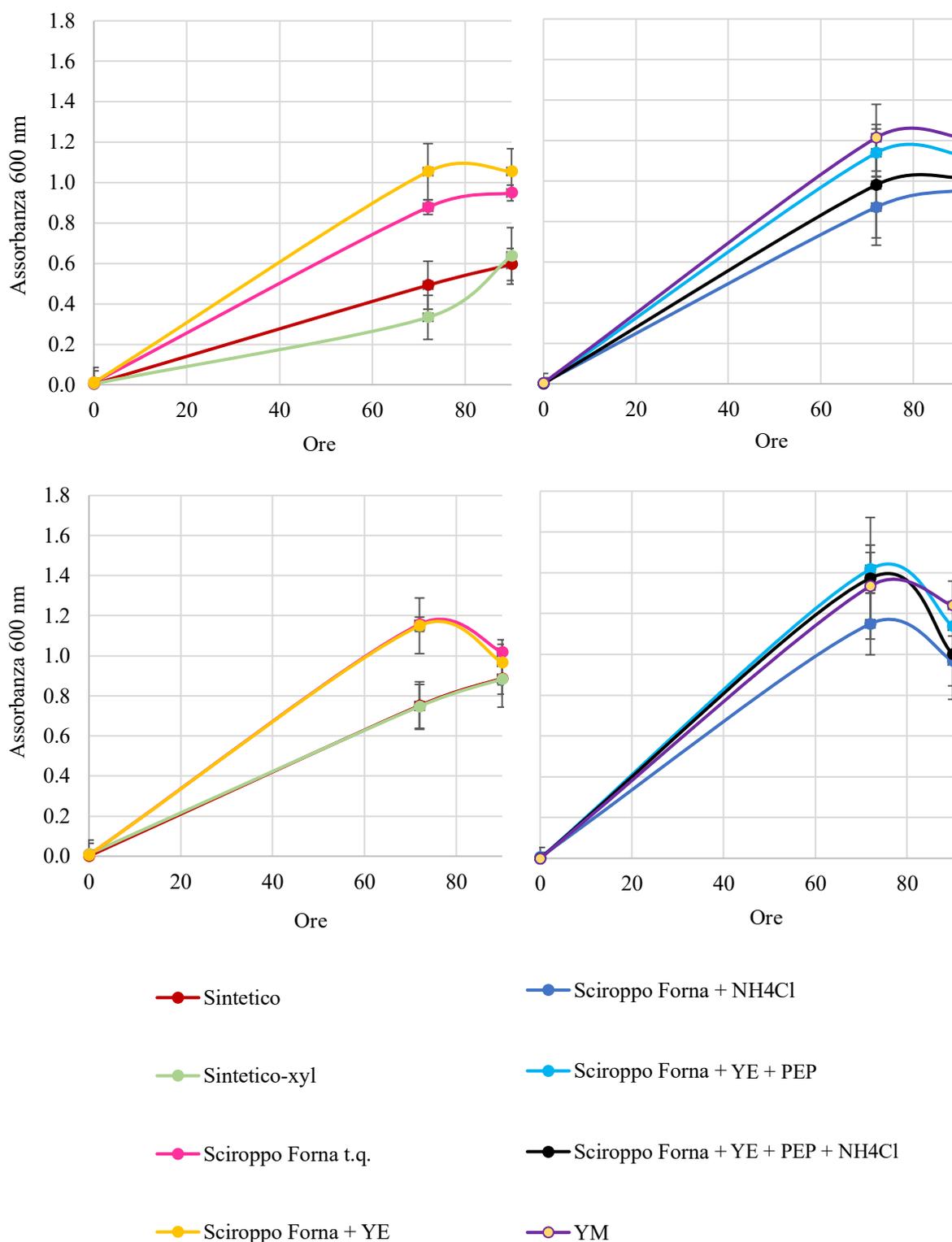


Figura 3.4.8 (a) – Grafici dei valori di densità ottica (OD 600) misurati nel corso della coltura in multiwell contenente i terreni YM e sintetico (Casas-Godoy et al., 2020) e gli sciroppi di BSG *Forna* (tal quali o addizionati) inoculati con *R. mucilaginosa*. Tali sciroppi sono stati prodotti a partire da un'estrazione in shaker (24°C, 220 rpm per 2 ore) (grafici in alto) e in autoclave (121°C per 20 minuti) (grafici in basso)

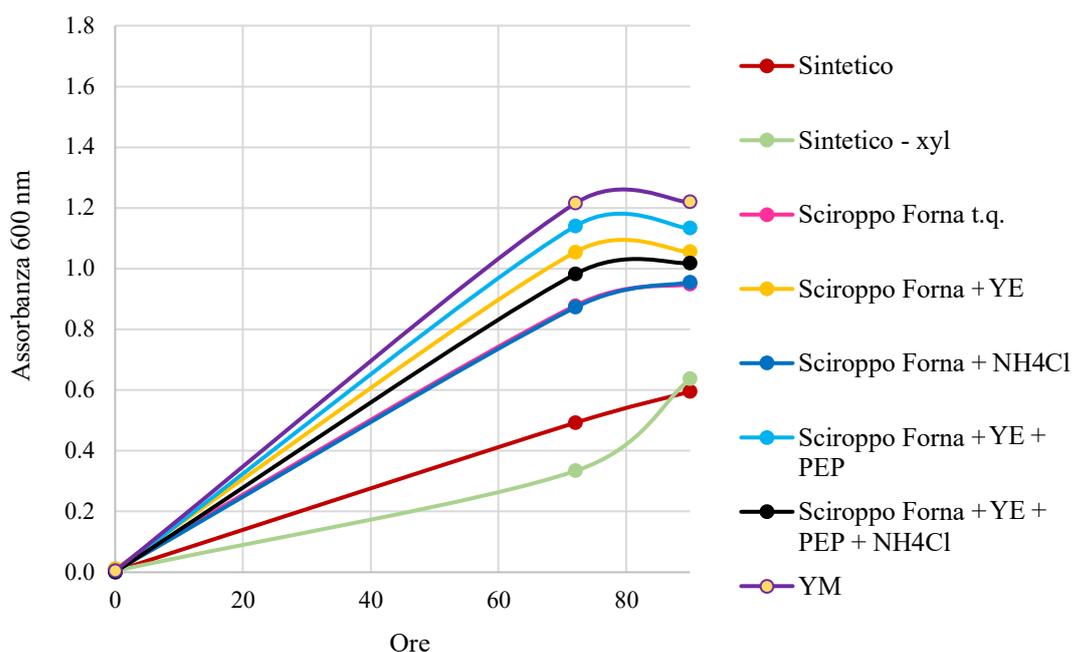


Figura 3.4.8 (b) – Grafico dei valori di densità ottica (OD 600) misurati nel corso della coltura in multiwell contenente i terreni YM e sintetico (Casas-Godoy et al., 2020) e gli sciropi di BSG Forna (tal quali o addizionati) inoculati con *R. mucilaginosa*. Tali sciropi sono stati prodotti a partire da un'estrazione in shaker (24°C, 220 rpm per 2 ore). Le deviazioni standard sono assenti per facilitare la comprensione dei risultati

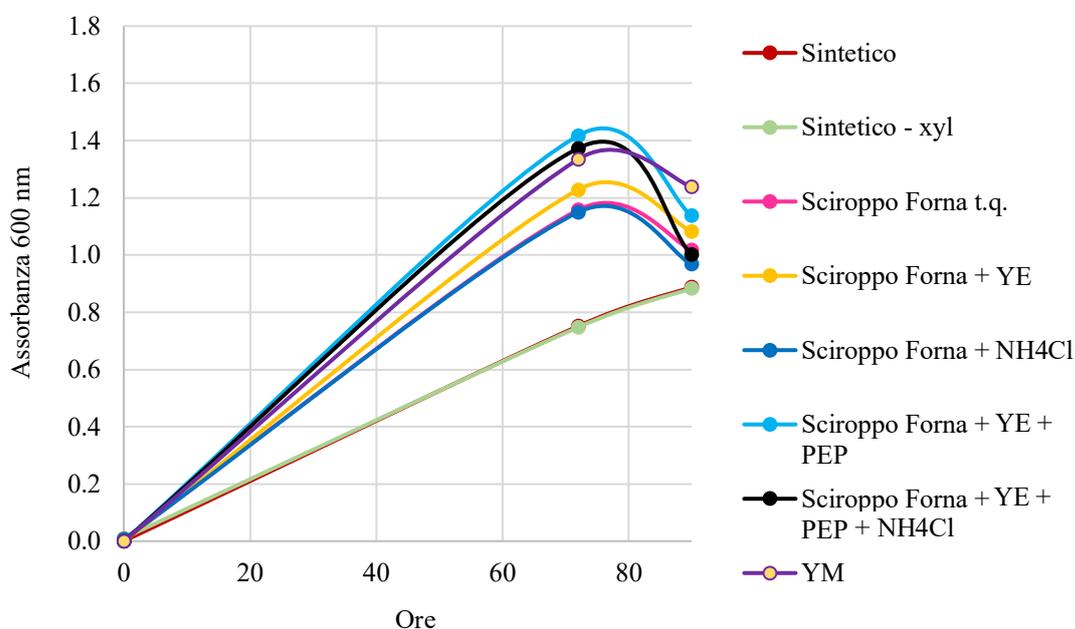


Figura 3.4.8 (c) – Grafico dei valori di densità ottica (OD 600) misurati nel corso della coltura in multiwell contenente i terreni YM e sintetico (Casas-Godoy et al., 2020) e gli sciropi di BSG Forna (tal quali o addizionati) inoculati con *R. mucilaginosa*. Tali sciropi sono stati prodotti a partire da un'estrazione in autoclave (121°C per 20 minuti). Le deviazioni standard sono assenti per facilitare la comprensione dei risultati

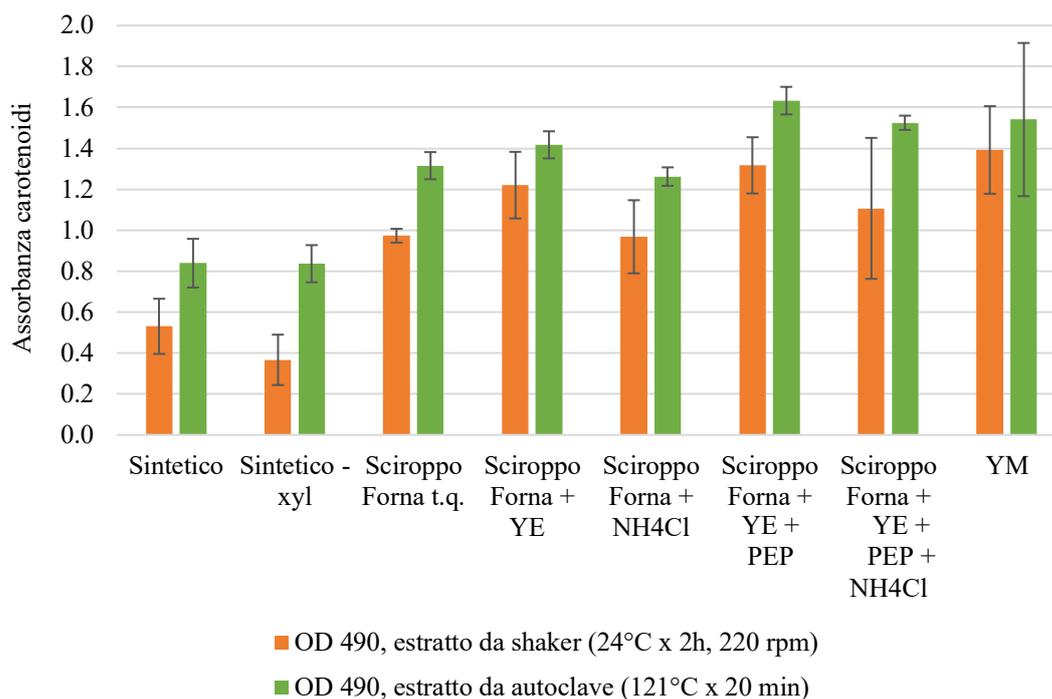


Figura 3.4.9 – Produzione dei carotenoidi (OD 490) misurata dopo 72 ore di coltura in multiwell contenente i terreni YM e sintetico (Casas-Godoy et al., 2020) e gli sciropi di BSG *Forna* (tal quali o addizionati) inoculati con *R. mucilaginosa*. Si confrontano gli sciropi ottenuti tramite **shaker (24°C, 220 rpm per 2 ore)** e **autoclave (121°C per 20 minuti)**

La *Figura 3.4.9* mostra i valori di assorbanza dei carotenoidi, alla lunghezza d'onda di 490 nm (Cheng & Yang, 2016), relativamente alle due multiwell inoculate. Si nota che nella totalità dei casi esaminati gli sciropi derivanti da un'estrazione in autoclave presentano un valore di assorbanza più elevato. Tale aumento, sintomo della produzione di carotenoidi, potrebbe però essere anche imputabile alla presenza di componenti (generati ad opera delle reazioni di Maillard avvenute nel corso del trattamento termico aggiuntivo) che assorbono la radiazione emanata dallo spettrofotometro nelle vicinanze dello spettro relativo ai pigmenti di interesse. Inoltre, a parità di piastra analizzata, si evidenzia che tra le linee colturali costituite da sciropo di BSG, quella in cui si verifica l'accumulo maggiore di carotenoidi è caratterizzata dall'aggiunta di estratto di lievito e peptone (valori di OD 490 pari a 1,32 e 1,63 per sciropi ottenuti rispettivamente da shaker e autoclave). Pertanto, sarà proprio quest'ultima formulazione ad essere investigata in maggior dettaglio all'interno delle prove sperimentali presentate nei paragrafi seguenti.

3.4.4 Confronto tra le prove in multiwell

A valle delle sperimentazioni precedentemente commentate, è bene mettere in luce quali tra i risultati ottenuti in multiwell sono di maggior rilievo.

Come prima analisi, si nota che gli andamenti relativi ai valori di pH, riscontrati nelle colture finora presentate, dipendono fortemente dall'esposizione di queste ultime alle temperature raggiunte durante il processo di sterilizzazione in autoclave (121°C per 20 minuti). I *media* così trattati, infatti, vedono nel corso della fermentazione un aumento del loro valore di pH; viceversa, i terreni nei quali la sterilità è stata ottenuta attraverso una microfiltrazione a 0,2 µm (e che quindi non subiscono trattamenti termici) evolvono con un abbassamento di tale valore. Questo fenomeno di inversione è probabilmente dovuto ad alcune reazioni chimiche favorite alle alte temperature; esse, per l'appunto, potrebbero aver reso disponibile o consumato qualche componente presente nel terreno di coltura. Tale comportamento sembra essere indipendente dal numero dei trattamenti termici, purché se ne effettui almeno uno.

Per quanto riguarda il contenuto zuccherino dei *media* utilizzati nelle prove in multiwell, si evince che gli sciroppi di BSG *Forna*, poiché derivanti da un'estrazione avente un rapporto BSG/acqua più elevato (paragrafo 2.3), sono molto più ricchi di zuccheri (3,8 – 7,0°Br) rispetto agli estratti derivanti da BSG *Edit* e *Leumann* (0,9 – 1,1°Br). Inoltre, tra i suddetti sciroppi di BSG *Forna*, quelli ottenuti mediante estrazione in autoclave presentano i valori più elevati (6,0 – 7,0°Br).

Effettuando un confronto delle curve di densità ottica (OD 600) caratteristiche di estratti e sciroppi derivanti da trebbie di diversa provenienza (*Figure 3.4.10*), si osserva che le colture costituite dagli sciroppi di BSG *Forna*, ottenuti tramite shaker (PROVA 1) e autoclave, presentano andamenti molto simili per fermentazioni protratte fino a 72 ore circa; a seguito di tale periodo, si osserva che la densità ottica relativa alla coltura con sciroppo prodotto tramite autoclave diminuisce. Si ricorda che la PROVA 1 e la PROVA 2 in shaker, come descritto nei paragrafi 2.4.2 e 2.4.3, differiscono per lo più per l'aggiunta di xilosio ai *media* e per la metodologia di sterilizzazione degli sciroppi di BSG (con microfiltrazione nella prima e con trattamento termico nella seconda). I grafici successivi mostrano anche i valori di OD 600 inerenti alle colture costituite da sciroppo ottenuto mediante estrazione in shaker (PROVA 2); a tal proposito, essi evidenziano una crescita di *R. mucilaginosa* più contenuta rispetto alle altre linee colturali facenti uso di sciroppi di BSG *Forna*.

Un'ultima considerazione riguarda gli estratti di BSG *Edit* e *Leumann*. Questi ultimi, analizzati esclusivamente tal quali nella *Figura 3.4.10 (a)*, esibiscono valori di densità ottica (circa 0,4 dopo 90 ore) di gran lunga inferiori rispetto ai corrispettivi sciroppi di BSG *Forna*; per tale motivo gli estratti di BSG *Edit* e *Leumann* saranno abbandonati nel corso della sperimentazione. I dati rappresentati nei grafici successivi (*Figure 3.4.10*) sono stati privati delle rispettive deviazioni standard al fine di semplificarne la visione.

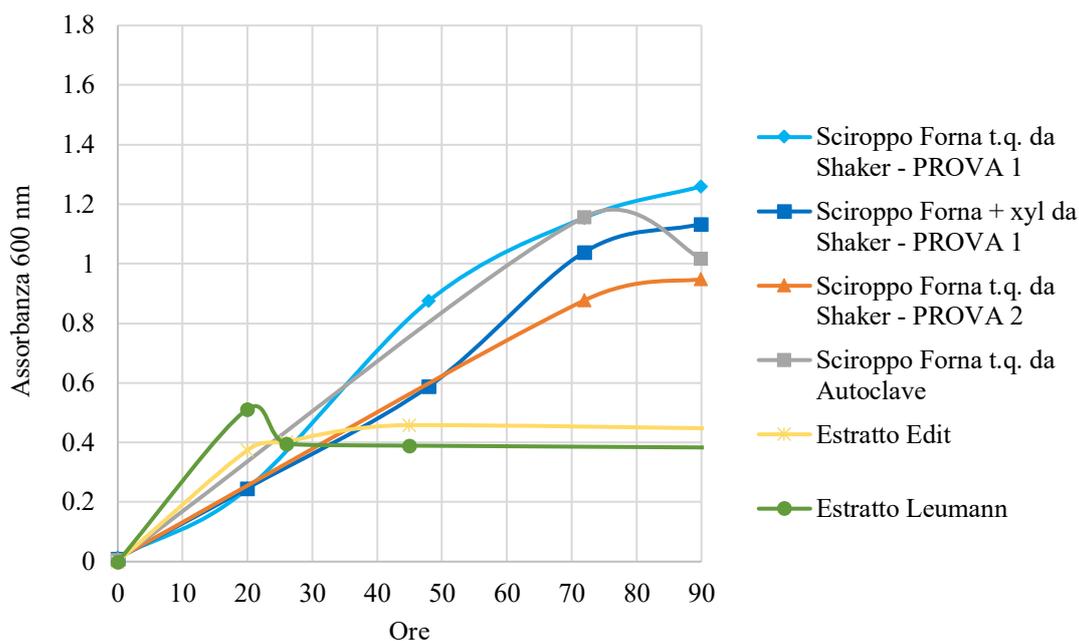


Figura 3.4.10 (a) – Grafico di confronto dei valori di densità ottica (OD 600) misurati nel corso delle colture in multiwell contenenti gli **estratti di BSG Edit e Leumann**, nonché gli **sciropi di BSG Forna (tal quali o addizionati di xilosio)** inoculati con *R. mucilaginosa*

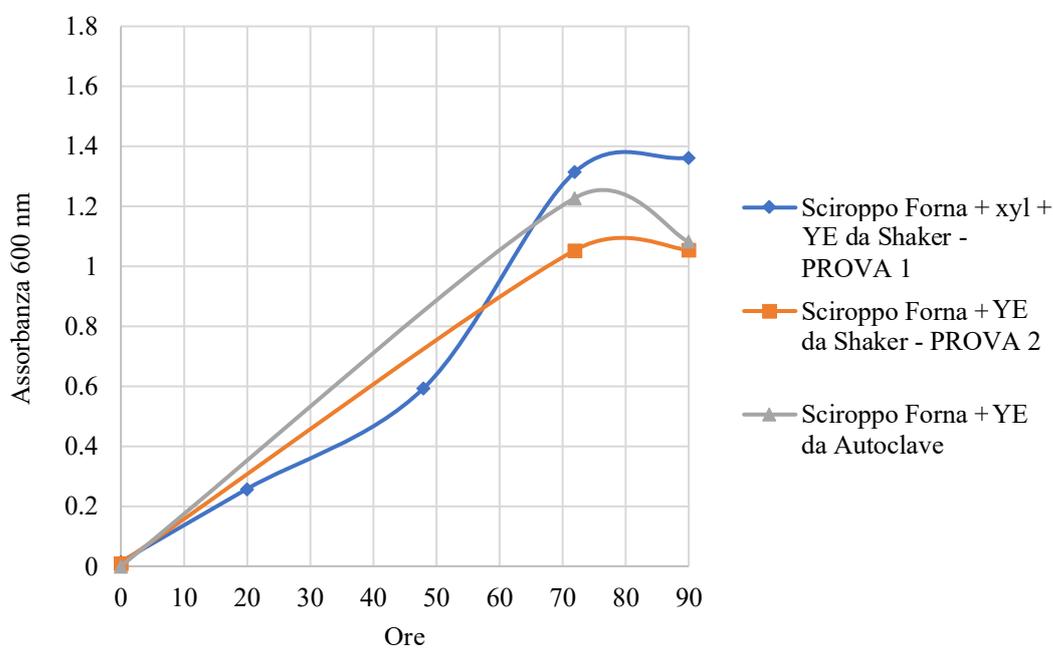


Figura 3.4.10 (b) – Grafico di confronto dei valori di densità ottica (OD 600) misurati nel corso delle colture in multiwell contenenti gli **sciropi di BSG Forna (addizionati di estratto di lievito)** inoculati con *R. mucilaginosa*

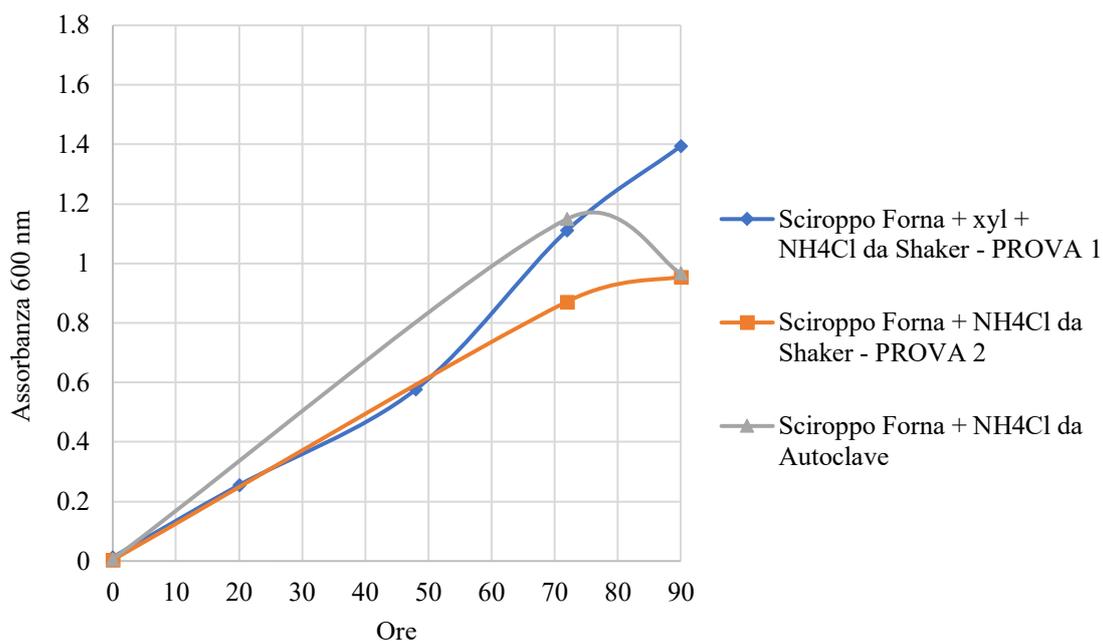


Figura 3.4.10 (c) – Grafico di confronto dei valori di densità ottica (OD 600) misurati nel corso delle colture in multiwell contenenti gli **scioppo di BSG Forna (aggiunti di NH₄Cl)** inoculati con *R. mucilaginosa*

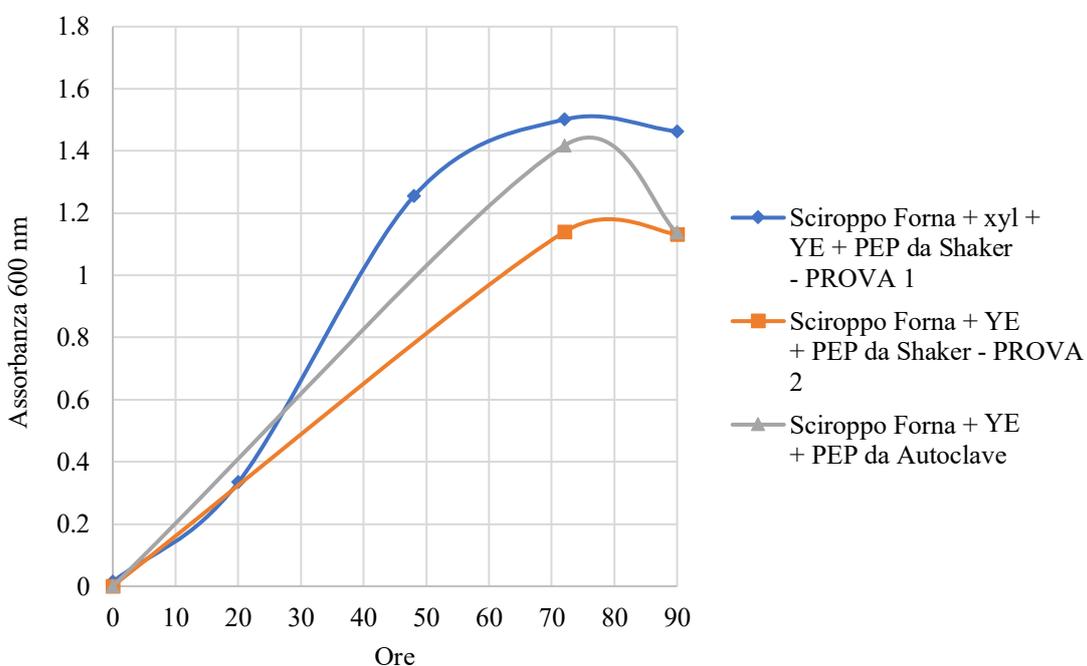


Figura 3.4.10 (d) – Grafico di confronto dei valori di densità ottica (OD 600) misurati nel corso delle colture in multiwell contenenti gli **scioppo di BSG Forna (aggiunti di estratto di lievito e peptone)** inoculati con *R. mucilaginosa*

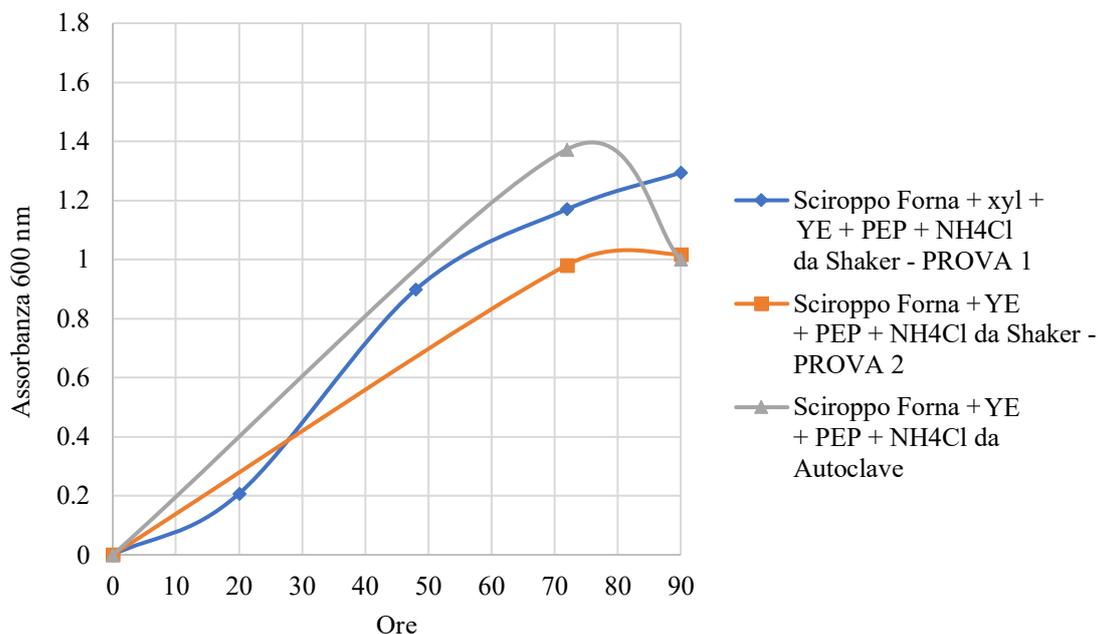


Figura 3.4.10 (e) – Grafico di confronto dei valori di densità ottica (OD 600) misurati nel corso delle culture in multiwell contenenti gli **scioppi di BSG Forna** (aggiunti di estratto di lievito, peptone e NH_4Cl) inoculati con *R. mucilaginosa*

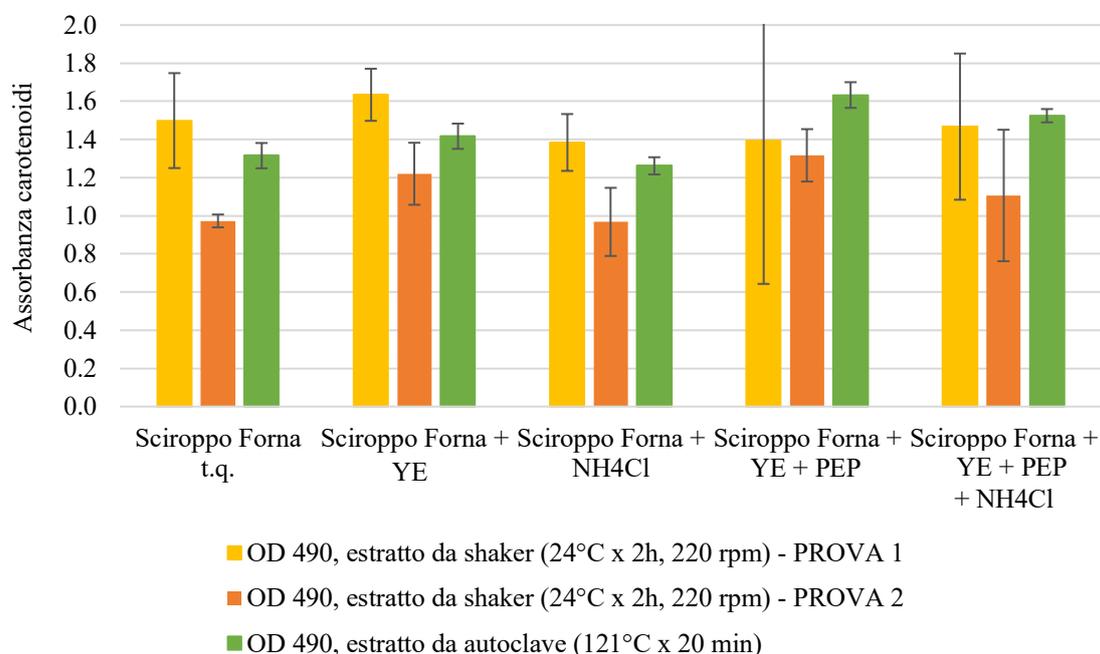


Figura 3.4.11 – Confronto circa la **Produzione dei carotenoidi** (OD 490) misurata dopo 72 ore di cultura in multiwell contenenti gli **scioppi di BSG Forna** (tal quali o aggiunti) inoculati con *R. mucilaginosa*

In *Figura 3.4.11* sono confrontati i valori di OD 490 relativi alle colture con sciroppi di BSG *Forna*; i dati qui presentati evidenziano che, tra i due sciroppi ottenuti da estrazione in shaker (PROVE 1 e 2), nella totalità dei casi sono quelli utilizzati nella PROVA 1 (quindi non sottoposti ad alcun trattamento termico) a promuovere la maggiore produzione di carotenoidi. Inoltre, confrontando le assorbanze (OD 490) relative alle colture della PROVA 2, realizzate con sciroppi di BSG *Forna* derivanti da estrazione rispettivamente in shaker e autoclave, si nota come siano quelli prodotti mediante l'estrazione a 121°C (per 20 minuti) a presentare i valori più elevati.

3.5 Coltura in beuta

3.5.1 Coltura su terreno YM

La prova di laboratorio qui commentata (descritta nel paragrafo 2.5.1) ha come finalità la realizzazione di una coltura di *R. mucilaginosa* su scala più ampia rispetto a quelle condotte in multiwell. L'obiettivo principale di questa sperimentazione su terreno YM è la costruzione di una curva di crescita ricavata tramite il prelievo della biomassa a tempi di fermentazione crescenti.

Come primo aspetto si pone l'attenzione sull'andamento del pH misurato durante l'intero periodo di coltura di *Rhodotorula*. In accordo con i valori già osservati durante la prova in multiwell commentata nel paragrafo 3.4.1, la *Figura 3.5.1*, mostra che, partendo da un pH iniziale pari a circa 6,25, dopo 15 ore di fermentazione il parametro analizzato

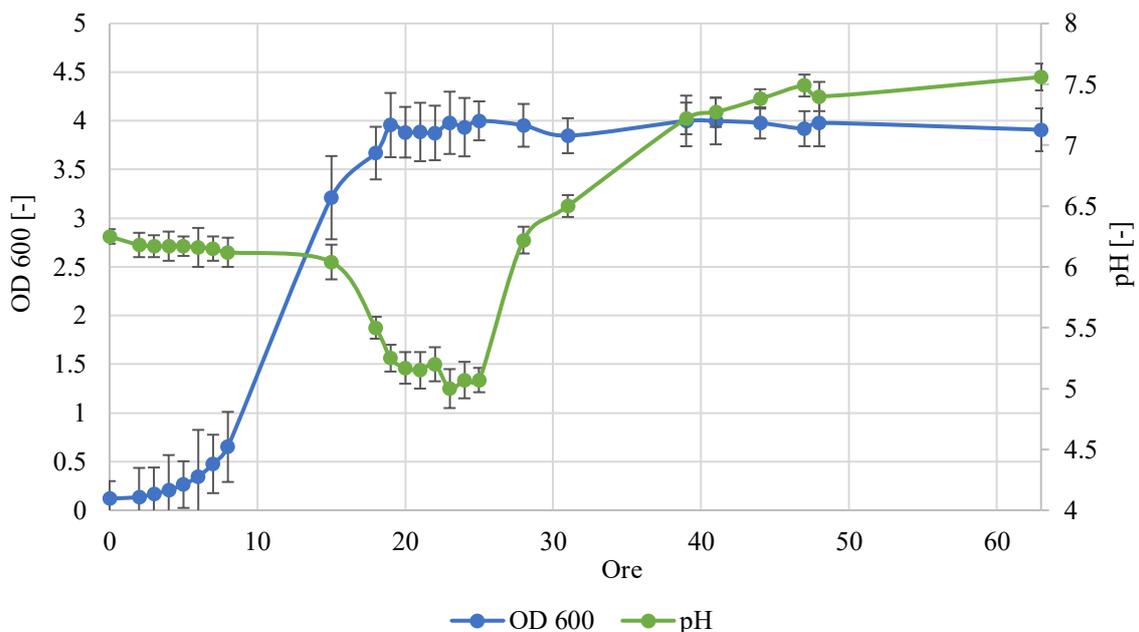


Figura 3.5.1 – Grafico dei valori di OD 600 e pH misurati nel corso della coltura in beuta contenente il terreno YM inoculato con *R. mucilaginosa*

diminuisce fino a raggiungere il valore di 5,0 (dopo 24 ore circa dall'inizio della coltura). Infine, dalle 24 alle 63 ore l'andamento è per lo più monotono crescente, stabilizzandosi nei dintorni di 7,56.

Per quanto riguarda la curva di crescita del lievito (*Figura 3.5.1*), tracciata misurando la densità ottica (OD 600) del brodo di coltura, si nota come dopo sole 20 ore di fermentazione *R. mucilaginosa* abbia raggiunto la fase stazionaria. In questa condizione, contrassegnata da un valore di OD 600 all'incirca costante (pari a 3,9), il numero di nuove cellule generate uguaglia quello relativo alle cellule morte. Inoltre, è importante osservare la durata della fase di latenza misurata in questa sperimentazione; essa risulta piuttosto lunga (circa 5 - 7 ore), malgrado l'utilizzo di un terreno ricco come YM e di un inoculo prelevato da piastre di Petri contenenti il medesimo terreno.

Parallelamente alle misurazioni spettrofotometriche di assorbanza, è stata valutata la concentrazione della biomassa prodotta nel corso della fermentazione tramite la separazione della stessa dal mezzo di coltura, come descritto nel paragrafo 2.5.1. I risultati ottenuti, espressi in seguito (*Tabella 3.5.1*), mostrano come la massima concentrazione di biomassa (14,14 g/L) si ottenga dopo 40 ore di coltura.

Durata coltura [h]	[g/V _{beuta}]	[g/L]
21	0,66 ± 0,005	3,67 ± 0,028
24	1,46 ± 0,008	8,36 ± 0,044
40	2,47 ± 0,011	14,14 ± 0,061

Tabella 3.5.1 – Concentrazione di biomassa secca (R. mucilaginosa) separata dal terreno di coltura YM dopo 21, 24 e 40 ore di fermentazione. Sono riportati i valori di concentrazione relativi al volume presente all'interno della singola beuta (180 mL circa) e per L di brodo

Nel corso della fermentazione, è stata osservata una variazione di colore del brodo di coltura piuttosto marcata; quest'ultimo, a seguito della produzione di carotenoidi, ha assunto una tonalità aranciata/rosata già dopo 24 ore, intensificatasi ulteriormente con il passare del tempo. Quanto appena descritto si può apprezzare nelle fotografie di *Figura 3.5.2*.

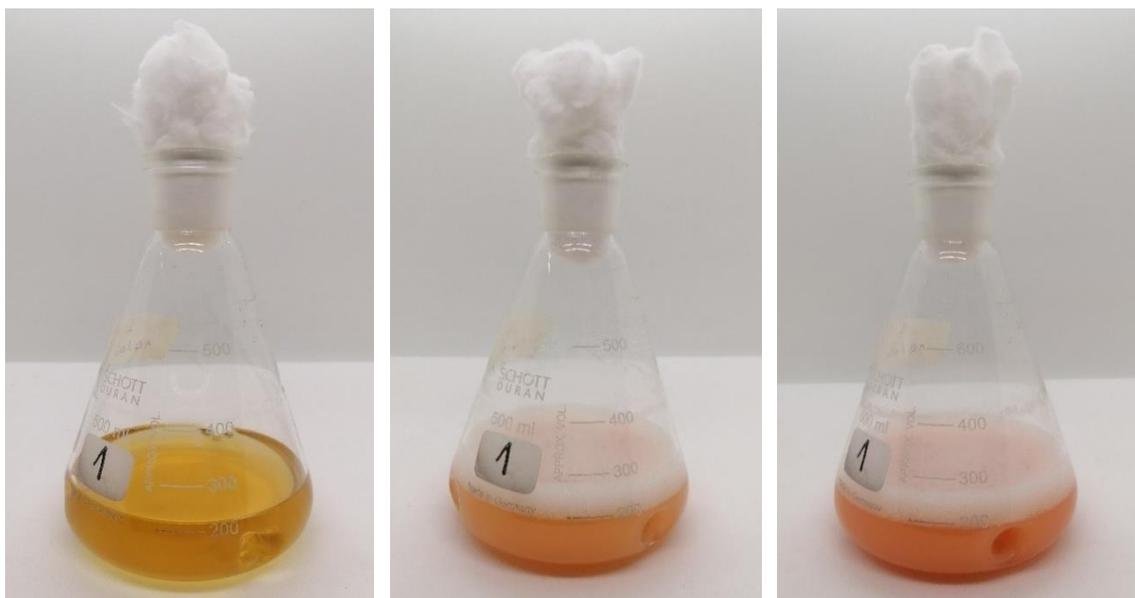


Figura 3.5.2 – Coltura di *R. mucilaginosa* in beuta su terreno YM con tempi di fermentazione crescenti da sinistra a destra: 0, 24 e 48 ore

La produzione di carotenoidi, responsabili dell'inconfondibile colorazione arancione, è osservata più chiaramente nel grafico di Figura 3.5.3, nel quale si evidenzia l'andamento di densità ottica (OD 490) relativo ai carotenoidi totali presenti in coltura. In questa rappresentazione grafica, si ha prova del fatto che tali pigmenti vengono ad accumularsi all'interno delle cellule di lievito (valore di OD pari a circa 3,4) già dopo 15 ore di fermentazione; tale valore misurato rimane all'incirca costante per tutta la durata della prova (72 ore).

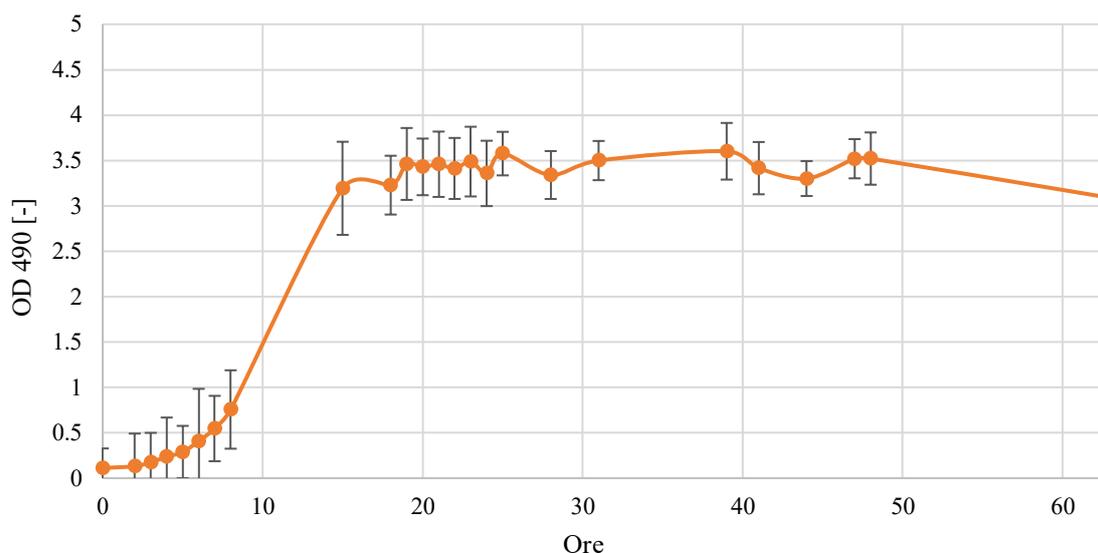


Figura 3.5.3 – Produzione dei carotenoidi (OD 490) relativa alla coltura in beuta contenente terreno YM inoculato con *R. mucilaginosa*

3.5.2 Coltura su estratti di BSG *Edit* e *Leumann*

Come descritto nel paragrafo 2.5.2 è stata effettuata una sperimentazione in beuta finalizzata a confrontare l'evoluzione delle due colture ottenute a partire dal BSG fornito dai birrifici *Edit* e *Leumann*, osservandone le differenze con quella cresciuta sul terreno ricco YM.

In una prima analisi qualitativa, servendosi della fotografia mostrata in *Figura 3.5.4*, si osserva che la colorazione esibita dalla beuta disposta nel centro (corrispondente alla coltura costituita da estratto di BSG *Edit*) risulta lievemente più spenta rispetto a quella caratteristica delle beute laterali; inoltre, tra queste ultime, è quella di destra (contenente il *medium* YM) a manifestare il colore arancione con maggiore intensità. A valle di questo ragionamento, è lecito ipotizzare che sia proprio quest'ultima coltura presa in considerazione a possedere il maggior quantitativo di carotenoidi. Tale fotografia è stata scattata dopo 65 ore di fermentazione.



Figura 3.5.4 – Coltura in beuta su estratti di BSG *Leumann* (a sinistra), *Edit* (in centro) e su terreno YM (a destra) dopo 65 ore di fermentazione

Il confronto tra le colture prosegue osservando i quantitativi di biomassa secca prelevata da ciascuna beuta rapportati al volume in esse contenuto (150 mL circa) e al litro di brodo. Si nota immediatamente come entrambe le colture costituite dagli estratti di BSG producano un quantitativo di biomassa per beuta nettamente inferiore (pari a 0,52 e 0,19 g rispettivamente per *Edit* e *Leumann*) rispetto a quella derivante dall'impiego del terreno YM (2,06 g). Inoltre, le trebbie di *Edit* hanno portato all'ottenimento di una coltura con concentrazione di biomassa più che doppia (3,49 g/L) rispetto a quella caratteristica del BSG *Leumann* (1,29 g/L). Quest'ultimo risultato denota la miglior

efficacia dell'estratto originato dal BSG *Edit* nell'offrire i substrati di cui *R. mucilaginosa* necessita per la crescita.

Medium di coltura	[g/V _{beuta}]	[g/L]
YM	2,06 ± 0,009	13,73 ± 0,060
<i>Edit</i>	0,52 ± 0,008	3,49 ± 0,053
<i>Leumann</i>	0,19 ± 0,011	1,29 ± 0,073

Tabella 3.5.2 – Concentrazione di biomassa secca (*R. mucilaginosa*) separata dal terreno di coltura YM dopo 65 ore di fermentazione. Sono riportati i valori di concentrazione relativi al volume presente all'interno della singola beuta (150 mL circa) e per L di brodo

3.5.3 Coltura su sciroppi di BSG Fornà

In accordo con quanto riportato nel paragrafo 2.5.3, si realizzano quattro linee colturali in beuta, caratterizzate dall'impiego di sciroppi di BSG *Fornà* con una composizione stabilita a seguito dei risultati ottenuti nella prova in multiwell precedente (DOE). Due delle suddette linee contengono rispettivamente gli sciroppi di BSG tal quale e addizionato di estratto di lievito e peptone, prodotti a partire da un'estrazione mediante shaker (24°C, 220 rpm per 2 ore); le altre due sono costituite da sciroppi di ugual formulazione, ottenuti però tramite estrazione in autoclave (121°C per 20 minuti).

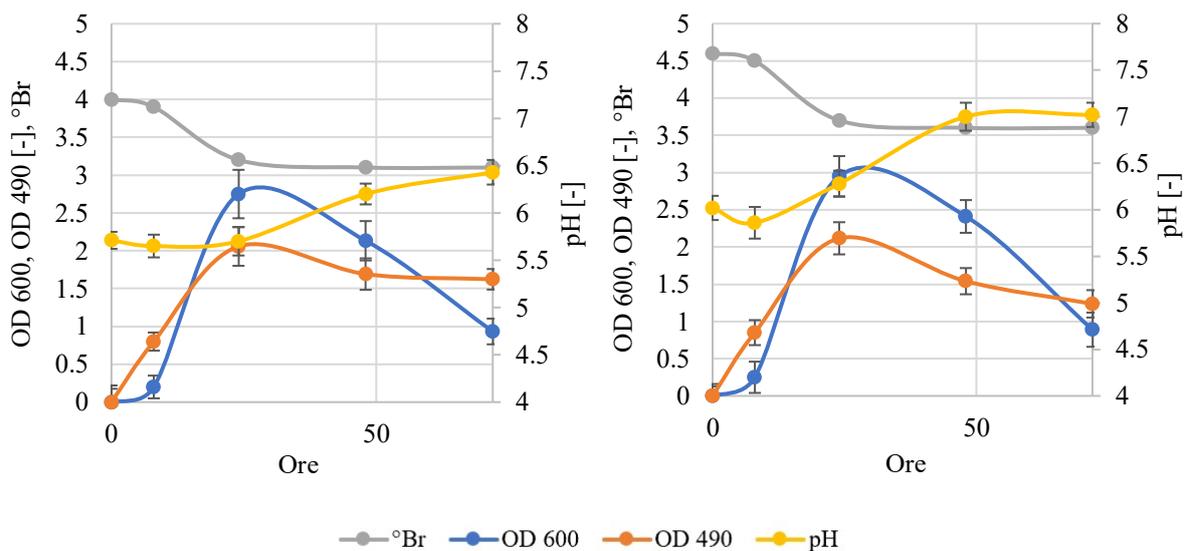


Figura 3.5.5 (a) – Grafico dei valori di densità ottica (OD 600), produzione di carotenoidi (OD 490), pH e °Br (espressi come Brix %) misurati nel corso della coltura in beuta contenente sciroppo di BSG Fornà t.q. (a sinistra) e addizionato di estratto di lievito e peptone (a destra), ottenuto mediante shaker

Nelle *Figure 3.5.5* si riportano gli andamenti generali connessi alla crescita e alla produzione di carotenoidi (valutati tramite densità ottica), nonché quelli relativi a pH e °Br. Si evince che le due colture presentate in *Figura 3.5.5 (a)* (i cui sciropi sono derivanti da estrazione in shaker) sono caratterizzate da curve di OD 600 piuttosto simili, aventi un picco in prossimità delle 24 ore con valore pari a 2,7 e 3,0 per lo sciropo rispettivamente t.q. (grafico di sinistra) e addizionato di estratto di lievito e peptone (grafico di destra). La curva di OD connessa con la produzione di carotenoidi, inoltre, presenta in entrambi i casi il medesimo andamento, contraddistinto da un valore di massimo prossimo a 2. Ciò che cambia maggiormente tra le due colture sono i valori di pH e °Br; il primo dei due parametri, infatti, misura valori (dopo 72 ore di fermentazione) pari a 6,4 e 7,0 per colture con sciropo rispettivamente t.q e addizionato. Similmente, il contenuto zuccherino iniziale dei due sistemi viene valutato pari a 4 (grafico di sinistra) e 4,6°Br (grafico di destra). Per quanto concerne la *Figura 3.5.5 (b)*, è possibile osservare andamenti molto simili a quelli appena commentati. Tuttavia, la differenza principale è connessa al fatto che le colture realizzate con sciropi prodotti mediante trattamento in autoclave (*Figura 3.5.5 (b)*) mostrano mediamente valori di densità ottica e °Br più elevati.

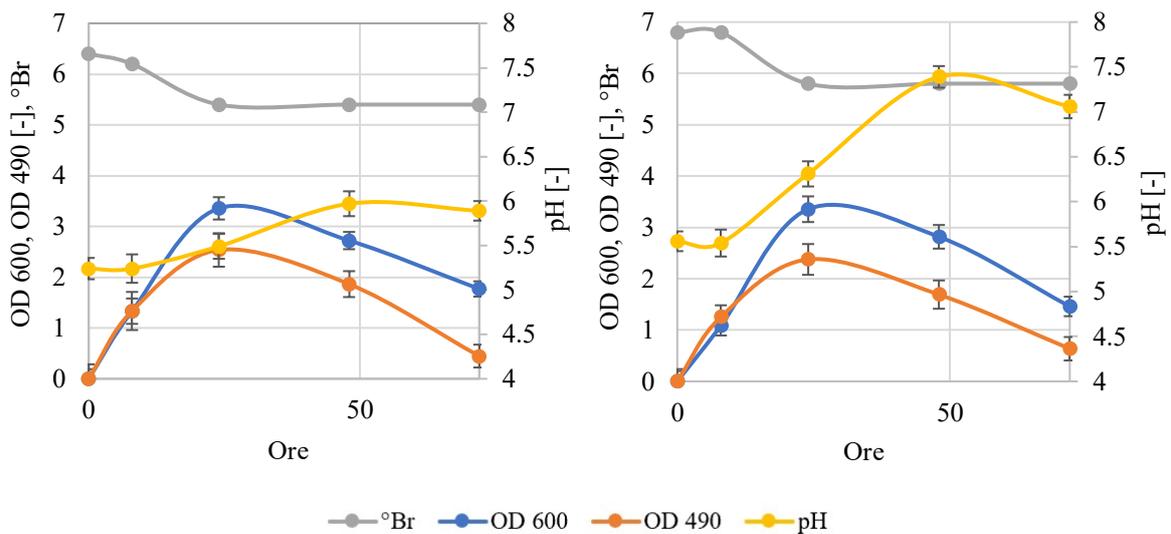


Figura 3.5.5 (b) – Grafico dei valori di **densità ottica** (OD 600), **produzione di carotenoidi** (OD 490), **pH** e **°Br (espressi come Brix %)** misurati nel corso della coltura in beuta contenente sciropo di BSG Forna t.q. (a sinistra) e addizionato di estratto di lievito e peptone (a destra), ottenuto mediante **autoclave**

In seguito, sono riportati alcuni grafici raffiguranti gli andamenti dei valori di pH, °Br, OD 600, OD 457 e OD 490, commentati con maggior dettaglio rispetto a quanto fatto precedentemente.

Iniziando dal primo di questa serie (*Figura 3.5.6*), il pH, si nota che le colture costituite da sciropo di BSG tal quale presentano un andamento lievemente oscillante, ciascuna delle quali caratterizzata da una variazione di valori inferiore al punto di pH.

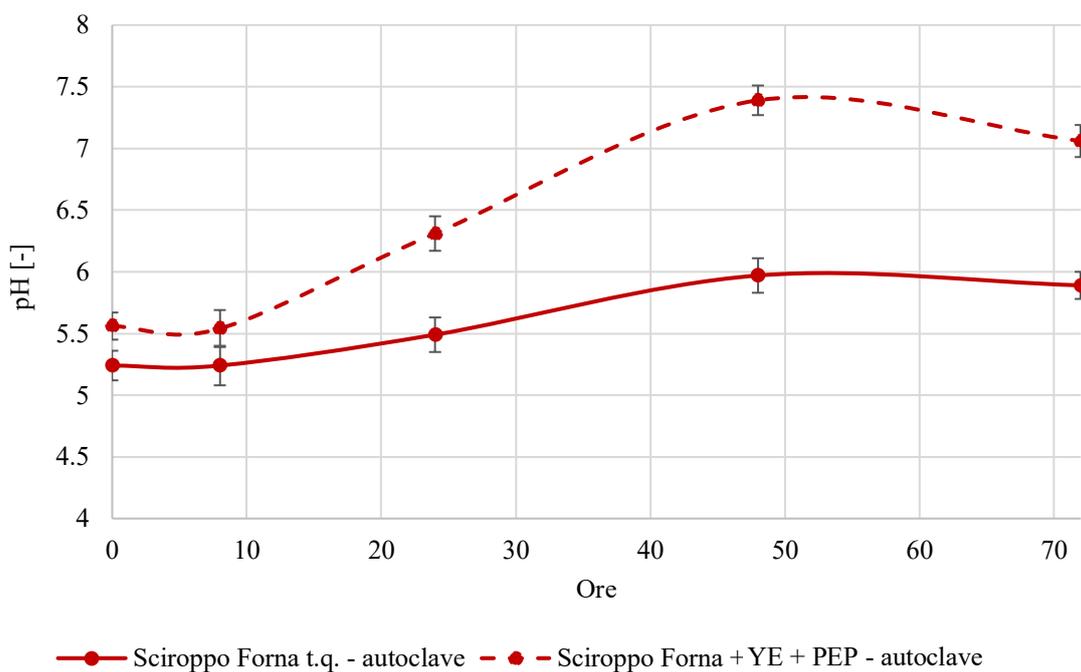
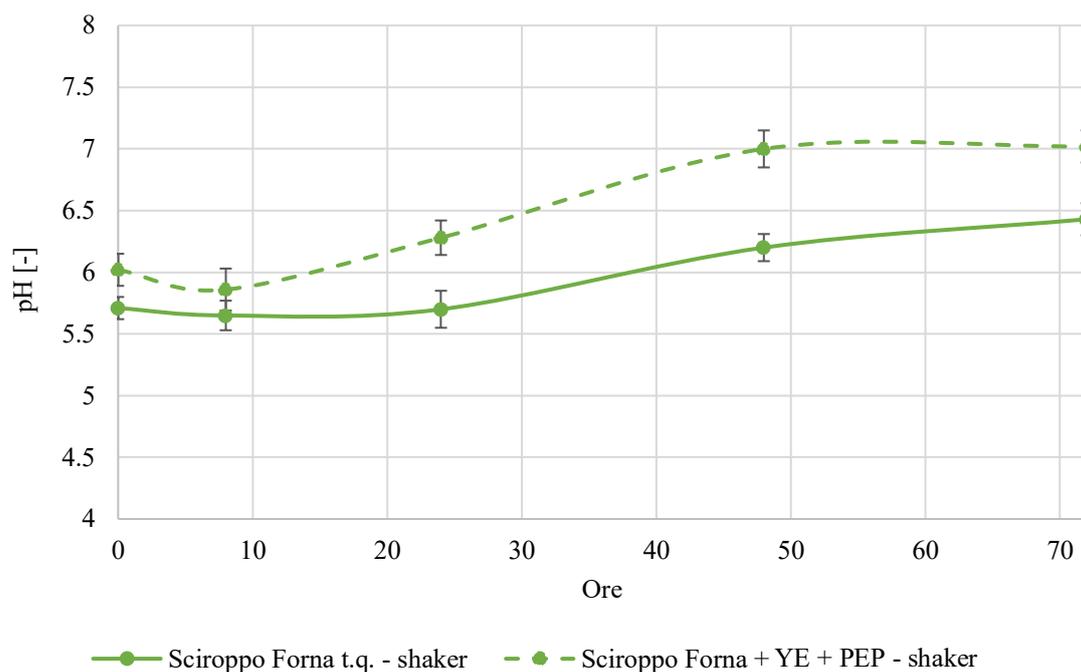


Figura 3.5.6 – Grafico dei valori di pH misurati nel corso delle colture in beuta, inoculate con *R. mucilaginosa*, contenenti gli sciropi di BSG Forna tal quali e addizionati di estratto di lievito e peptone. In alto sono raffigurati quelli ottenuti mediante estrazione in shaker (24°C, 220 rpm per 2 ore) e in basso attraverso l'estrazione in autoclave (121°C per 20 minuti)

Passando ad esaminare le colture addizionate, si evidenzia come, entrambi i casi raffigurati, siano contraddistinti da un andamento oscillante simile al precedente. Il pH, infatti, diminuisce leggermente nelle prime 8 - 10 ore (raggiungendo valori pari a 5,5 e 5,8 per sciroppi derivanti da estrazione rispettivamente in shaker e autoclave) per poi crescere oltre il valore di 7; si osserva, inoltre, che la coltura con sciroppo addizionato ottenuto a partire da estrazione in autoclave manifesta un'escursione di valori più ampia (quasi 2 punti di pH).

Ricordando che la produzione di carotenoidi è favorita da un pH pari a 5,5 (Cheng & Yang, 2016), si evince che lo sciroppo di BSG *Forna* tal quale potrebbe essere il più adatto per condurre una fermentazione (senza controllo di pH) volta all'ottenimento di tali pigmenti.

La *Figura 3.5.7* seguente, mostra gli andamenti del contenuto zuccherino (misurato tramite °Br) relativo a ciascuna coltura realizzata. In particolare, si nota che gli sciroppi prodotti tramite estrazione in autoclave (come già osservato nel paragrafo 3.4.3) sono caratterizzati da un contenuto glucidico iniziale più elevato (6,4 - 6,8°Br) rispetto agli sciroppi ottenuti a partire da estrazione in shaker (4,0 - 4,6°Br). Inoltre, indipendentemente dalla procedura di preparazione degli estratti, si evidenzia come quelli addizionati di estratto di lievito e peptone posseggano una quantità iniziale di zuccheri superiore (4,6 e 6,8°Br rispettivamente se prodotti con shaker o autoclave).

Un'ultima analisi verte sul consumo di tali carboidrati nel corso della fermentazione (72 ore); malgrado i valori rappresentativi di questi siano diversi in base alla formulazione dei terreni e alla procedura di estrazione utilizzata, si evidenzia che il loro consumo, con il procedere della coltura, rimane pressoché analogo: circa 1,0°Br. Ciò permette di ipotizzare che, sebbene il trattamento termico in autoclave permetta di ottenere uno sciroppo con un contenuto di zuccheri più elevato, solo una parte di essi è realmente metabolizzabile dal lievito, contribuendone alla crescita.

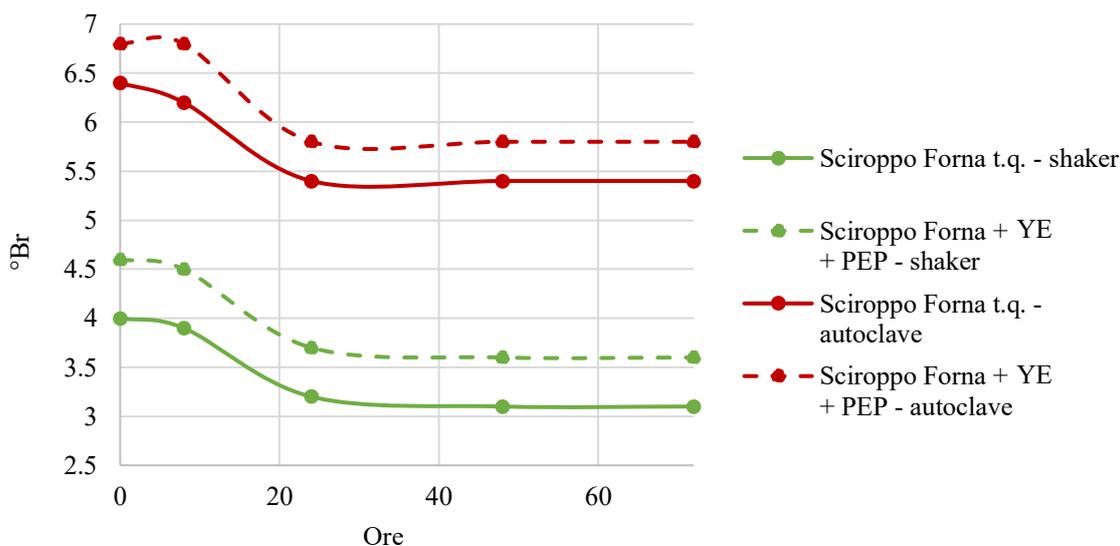


Figura 3.5.7 – Grafico dei valori di °Br (espressi come Brix %) misurati nel corso delle colture in beuta, inoculate con *R. mucilaginosa*, contenenti gli sciroppi di BSG *Forna* tal quali e addizionati di estratto di lievito e peptone

Per quanto riguarda la valutazione della densità ottica (OD 600) relativa alle colture prese in esame (*Figura 3.5.8*), si nota che i valori acquisiti dagli sciroppi realizzati tramite la medesima tecnica estrattiva sono molto simili tra loro; pertanto, l'aggiunta di estratto di lievito e peptone ai terreni di coltura non sembra promuovere in modo marcato la crescita cellulare di *R. mucilaginosa* in confronto con gli sciroppi tal quali. Inoltre, si osserva che tra questi ultimi, quelli prodotti mediante estrazione in autoclave presentano valori di OD 600 più elevati (quasi 3,5 dopo 24 ore di fermentazione), rispetto ai corrispondenti ottenuti tramite shaker (2,8).

Proseguendo il commento relativo al grafico di *Figura 3.5.8*, si evidenzia che, nelle prime 8 ore di fermentazione, le colture costituite da sciroppo derivante da estrazione in autoclave presentano una riduzione più marcata della fase di latenza (praticamente assente) del lievito; ciò non sembra altrettanto vero per lo sciroppo ottenuto tramite shaker in cui tale fase *lag* è caratterizzata da una durata di circa 6 ore.

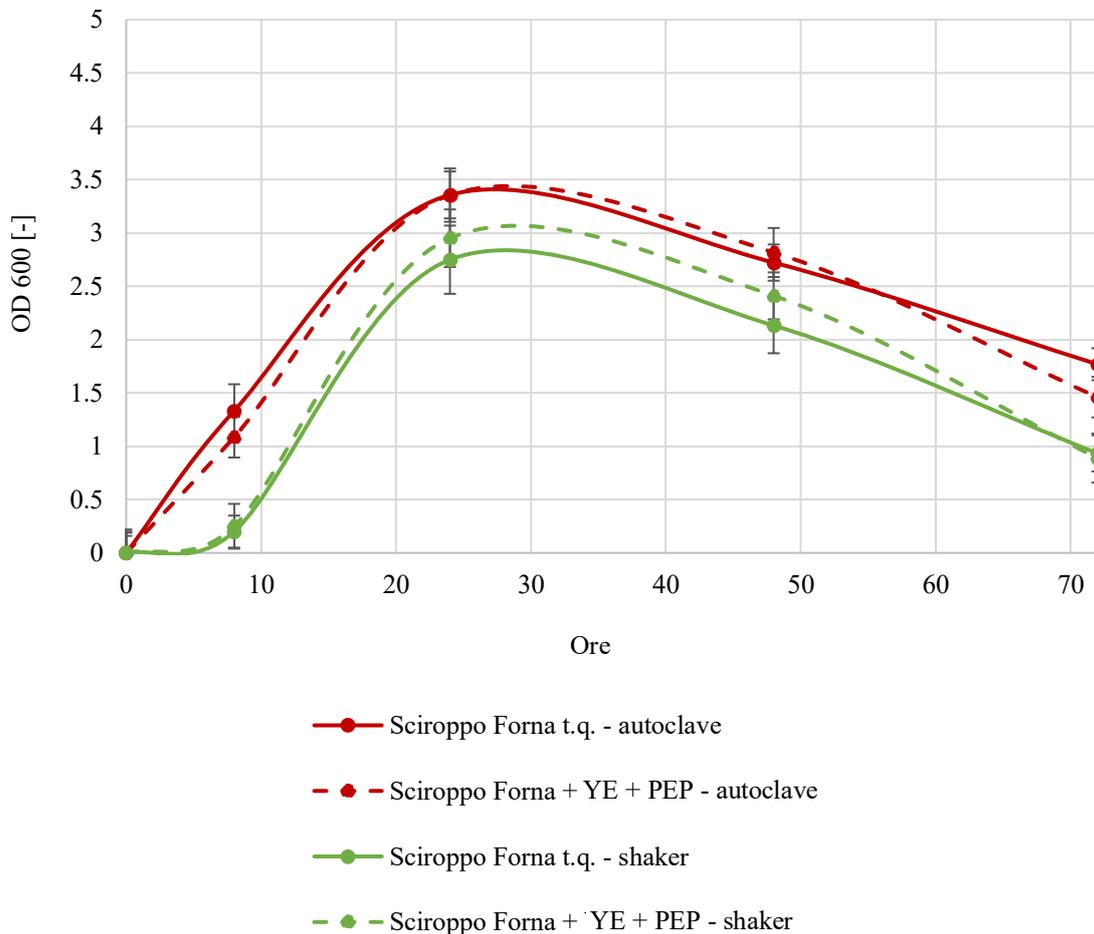


Figura 3.5.8 – Grafico dei valori di **densità ottica (OD 600)** misurati nel corso delle colture in beuta, inoculate con *R. mucilaginosa*, contenenti gli sciroppi di BSG *Forna* tal quali e addizionati di estratto di lievito e peptone. In verde sono raffigurati quelli ottenuti mediante estrazione in **shaker (24°C, 220 rpm per 2 ore)** e in rosso attraverso l'estrazione in **autoclave (121°C per 20 minuti)**

In ultima analisi, è possibile comparare gli andamenti relativi a questa prova in beuta con quelli osservati a seguito della sperimentazione in multiwell commentata nel paragrafo 3.4.3. Questi ultimi mostrano valori di OD 600 compresi tra 0,87 e 1,40 (dopo 72 ore di fermentazione); similmente, i dati raccolti nella presente prova in beuta, dopo il medesimo tempo di coltura, sono contenuti nell'intervallo 0,89 - 1,77. Si nota, quindi, che la crescita in beuta risulta più favorita; ciò si verifica, probabilmente, a causa della migliore miscelazione (garantita dall'utilizzo di beute dotate di frangiflutti laterali), nonché della più elevata superficie di contatto gas-liquido, in grado di promuovere il trasporto di ossigeno all'interno del *medium*, a cui le colture in beuta sono soggette.

Parallelamente alle misurazioni spettrofotometriche di assorbanza, è stato possibile valutare la concentrazione della biomassa prodotta nel corso delle fermentazioni tramite la separazione della stessa dai mezzi di coltura (procedura analoga a quella descritta nel paragrafo 2.5.1). I risultati ottenuti sono espressi nelle *Tabelle 3.5.3*.

Durata coltura [h]	[g/V _{beuta}]		[g/L]	
	Sciropo <i>Forna</i> t.q. da shaker	Sciropo <i>Forna</i> + YE + PEP da shaker	Sciropo <i>Forna</i> t.q. da shaker	Sciropo <i>Forna</i> + YE + PEP da shaker
24	0,59 ± 0,010	0,74 ± 0,009	3,30 ± 0,056	4,11 ± 0,050
48	0,91 ± 0,008	1,37 ± 0,010	5,03 ± 0,044	7,63 ± 0,056
72	0,64 ± 0,011	0,95 ± 0,007	3,57 ± 0,061	5,29 ± 0,039

Tabella 3.5.3 (a) – Concentrazione di biomassa secca (*R. mucilaginosa*) separata dalle colture a base di sciropo di BSG *Forna* (tal quale e addizionato) ottenuto tramite estrazione in **shaker** (24°C, 220 rpm per 2 ore) dopo 24, 48 e 72 ore di fermentazione. Sono riportati i valori di concentrazione relativi al volume presente all'interno della singola beuta (180 mL circa) e per L di brodo

Esaminando la tabella sopra riportata, si osserva che il massimo della biomassa prodotta (5,03 e 7,63 g/L), relativamente alla coltura costituita da sciropo derivante da estrazione in shaker, si ottiene in corrispondenza delle 48 ore. Inoltre, si nota che, in accordo con i valori di OD 600 rappresentati nella *Figura 3.5.8*, il lievito si riproduce maggiormente quando inoculato sullo sciropo di BSG *Forna* addizionato di estratto di lievito e peptone (concentrazione di biomassa secca pari a 7,63 g/L).

Quanto specificato all'interno delle righe precedenti rimane valido anche per le colture facenti uso dello sciropo di BSG prodotto a partire dall'estrazione in autoclave. È possibile prendere visione di ciò nella *Tabella 3.5.3 (b)* sottostante, in cui si evidenzia che il beneficio di aggiungere estratto di lievito e peptone allo sciropo è avvertibile (concentrazione di biomassa secca pari a 6,16 g/L), ma meno fruttuoso rispetto al caso esaminato in precedenza (*Tabella 3.5.3 (a)*).

Durata coltura [h]	[g/V _{beuta}]		[g/L]	
	Sciropo <i>Forna</i> t.q. da autoclave	Sciropo <i>Forna</i> + YE + PEP da autoclave	Sciropo <i>Forna</i> t.q. da autoclave	Sciropo <i>Forna</i> + YE + PEP da autoclave
24	0,56 ± 0,006	0,73 ± 0,010	3,12 ± 0,033	4,07 ± 0,056
48	0,96 ± 0,009	1,11 ± 0,008	5,31 ± 0,050	6,16 ± 0,044
72	0,69 ± 0,009	0,91 ± 0,011	3,84 ± 0,050	5,04 ± 0,061

Tabella 3.5.3 (b) – Concentrazione di biomassa secca (*R. mucilaginosa*) separata dalle colture a base di sciropo di BSG *Forna* (tal quale e addizionato) ottenuto tramite estrazione in **autoclave (121°C per 20 minuti)** dopo 24, 48 e 72 ore di fermentazione. Sono riportati i valori di concentrazione relativi al volume presente all'interno della singola beuta (180 mL circa) e per L di brodo

Confrontando i valori di concentrazione di biomassa per litro di coltura con quanto riportato in letteratura (*Tabella 3.5.4*), si evince che la sperimentazione ha portato a risultati in accordo con quanto ottenuto da Cheng & Yang (2016), i quali hanno realizzato una coltura in beuta (mantenuta a 25°C per 216 ore) raggiungendo una concentrazione di biomassa pari a circa 7,8 g/L. Anche Rodrigues et al. (2019) hanno portato a termine una sperimentazione caratterizzata da una produzione di biomassa simile; nello specifico, tale prova di laboratorio, basata su una fermentazione *batch* in beuta (protratta per 144 ore), ha permesso di ottenere una concentrazione di lievito pari a 7,9 g/L. Entrambi i risultati tratti da letteratura sono confrontabili con i valori di concentrazione raggiunti nella presente prova (dopo 48 ore di coltura) pari rispettivamente a 7,63 e 6,16 g/L in base alla tipologia di sciropo impiegato.

Sciropo <i>Forna</i> + YE + PEP da shaker	Sciropo <i>Forna</i> + YE + PEP da autoclave	Cheng & Yang (2016)	Rodrigues et al. (2019)
7,63 g/L	6,16 g/L	7,8 g/L	7,9 g/L

Tabella 3.5.4 – Massima concentrazione di biomassa secca (*R. mucilaginosa*), separata dalle colture a base di sciropo di BSG *Forna* (addizionato di YE e PEP), confrontata con i risultati di letteratura

Nella *Figura 3.5.9* seguente sono raffigurate le quattro linee culturali al fine di valutarne le colorazioni assunte nel corso della fermentazione; da queste (fotografate al momento dell'inoculo, dopo 24 e 48 ore) si nota che le due linee costituite dagli sciropi tal quali, rispettivamente prodotti tramite shaker e autoclave, si tingono di rosa già dopo un giorno di fermentazione; viceversa, le altre due, addizionate di estratto di lievito e peptone, necessitano di almeno 48 ore per manifestare tale colorazione. Si evidenzia, inoltre, che a causa del secondo trattamento termico a cui sono sottoposte, le colture

contenenti gli sciroppi ottenuti mediante estrazione in autoclave esibiscono un colore bruno, dovuto al verificarsi delle reazioni di *Maillard* favorite ad alta temperatura.



Figura 3.5.9 – Coltura in beuta su sciroppo di BSG *Forna* **dopo 0** (riga in alto), **24** (riga di mezzo) e **48** (riga in basso) **ore di fermentazione**; nelle colonne a sinistra vi sono le colture aventi sciroppi tal quale e addizionato ottenuti mediante estrazione in shaker; in quelle di destra le colture aventi sciroppi tal quale e addizionato ottenuti mediante estrazione in autoclave

La produzione di carotenoidi, responsabili dell'inconfondibile colorazione rosata, è osservata più chiaramente nei grafici seguenti, nei quali si evidenzia l'andamento di densità ottica (OD 490) relativo ai carotenoidi totali presenti nelle colture analizzate.

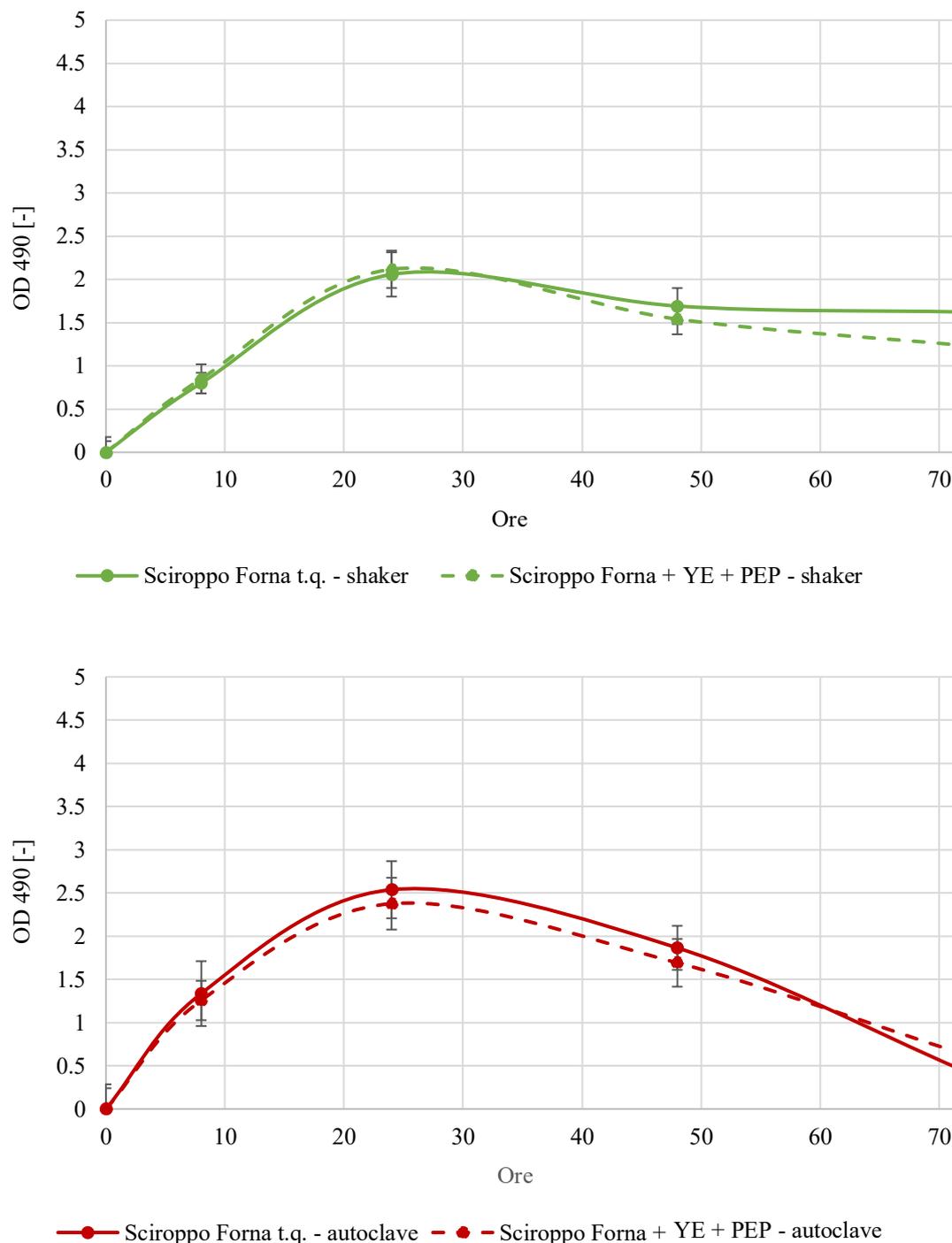


Figura 3.5.10 – Produzione dei carotenoidi (OD 490) misurata nel corso delle colture in beuta, inoculate con *R. mucilaginosa*, contenenti gli sciropi di BSG Forna tal quali e addizionati di estratto di lievito e peptone. In alto sono raffigurati quelli ottenuti mediante estrazione in shaker (24°C, 220 rpm per 2 ore) e in basso attraverso l'estrazione in autoclave (121°C per 20 minuti)

In *Figura 3.5.10* si nota chiaramente che, a parità di metodo di preparazione degli estratti, non vi sono particolari differenze tra l'utilizzo degli sciroppi tal quali o addizionati di estratto di lievito e peptone. Ciò che appare diverso, invece, sono i valori di assorbanza relativi ai due sciroppi derivanti da estrazione in shaker (dopo 72 ore di fermentazione) rispetto ai corrispondenti ottenuti mediante autoclave. I primi citati (preparati in shaker) mantengono un dato di OD 490 poco distante da 1,5, mentre per i secondi (prodotti in autoclave) il valore diminuisce fino a circa 0,5. Tale andamento potrebbe essere riconnesso ad una diminuzione del quantitativo di biomassa (dopo 72 ore di fermentazione) limitata alle sole colture costituite da sciroppo ottenuto tramite estrazione in autoclave. Tuttavia, osservando le *Tabelle 3.5.3*, si evince che tale diminuzione del numero di cellule colpisce in ugual misura tutte e quattro le linee colturali; pertanto, dalla presente riflessione appare evidente come questa misurazione di OD 490 (in corrispondenza delle 72 ore) non goda di particolare significatività. In ultimo, si evidenzia il valore massimo, ottenuto a 24 ore di coltura, risultante più elevato nelle linee colturali preparate con sciroppo derivante da estrazione in autoclave (circa 2,5) rispetto a quelle ottenute tramite shaker (2,1).

A valle delle considerazioni effettuate circa i risultati ottenuti nelle colture in beuta, facenti uso degli sciroppi di BSG *Forna*, si può evidenziare come l'utilizzo dello sciroppo ottenuto mediante estrazione in autoclave si configuri come il miglior compromesso per promuovere sia la crescita di *R. mucilaginoso*, sia la produzione di carotenoidi. Inoltre, questo sciroppo è di più facile ottenimento rispetto a quello derivante da estrazione in shaker a causa dei limitati volumi che quest'ultimo è in grado di trattare. Poiché non si è riscontrata particolare differenza nell'utilizzo di tale sciroppo da autoclave tal quale o addizionato di estratto di lievito e peptone, al fine di limitare i costi produttivi, si decide di considerare lo sciroppo privo di aggiunte (tra quelli presentati) come il più idoneo per la realizzazione di una coltura in bioreattore.

Le caratteristiche delle colture facenti uso dello sciroppo di BSG *Forna* t.q. (ottenuto attraverso estrazione in autoclave) sono riportate nella *Figura 3.5.11*, nella quale si riassumono i valori di OD 600, OD 490, concentrazione di biomassa e pH misurati nel corso della prova.

Con l'aiuto della *Figura 3.5.11*, si ricorda brevemente quanto già commentato in precedenza relativamente alle curve di crescita, produzione di carotenoidi, concentrazione di biomassa e pH. Gli andamenti di OD 600 e OD 490 presentano un valore massimo in corrispondenza delle 24 ore di coltura pari rispettivamente a 3,4 e 2,5; entrambi, però, con il proseguire della prova tendono a diminuire portandosi dopo 72 ore a 1,8 e 0,4. La concentrazione della biomassa evolve con un andamento simile a quelli appena esaminati; tuttavia, questa mostra il suo massimo in corrispondenza delle 48 ore di fermentazione, raggiungendo una concentrazione pari a circa 5,3 g/L, per poi diminuire fino a 3,8 g/L al termine della prova (72 ore). In ultima analisi, si nota come i valori misurati di pH rimangano abbastanza stabili, variando in range compreso tra 5,2 e 5,9: intervallo ottimale per la produzione di carotenoidi (Cheng & Yang, 2016).

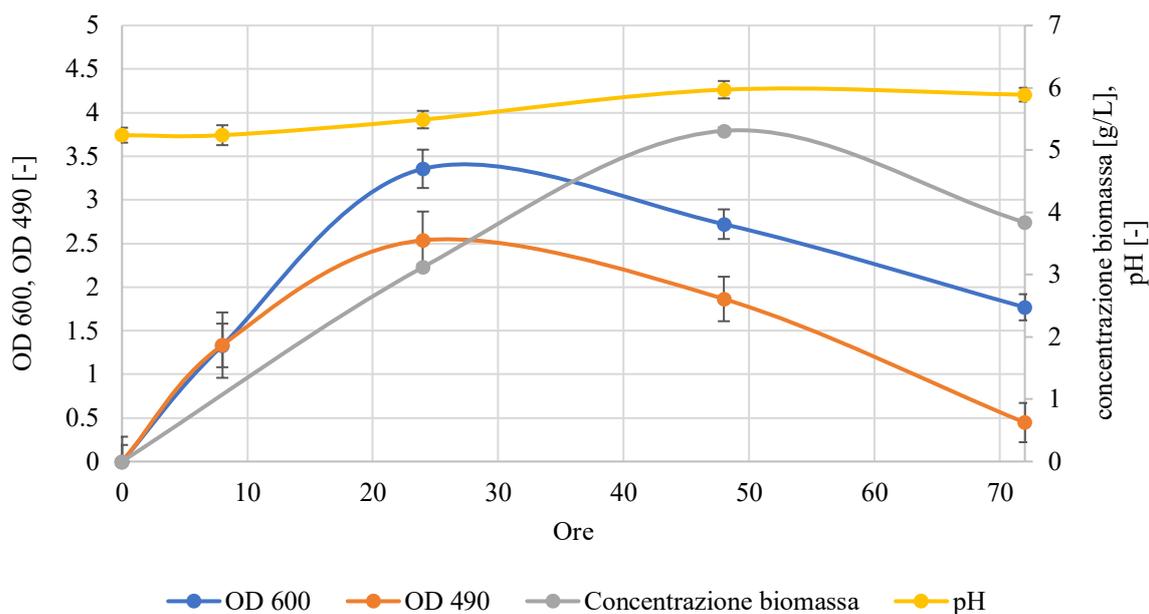


Figura 3.5.11 – Grafico dei valori di densità ottica (OD 600), produzione di carotenoidi (OD 490), concentrazione di biomassa e pH misurati nel corso della coltura in beuta, inoculata con *R. mucilaginosa*, contenenti lo sciroppo di BSG *Forna* tal quale ottenuto mediante estrazione in autoclave (121°C per 20 minuti)

3.6 Coltura in bioreattore

Come specificato nel paragrafo 2.6, sono state preparate due colture in fermentatore al fine di valutare le differenze – circa la crescita di *R. mucilaginosa* e la produzione di carotenoidi - connesse alla variazione di alcune condizioni operative. Lo sciroppo tal quale, adottato nelle presenti prove in reattore, è stato ottenuto mediante estrazione in autoclave (121°C per 20 minuti). Questa scelta deriva da molteplici considerazioni:

- Il contenuto zuccherino di tale sciroppo è più elevato rispetto a quello derivante da shaker;
- Dalle prove in beuta non si è riscontrata molta differenza sia nella crescita microbica, sia nella produzione di carotenoidi tra gli sciroppi tal quali e addizionati di estratto di lievito e peptone;
- Essendo tale sciroppo derivante da un prodotto di scarto (il BSG), è bene limitare i costi connessi alle aggiunte di estratto di lievito e peptone;
- Il pH del terreno tal quale ottenuto da estrazione in autoclave manifesta una variazione limitata nel corso della fermentazione, rimanendo attorno al valore di 5,5;
- Il processo di estrazione del BSG in autoclave è più facile da condurre, sebbene sia più costoso in termini energetici.

Si riassumono nelle *Tablelle 3.6.1* e *3.6.2* le principali caratteristiche, nonché le condizioni operative, relative a ciascuna delle due prove realizzate. Inoltre, nei grafici rappresentati nelle *Figure 3.6.1* e *3.6.2* si evidenziano gli andamenti di OD 600, OD 490, pH e °Br misurati nel corso delle colture.

	PROVA 1
Processo	Fermentazione in bioreattore
Tipo di microrganismo	<i>R. mucilaginosa</i> CBS316
Terreno di coltura	Scioppo di BSG <i>Forna</i> t.q. ottenuto mediante estrazione in autoclave (121°C per 20 minuti)
Tipo di inoculo	Inoculo da precoltura in beuta su YM
Modalità di coltura	<i>batch</i>
Volume di lavoro	3,5 L
Inoculo	10 % v/v
OD inoculo (600 nm)	0,8 < OD 600 < 1,0
Controllo pH	NO
Controllo di Temperatura	25 ± 0,2 °C
Agitazione	150 rpm
Portata di aerazione (sparger)	50 L/h diminuiti a 20 L/h dopo 24 ore
pO ₂ iniziale	0 %

Tabella 3.6.1 – Caratteristiche principali e condizioni operative di fermentazione relative alla **PROVA 1** in bioreattore

La *Figura 3.6.1* mostra a livello generale gli andamenti di OD 600, OD 490, pH e °Br, dai quali si evidenzia come le curve di OD (rispettivamente 600 e 490) tendano a stabilizzarsi (dopo 24 ore di fermentazione) in corrispondenza di 1,7 e 1,0; inoltre, si nota, in questa prima prova, che la fase di latenza presenta una durata di circa 6 ore. Ciò è

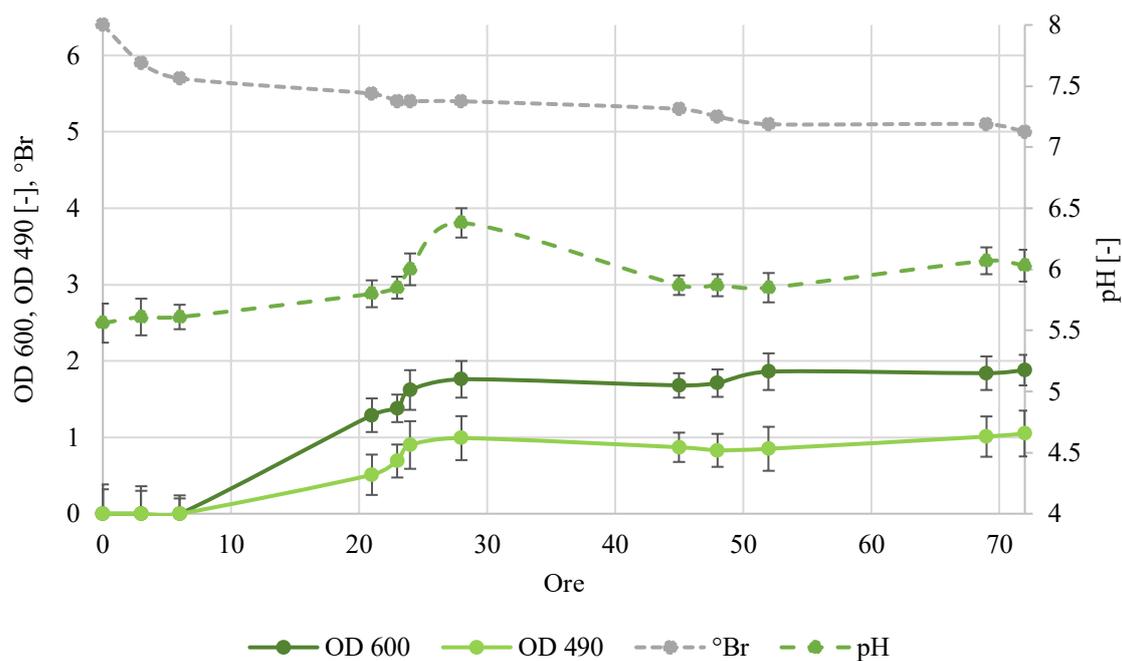


Figura 3.6.1 – Grafico dei valori di densità ottica (OD 600), produzione di carotenoidi (OD 490), pH e °Br misurati nel corso della coltura in bioreattore (PROVA 1)

imputabile probabilmente alla mancata aerazione iniziale del *medium*. Per quanto riguarda la curva descrittiva delle misurazioni di pH, è possibile osservare come queste ultime evolvano nel corso della prova con un andamento mediamente crescente, caratterizzato da un massimo pari a 6,4 (raggiunto dopo quasi 28 ore). In ultimo, i °Br, a partire da un valore di 6,4, decrescono portandosi a 5,0 al termine della prova.

	PROVA 2
Processo	Fermentazione in bioreattore
Tipo di microrganismo	<i>R. mucilaginosa CBS316</i>
Terreno di coltura	Sciropo di BSG <i>Forna</i> t.q. ottenuto mediante estrazione in autoclave (121°C per 20 minuti)
Tipo di inoculo	Inoculo da precoltura in beuta su YM
Modalità di coltura	<i>batch</i>
Volume di lavoro	2,2 L
Inoculo	10 % v/v

OD inoculo (600 nm)	1,38
Controllo pH	NO
Controllo di Temperatura	25 ± 0,2 °C
Agitazione	125 rpm
Portata di aerazione (sparger)	200 L/h diminuiti a 100 L/h dopo 8 ore
pO ₂ iniziale	100 %

Tabella 3.6.2 – Caratteristiche principali e condizioni operative di fermentazione relative alla **PROVA 2** in bioreattore

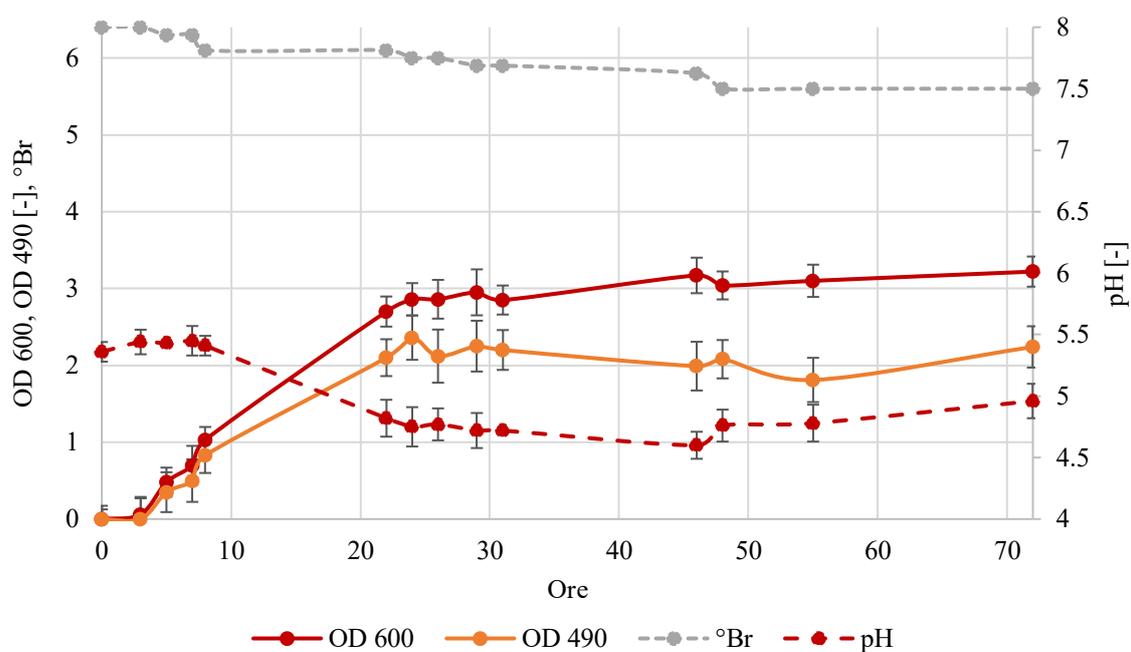


Figura 3.6.2 – Grafico dei valori di densità ottica (OD 600), produzione di carotenoidi (OD 490), pH e °Br misurati nel corso della coltura in bioreattore (**PROVA 2**)

Similmente a quanto evidenziato per la PROVA 1, la Figura 3.6.2 mostra come nella PROVA 2 le curve di OD (rispettivamente 600 e 490) tendano a stabilizzarsi (dopo 24 ore di fermentazione) in corrispondenza di 2,9 e 2,2; Inoltre, si osserva che, in questa coltura, caratterizzata dall'utilizzo di un *medium* inizialmente saturo di O₂, la fase di latenza presenta una durata di circa 3 ore. Passando alla valutazione dei valori di pH, è possibile osservare come questi varino, nel corso della prova, seguendo un andamento

contraddistinto da un minimo pari a 4,6 (raggiunto dopo circa 46 ore). In ultimo, i °Br, a partire da un valore di 6,4, decrescono portandosi a 5,6 al termine della prova.

A valle di queste considerazioni generali, si procede con il confronto tra le due prove realizzate, mettendone in luce le principali differenze.

Osservando la *Figura 3.6.3*, mostrante gli andamenti relativi ai valori di pH misurati, si evidenzia come questi siano piuttosto diversi per le due colture in reattore. Tra queste ultime, la PROVA 2 presenta una curva di pH stabile per le prime 8 ore di fermentazione e decrescente nelle successive 40 ore, fino al raggiungimento del valore 4,6; a seguito di tale minimo si assiste ad una risalita fino a 4,96 (dopo 72 ore), dato poco distante da quello di partenza. Differente è invece il trend osservato nella PROVA 1. Questo è caratterizzato da un lieve incremento del pH nelle prime 24 ore a seguito del quale si presenta un massimo pari a 6,38 (dopo 28 ore di coltura); quindi, il valore misurato si stabilizza attorno a 6 fino al termine della prova. È possibile che la limitazione di ossigeno caratteristica di quest'ultima sperimentazione citata possa aver causato una variazione del metabolismo di *R. mucilaginosa*, manifestata attraverso l'andamento di pH presentato in verde nella *Figura 3.6.3*.

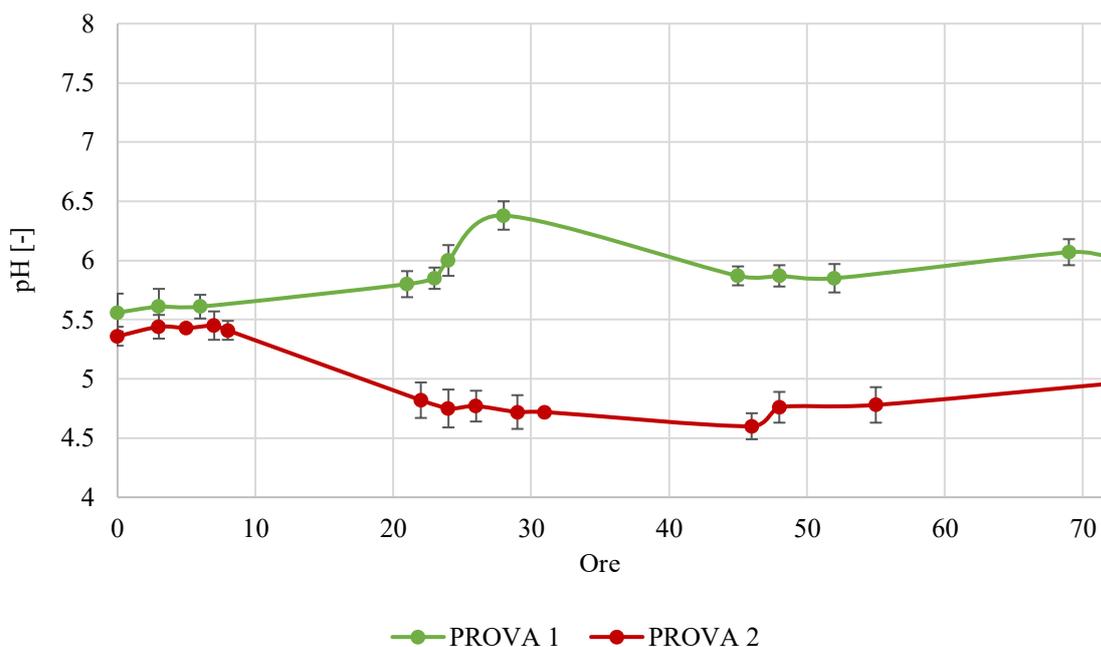


Figura 3.6.3 – Grafico dei valori di pH misurati nel corso delle colture in bioreattore contenenti lo sciroppo di BSG *Forna* t.q. (ottenuto mediante estrazione in autoclave) inoculato con *R. mucilaginosa*

Soffermandosi ora sulle misurazioni del contenuto zuccherino relativo a ciascuna fermentazione (*Figura 3.6.4*), si nota che il consumo di carboidrati, valutato tramite °Br, risulta più marcato nella coltura contraddistinta dalla minor portata di aria (PROVA 1). Infatti, sebbene il *medium* di coltura risulti il medesimo (6,4°Br iniziali), il valore raggiunto al termine della prova differisce di circa mezzo punto (5,0 e 5,6 rispettivamente per PROVA 1 e 2).

Volendo effettuare un confronto con quanto osservato nel corso della sperimentazione in beuta commentata nel paragrafo 3.5.3, si evidenzia che nella coltura precedente i °Br diminuiscono di un punto portandosi a 5,4 (*Figura 3.5.7*, sciroppo *Forna* t.q. - autoclave), similmente a quanto riscontrato nella prova in reattore; inoltre, tale diminuzione avviene nelle prime 24 ore di coltura, mentre nel caso dei due esperimenti in reattore il decremento di °Br risulta più graduale.

L'andamento di pH riscontrato in beuta nella *Figura 3.5.6* (sciroppo *Forna* t.q. - autoclave), pare più vicino a quello osservato nella coltura in reattore relativa alla PROVA 1 (curva verde), a meno del picco rilevato in corrispondenza delle 28 ore di fermentazione.

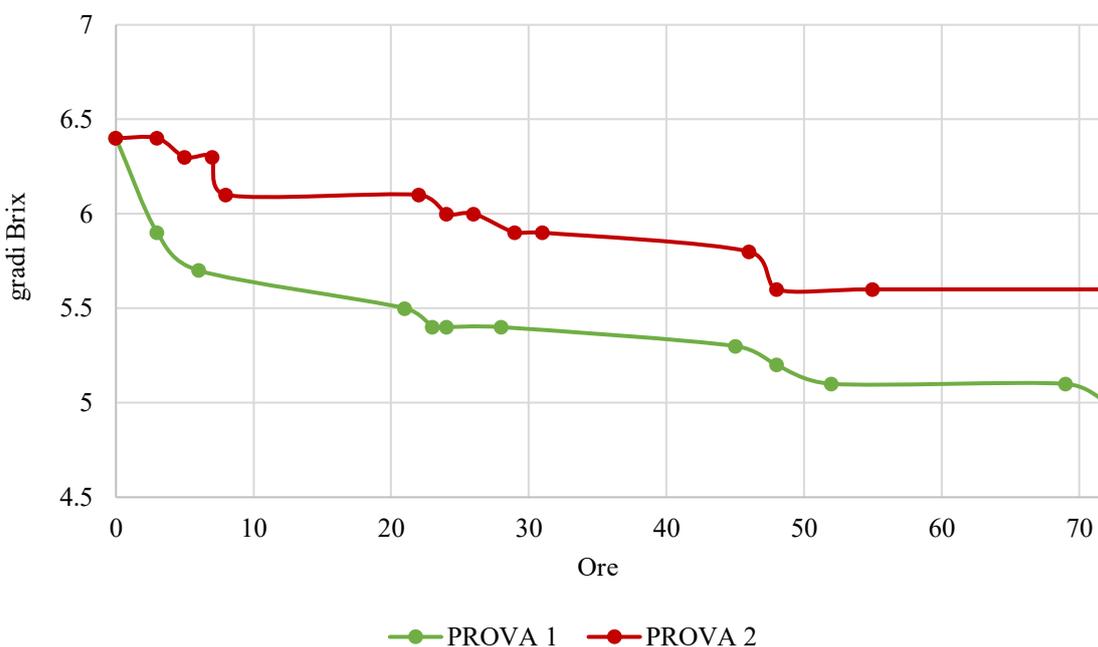


Figura 3.6.4 – Grafico dei valori di **gradi Brix** misurati nel corso delle colture in bioreattore contenenti lo sciroppo di BSG *Forna* t.q. (ottenuto mediante estrazione in autoclave) inoculato con *R. mucilaginosa*

Nel corso delle sperimentazioni, come già annunciato in precedenza, si è provveduto alla misurazione della densità ottica (OD 600) al fine di tracciare una curva di crescita relativa a ciascuna delle due colture in bioreattore. Il risultato di tale analisi è rappresentato nella *Figura 3.6.5* seguente, la quale mostra chiaramente come l'aumento del numero di cellule di lievito sia avvenuto in maniera preponderante solamente nel caso di una delle due prove. Entrando nei dettagli del grafico, si evidenzia che la fase di latenza corrispondente alla coltura saturata di O₂ fin dal principio (PROVA 2) è ridotta di circa la metà (curva rossa) rispetto a quella privata di tale aerazione (PROVA 1), misurando una durata rispettivamente di 3 e 6 ore. Spostandosi verso tempi superiori, si nota che la velocità di crescita avanza con una pendenza superiore nel caso della PROVA 2, contraddistinta dal grafico rosso, fino al raggiungimento di un valore di OD pari a 2,86 (dopo 24 ore di fermentazione); per quanto concerne la PROVA 1 (curva verde), tale

parametro evolve fino a 1,76. Questo risultato, così diverso per le due colture, trova una spiegazione nelle condizioni operative adottate. Infatti, oltre all'effetto dell'aerazione, giocante un ruolo fondamentale nella riduzione della fase *lag*, anche l'utilizzo di un inoculo più concentrato (limitato alla PROVA 2), con densità ottica pari a 1,38, ha determinato una crescita più rapida, caratterizzata da un numero maggiore di cellule. In ultimo, si osserva che dopo 24 ore *R. mucilaginosa* raggiunge in entrambe le colture la fase stazionaria, caratterizzata da un valore di densità ottica (1,7 e 2,9 rispettivamente per PROVA 1 e PROVA 2) all'incirca costante nel tempo.

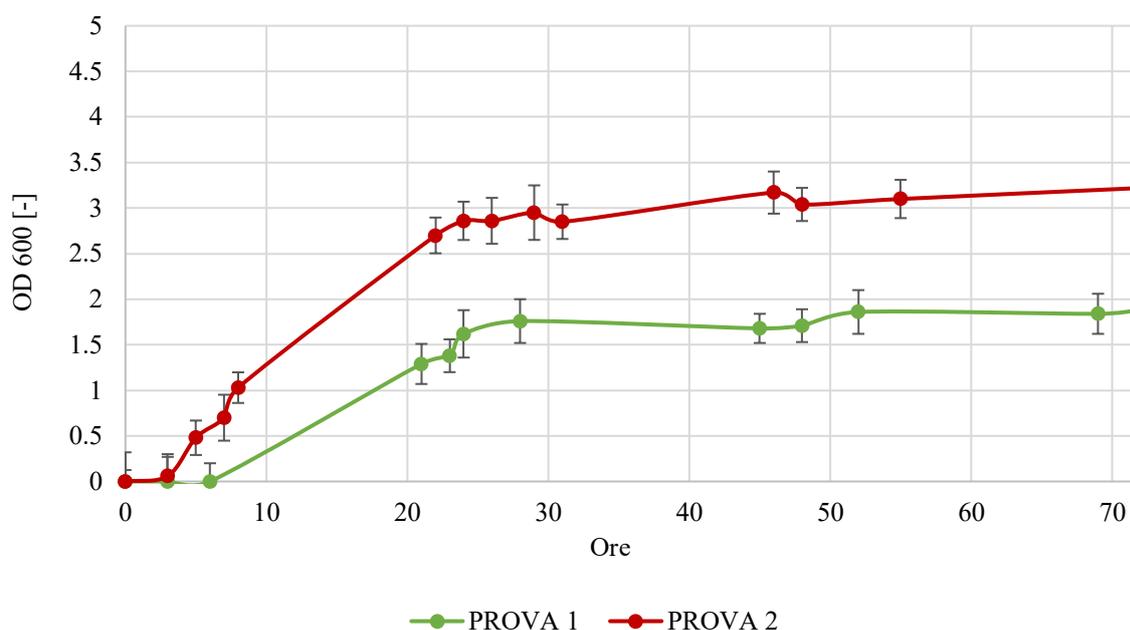


Figura 3.6.5 – Grafico dei valori di **densità ottica (OD 600)** misurati nel corso delle colture in bioreattore contenenti lo sciroppo di BSG *Forna* t.q. (ottenuto mediante estrazione in autoclave) inoculato con *R. mucilaginosa*

In aggiunta alla misurazione dei valori di assorbanza (OD 600) riportati in precedenza, è stata recuperata la biomassa rispettivamente dopo 24, 48 e 72 ore dall'inizio delle due prove condotte, al fine di valutarne la variazione di concentrazione nel tempo. Nella *Tabella 3.6.3* è riportato l'esito di questa analisi.

	Concentrazione di biomassa secca [g/L]	
Durata coltura [h]	PROVA 1	PROVA 2
24	1,14 ± 0,045	1,14 ± 0,033
48	1,49 ± 0,036	2,11 ± 0,048
72	1,73 ± 0,052	4,29 ± 0,043

Tabella 3.6.3 – Concentrazione di biomassa secca (*R. mucilaginosa*) separata dalle colture in bioreattore a base di sciroppo di BSG *Forna* t.q. (ottenuto mediante estrazione in autoclave) dopo 24, 48 e 72 ore di fermentazione.

In tabella si mettono in evidenza le concentrazioni di biomassa secca recuperata applicando il protocollo descritto nel paragrafo 2.5.1. In accordo con le curve di crescita analizzate in precedenza, si osserva la differenza tra i valori di concentrazione caratteristici delle due prove. Trascorse 24 ore di fermentazione, il quantitativo di biomassa presente per litro di coltura appare pressoché il medesimo; tuttavia, con il procedere del tempo, il divario tra la concentrazione di biomassa relativa ai due sistemi diventa sempre più evidente. In particolare, al termine della sperimentazione (dopo 72 ore), la coltura maggiormente ossigenata (PROVA 2) è in grado di generare quasi il triplo della biomassa (circa 4,29 g/L) rispetto a quella prodotta nel corso della PROVA 1 (solo 1,73 g/L).

Confrontando tale risultato con quello ricavato dalla corrispondente prova in beuta, approfondita nel paragrafo 3.5.3, si nota come in quest'ultima la concentrazione di biomassa sia superiore (5,31 g/L dopo 48 ore) rispetto a quanto ottenuto a seguito dello *scale-up* in bioreattore. Una possibile motivazione di ciò risiede nell'aerazione del *medium*, probabilmente ancora insufficiente nel rifornire al lievito l'adeguato quantitativo di ossigeno di cui necessita per crescere con concentrazioni maggiori. Al fine di confrontare la concentrazione di biomassa raggiunta nella presente sperimentazione con i principali risultati di letteratura, viene riportata la *Tabella 3.6.4*, nella quale questi ultimi sono esplicitati.

PROVA 1	PROVA 2	Cheng & Yang (2016)	Rodrigues et al. (2019)
1,73 g/L	4,29 g/L	7,8 g/L	7,9 g/L

Tabella 3.6.4 – Massima concentrazione di biomassa secca (*R. mucilaginosa*), separata dalle colture in reattore (PROVA 1 e PROVA 2) a base di sciroppo di BSG *Forna*, confrontata con i risultati di letteratura

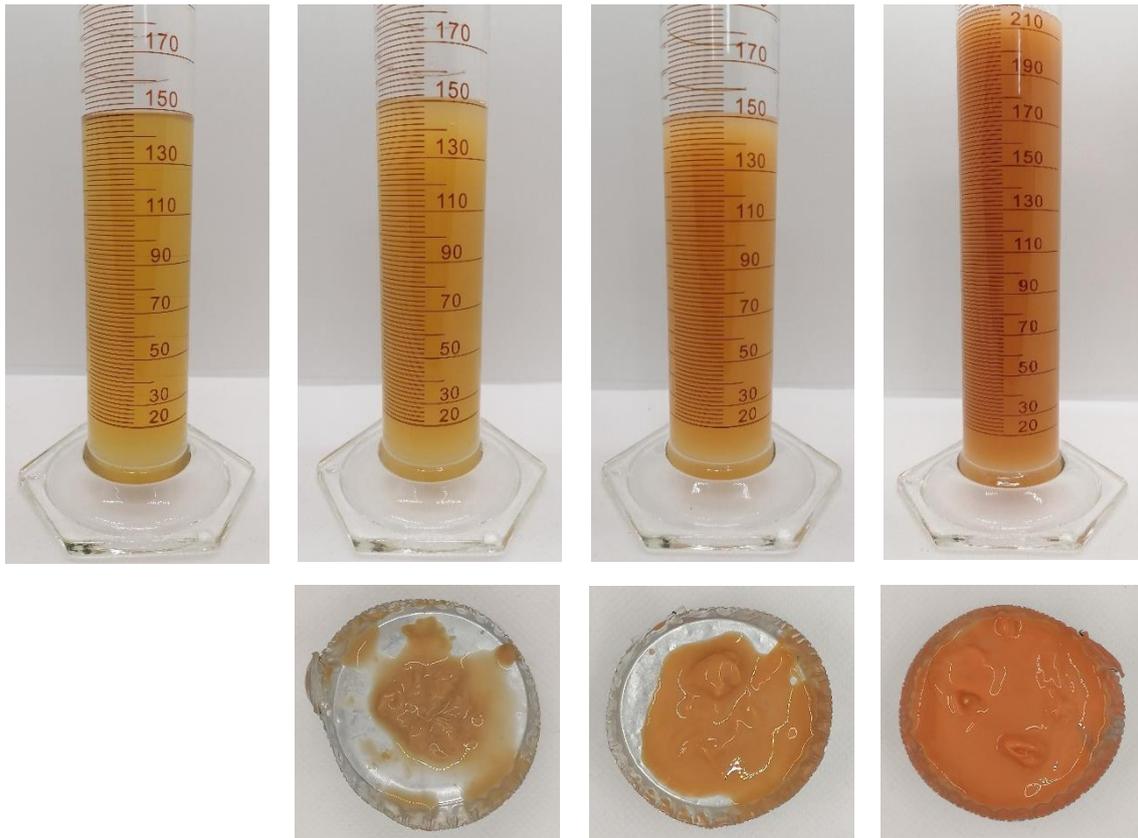


Figura 3.6.6 – Coltura in bioreattore (**PROVA 2**) su sciroppo di BSG *Forna* t.q. dopo 0, 24, 48 e 72 ore di fermentazione (rispettivamente da sinistra a destra); in basso è presentata la biomassa ricavata dai relativi campioni adiacenti superiormente. Quella derivante dal campione prelevato al t 0 è assente, poiché recuperata in quantità non apprezzabili

Nella *Figura 3.6.6* viene confrontata la colorazione dei campioni prelevati nel corso della fermentazione in bioreattore durante la **PROVA 2**; a questo proposito, tra le due prove descritte in precedenza, si considera esclusivamente quella caratterizzata dalla concentrazione maggiore di biomassa (**PROVA 2**), poiché più significativa. Come ipotizzabile, si nota che il colore delle sospensioni acquista una tonalità aranciata sempre più intensa con il trascorrere della fermentazione; tale fenomeno risulta ancora più evidente osservando le fotografie relative alla biomassa separata dai medesimi campioni. Questa, infatti, in accordo con i dati riportati in *Tabella 3.6.3*, si tinge di arancione in maniera più evidente e aumenta di quantità man mano che la prova sperimentale si avvicina al termine (72 ore).

Al fine di analizzare dal punto di vista quantitativo la produzione di carotenoidi, finora esaminata solo qualitativamente, si monitora nel corso della fermentazione l'assorbanza (OD 490) assunta dalle due colture in reattore. I risultati di questa valutazione sono rappresentati in *Figura 3.6.7*. Similmente a quanto evidenziato in precedenza relativamente alle curve di crescita di *R. mucilaginosa*, si nota come la **PROVA 2** (curva rossa) sia in grado di produrre un maggior quantitativo di carotenoidi totali (OD 490 pari a 2,2 dopo 24 ore); in particolar modo, quest'ultima presenta valori di assorbanza (OD

490) in aumento nelle prime 24 ore, che tendono a stabilizzarsi nell'intorno di 2,2 per tutte le successive ore di fermentazione. Anche l'altra coltura esaminata (PROVA 1) esibisce un comportamento simile (curva verde); tuttavia, quest'ultimo evolve manifestando una produzione di carotenoidi molto più contenuta, in grado di raggiungere il suo massimo, pari a 1,0, dopo 24 ore; oltre questo tempo tale valore non subisce cambiamenti apprezzabili, rimanendo pressoché costante.

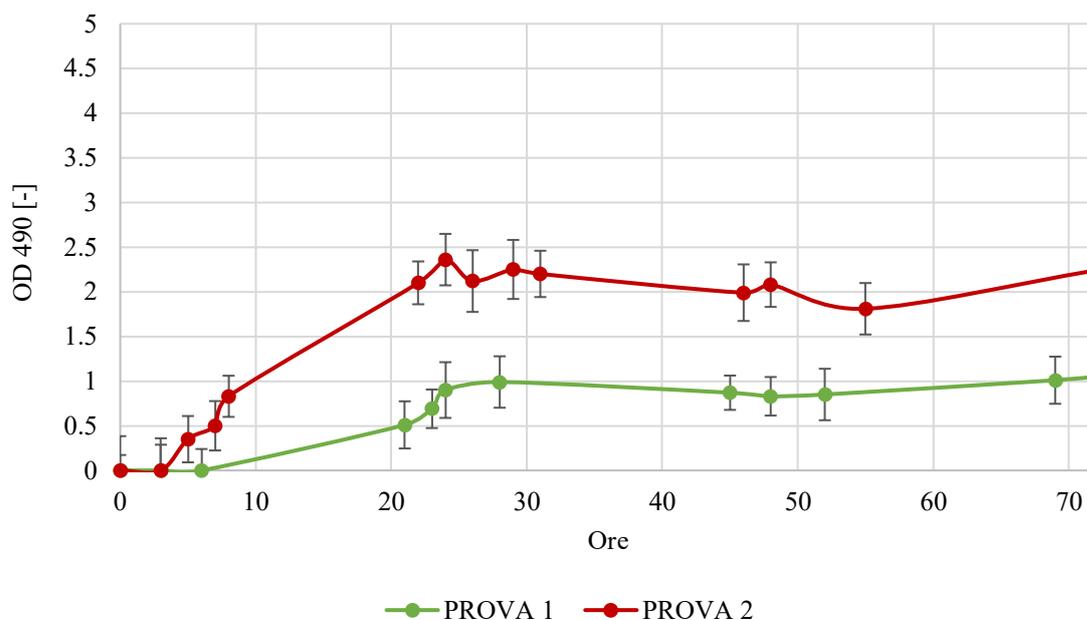


Figura 3.6.7 – Produzione di carotenoidi (OD 490) misurati nel corso delle colture in bioreattore contenenti lo sciroppo di BSG *Forna* t.q. (ottenuto mediante estrazione in autoclave) inoculato con *R. mucilaginosa*

Volendo confrontare nella *Figura 3.6.8* il risultato appena esposto (limitatamente alla PROVA 2) con quello ricavato dalla corrispondente prova in beuta (*Figura 3.5.10*, sciroppo *Forna* t.q. - autoclave), si evidenzia come entrambi gli andamenti presentino un massimo, in corrispondenza delle 24 ore di fermentazione, caratterizzato da un valore di OD 490 vicino a 2,5. Si nota anche che, a seguito delle 48 ore di fermentazione, tempo in cui entrambe le colture esibiscono un'assorbanza prossima a 2, le due curve si allontanano; infatti, al termine della prova (durata 72 ore) si misurano valori di OD 490 pari a 0,4 e 2,2, corrispondenti alle prove rispettivamente in beuta e in bioreattore.

In conclusione, a valle dei commenti relativi alla prova di *scale-up* in bioreattore, è possibile affermare che i risultati conseguiti a seguito delle sperimentazioni in beuta, facenti uso dello sciroppo di BSG *Forna* t.q. proveniente da estrazione in autoclave, sono riproducibili e confrontabili con quelli ottenuti su scala più ampia (2,2 L).

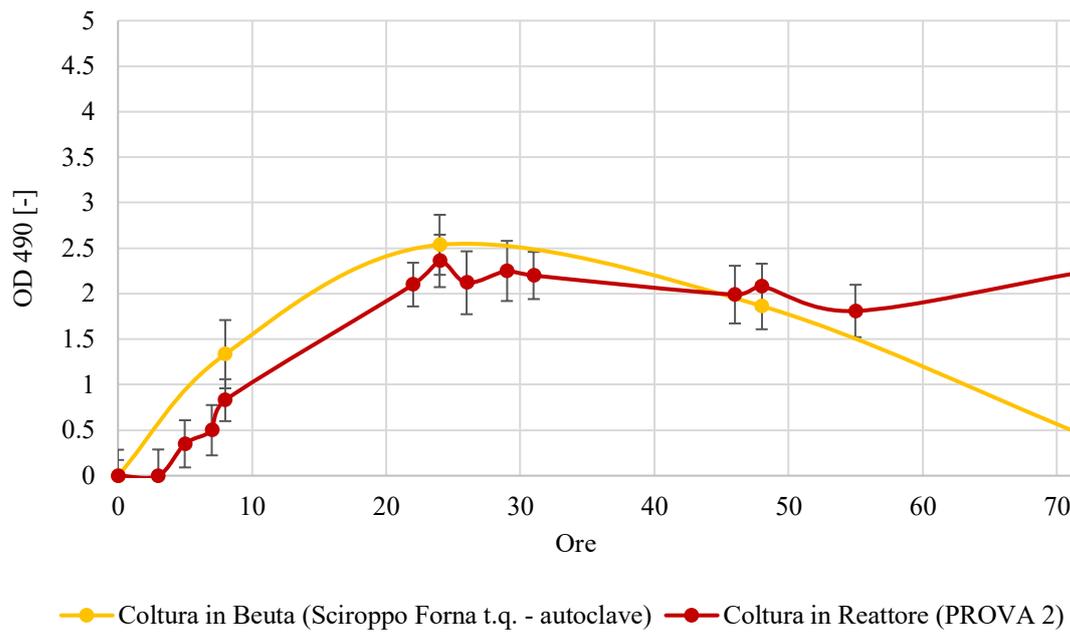


Figura 3.6.8 – Produzione di carotenoidi (OD 490) misurati nel corso delle colture contenenti lo sciropo di BSG Fornal t.q. (ottenuto mediante estrazione in autoclave) inoculato con *R. mucilaginosa*. Si confrontano la prova in beuta e quella in bioreattore denominata PROVA2

3.7 Estrazione dei carotenoidi

3.7.1 Ottimizzazione del processo estrattivo

Come descritto nel paragrafo 2.7, uno degli obiettivi del presente lavoro di tesi è la determinazione del quantitativo di carotenoidi estraibile a partire dalla biomassa (generata su scioppo di BSG *Forna*) recuperata nel corso delle prove in beuta e in reattore presentate in precedenza. Di seguito sono riportati i risultati derivanti dai tre tentativi preliminari di estrazione condotti al fine di ottimizzare il protocollo di estrazione ritrovato in letteratura (Cheng & Yang, 2016). A tal proposito, si è indagata la capacità estrattiva del metodo, utilizzando alternativamente biomassa umida, essiccata a 60°C per 24 ore o

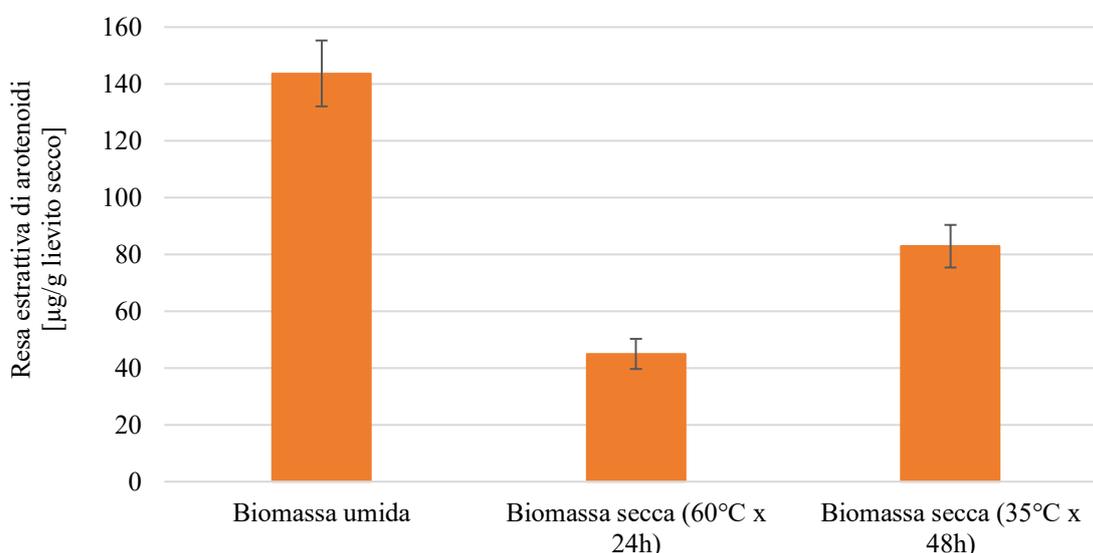


Figura 3.7.1 – Resa estrattiva di carotenoidi (µg/g lievito secco) a partire da *R. mucilaginosa* cresciuta in beuta su terreno YM. Si confrontano le tre prove di estrazione facenti uso rispettivamente di **biomassa umida ed **essiccata** (60°C per 24 ore e 35°C per 48 ore)**

a 35°C per 24 ore. Tale biomassa adoperata nella suddetta prova è cresciuta in beuta su terreno YM (paragrafo 3.5.1).

In *Figura 3.7.1* si evidenzia come l'estrazione dei carotenoidi portata a termine tramite l'utilizzo di biomassa umida (precedentemente conservata a -20°C) sia di gran lunga più proficua (143,7 µg/g lievito secco) rispetto a quella adoperante la biomassa essiccata. Quest'ultima ha portato ad ottenere i pigmenti di interesse con rese pari a 44,9 e 82,9 µg/g lievito secco, rispettivamente se essiccata a 60°C per 24 ore oppure a 35°C per 48 ore. Inoltre, dal punto di vista dell'operatività del processo, si è notato che l'essiccamento

delle cellule comporta notevoli problematiche legate alla risospensione di queste ultime all'interno dei solventi organici utilizzati per l'estrazione.

Per ciascuna prova sono stati effettuati tre cicli di estrazione, i cui risultati (espressi in $\mu\text{g/g}$ lievito secco) sono sommati tra loro al fine di valutare la resa complessiva di carotenoidi ricavati.

Nel grafico seguente (*Figura 3.7.2*) viene mostrato come la maggior parte dei pigmenti venga estratta a seguito del primo ciclo ($107,3 \mu\text{g/g}$ lievito secco); i successivi, infatti, sono caratterizzati da rese nettamente inferiori ($20,9$ e $15,5 \mu\text{g/g}$ lievito secco). A titolo di esempio viene raffigurato esclusivamente il caso di estrazione a partire da biomassa umida precedentemente descritto.

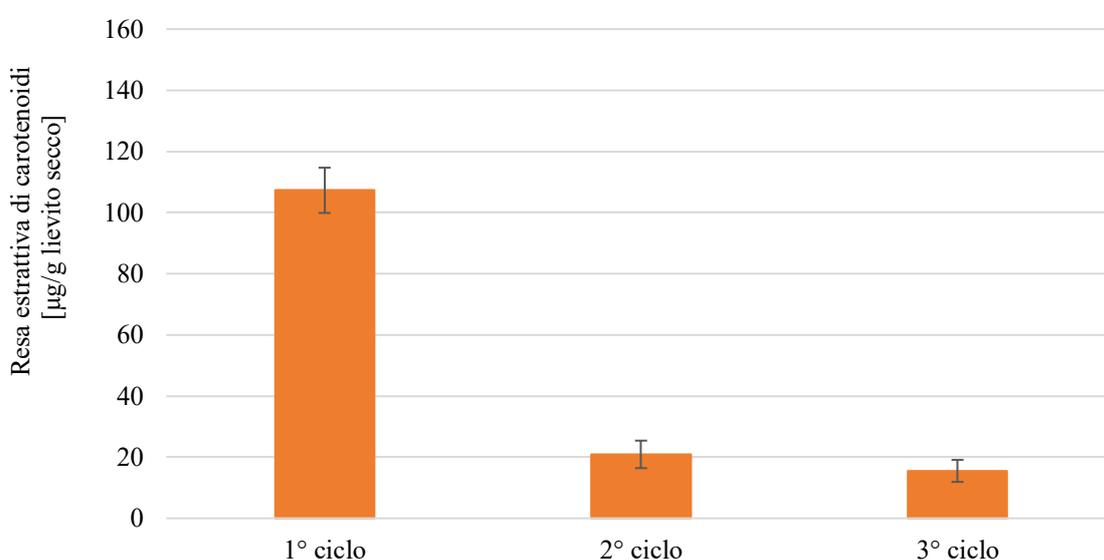


Figura 3.7.2 – **Resa estrattiva di carotenoidi ($\mu\text{g/g}$ lievito secco)** a partire da *R. mucilaginoso* cresciuta in beuta su terreno YM. Si confrontano le quantità di pigmenti ottenuti relative al **1°, 2° e 3° ciclo di estrazione** a partire da biomassa umida

A sostegno del commento relativo al grafico precedente, si nota in *Figura 3.7.3* come la colorazione del surnatante sia più rosa nella fotografia di sinistra (estratto ottenuto a valle del primo ciclo), piuttosto che in quelle di destra raffiguranti il campione sottoposto ai cicli successivi. L'intensità di colore è chiaramente imputabile alla presenza di carotenoidi in soluzione. A causa dell'esiguo quantitativo di carotenoidi recuperabili nel terzo ciclo (solo $15,5 \mu\text{g/g}$ lievito secco), le estrazioni commentate nel paragrafo seguente 3.7.2 sono state interrotte dopo il secondo.

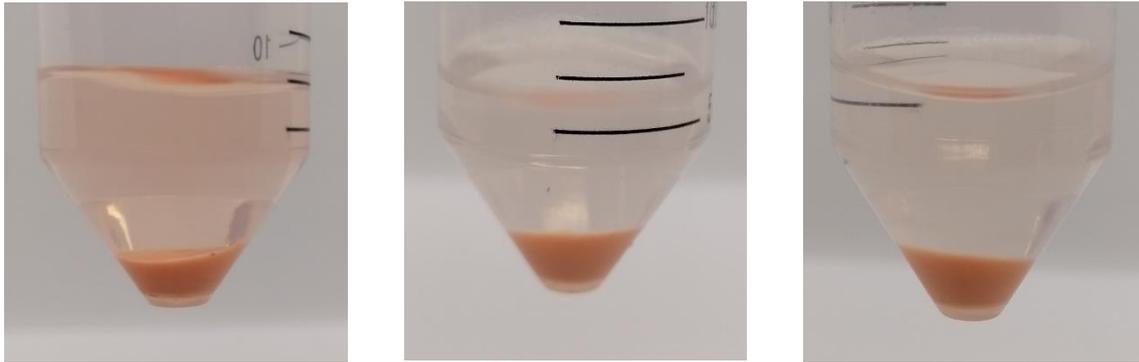


Figura 3.7.3 – Estratti ottenuti a seguito del 1°, 2° e 3° ciclo di estrazione (ordinati da sinistra a destra) a partire da biomassa umida

3.7.2 Estrazione da colture contenenti sciroppo di BSG Forna

Nella presente sezione, si intende analizzare il quantitativo di carotenoidi totali recuperati nel corso delle prove in beuta e in reattore facenti uso di sciroppo di BSG *Forna* tal quale e addizionato di estratto di lievito e peptone. Come punto di partenza si prendono in considerazione i risultati relativi alle prove in beuta (commentate nel paragrafo 3.5.3) rappresentati nel grafico seguente. Quest'ultimo mostra la massima resa (calcolata mediante l'equazione espressa nel paragrafo 2.7.1) di carotenoidi estratti per ciascuna linea colturale proposta. Tale massimo si presenta in corrispondenza di differenti tempi di fermentazione; esso, in particolare, nel caso relativo all'utilizzo di sciroppo t.q. di BSG *Forna*, ottenuto mediante estrazione in autoclave, si verifica in corrispondenza delle 24 ore di coltura e pari a 171,9 $\mu\text{g/g}$ lievito secco. In tutti gli altri casi, è necessario attendere le 72 ore al fine di raggiungere la resa estrattiva di carotenoidi più elevata. Ciò che viene messo in luce dalla *Figura 3.7.4* è che nelle linee colturali costituite dagli sciroppi di BSG *Forna* tal quale e addizionato, derivanti rispettivamente da estrazione in shaker e autoclave, si evidenzia un quantitativo di carotenoidi estratti per grammo di biomassa secca maggiore (203,9 e 230,0 μg) rispetto alle due rimanenti linee, contraddistinte da una resa di carotenoidi estratti pari a 161,6 e 171,9 $\mu\text{g/g}$ lievito secco (rispettivamente per sciroppo addizionato, ottenuto con shaker, e tal quale derivante da estrazione in autoclave).

Ricordando che tali pigmenti si configurano come prodotti intracellulari, si evince che il quantitativo totale di carotenoidi estratti (riferito all'intero volume di coltura) deve dipendere anche dalla quantità di biomassa prodotta. A seguito di questa riflessione, si introduce una nuova grandezza: la concentrazione di carotenoidi estratti (espressa in $\mu\text{g/L}$). Questa si determina moltiplicando la resa estrattiva di tali pigmenti (misurata in $\mu\text{g/g}$ biomassa secca) per la concentrazione di biomassa (riportata in *Tabella 3.5.3*). I risultati di questa analisi sono mostrati in *Figura 3.7.5*, nella quale si presentano esclusivamente i valori massimi della grandezza esaminata. Si evidenzia come la concentrazione di carotenoidi ($\mu\text{g/L}$), a causa della dipendenza dalla quantità di biomassa prodotta per litro di brodo (g/L), sposta mediamente il suo picco in corrispondenza delle

48 ore di cultura. Fa eccezione la prova caratterizzata dallo sciroppo di BSG *Forna* addizionato (ottenuto da estrazione in autoclave), il quale esibisce il valore massimo di concentrazione di carotenoidi estratti (1159 $\mu\text{g/L}$) dopo 72 ore di fermentazione.

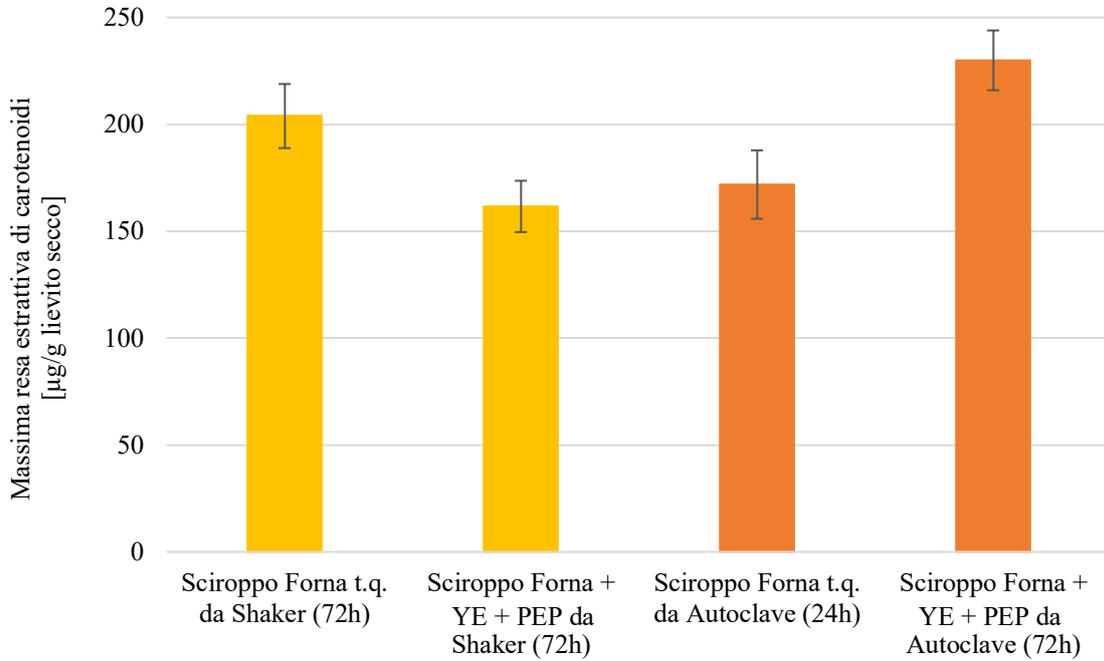


Figura 3.7.4 – Massima resa estrattiva di carotenoidi ($\mu\text{g/g}$ lievito secco) a partire dalla biomassa ricavata dalle quattro linee colturale descritte nel paragrafo 2.5.3

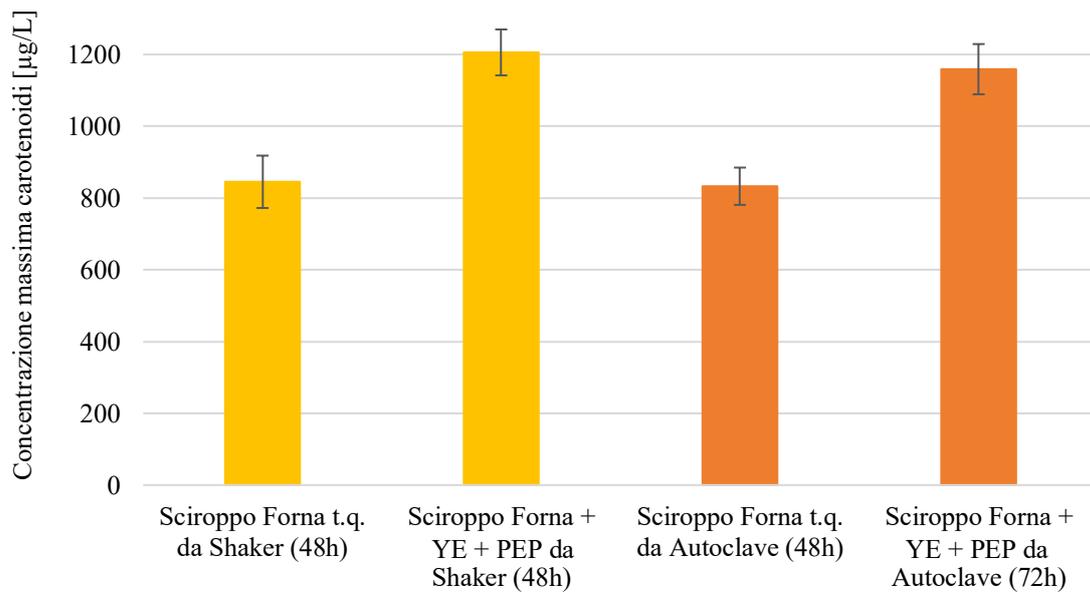


Figura 3.7.5 – Concentrazione massima di carotenoidi estratti ($\mu\text{g/L}$) a partire dalla biomassa ricavata dalle quattro linee colturale descritte nel paragrafo 2.5.3

Per prendere visione dei valori puntuali, rappresentati nei grafici precedenti, si rimanda alla *Tabella 3.7.1* seguente, da cui si evince che il sistema colturale che presenta la maggior concentrazione di carotenoidi estratti (1205,8 $\mu\text{g/L}$) è quello costituito dallo sciroppo (addizionato di estratto di lievito e peptone) ottenuto con shaker.

Sciroppo di BSG <i>Forna</i>	Massima resa di carotenoidi [$\mu\text{g/g}$ lievito secco]	Concentrazione massima carotenoidi [$\mu\text{g/L}$]
Tal quale – Shaker	203,92 \pm 15,07	845,14 \pm 73,54
Addizionato – Shaker	161,63 \pm 12,43	1205,77 \pm 64,15
Tal quale – Autoclave	171,85 \pm 16,67	832,82 \pm 52,38
Addizionato – Autoclave	229,97 \pm 14,84	1159,05 \pm 70,27

Tabella 3.7.1 – Resa ($\mu\text{g/g}$ lievito secco) e concentrazione ($\mu\text{g/L}$) massime di carotenoidi estratti a partire dalla biomassa ricavata dalle quattro linee colturale descritte nel paragrafo 2.5.3

Al fine di procedere con l'analisi dei dati relativi alle due prove in bioreattore (commentate nella sezione 3.6), si commentano i grafici rappresentati nelle *Figure 3.7.6* e 3.7.7.

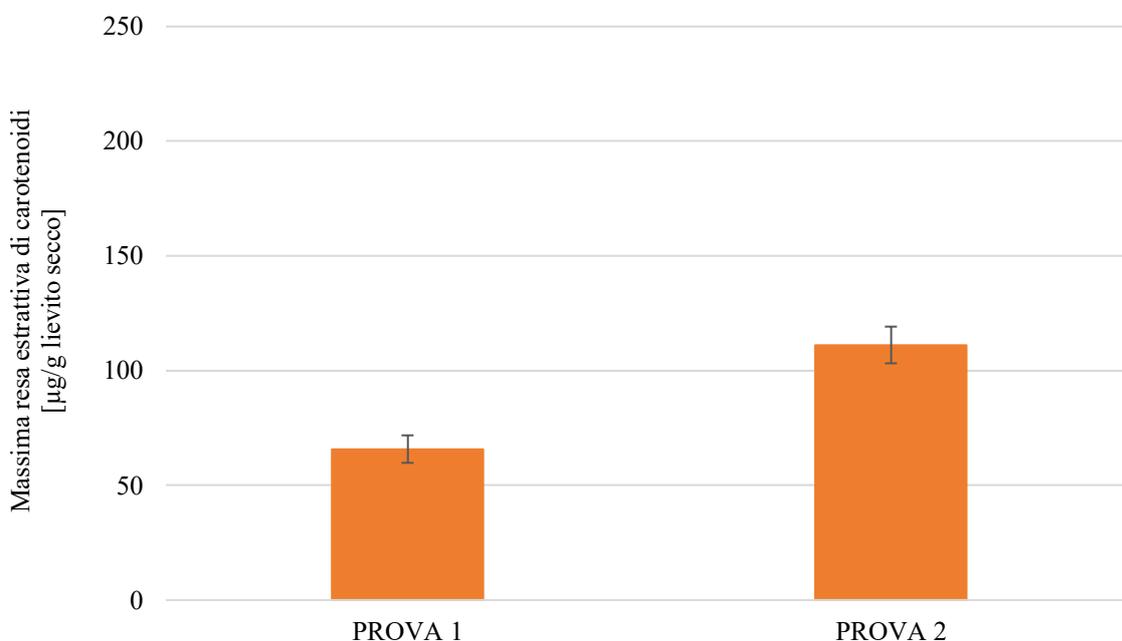


Figura 3.7.6 – Massima resa estrattiva di carotenoidi ($\mu\text{g/g}$ lievito secco) a partire dalla biomassa ricavata (dopo 48 ore) dalle due culture in reattore descritte nel paragrafo 2.6

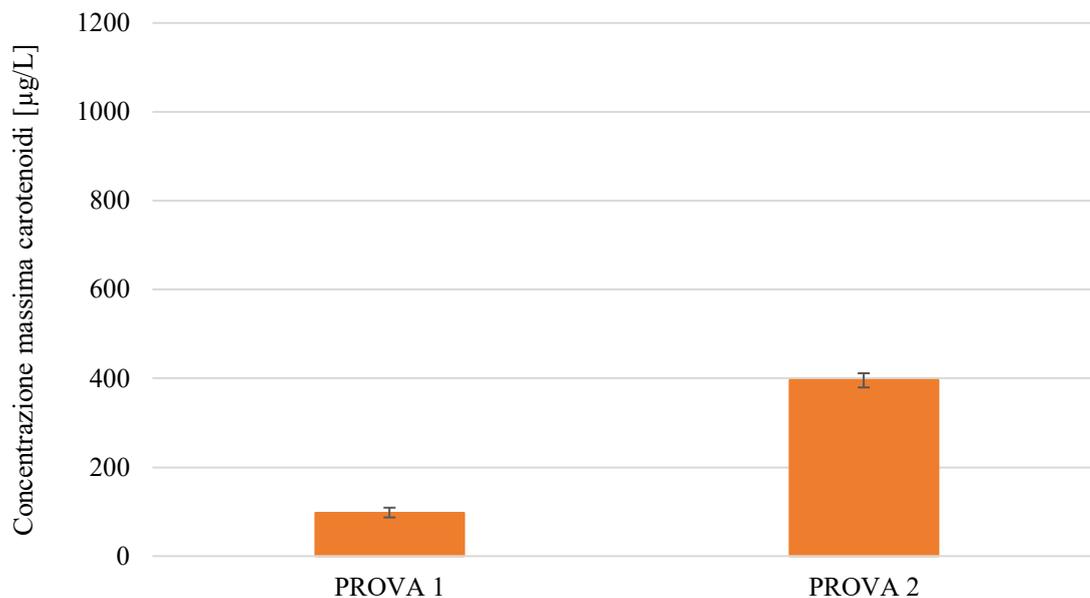


Figura 3.7.7 – Concentrazione massima di carotenoidi estratti (µg/L) a partire dalla biomassa ricavata dalle due colture in reattore descritte nel paragrafo 2.6

Dalla *Figura 3.7.6*, si evince che la PROVA 2 ha portato al raggiungimento di una maggior resa estrattiva di carotenoidi (111,2 µg/g lievito secco) rispetto a quella recuperata dalla PROVA 1 (65,8 µg/g lievito secco). Entrambi i dati fanno riferimento al massimo valore di carotenoidi estratti a partire dalla biomassa recuperata dopo 48 ore di fermentazione. Inoltre, misurando le massime concentrazioni di tali pigmenti (*Figura 3.7.7*), si osserva che la differenza tra le due prove realizzate diventa ancora più marcata: 395,6 µg/L per la PROVA 2 contro 98,04 µg/L caratteristici della PROVA 1.

A seguito dei commenti riportati in precedenza, è possibile effettuare un confronto dei risultati ottenuti (in termini di carotenoidi estratti) tra le prove in beuta e in reattore. Al fine di realizzare tale comparazione, ci si serve della *Tabella 3.7.2* seguente.

Paragonando tra loro i risultati in essa riportati, si evince che la concentrazione di carotenoidi estratti a partire da biomassa ricavata dalle colture in bioreattore è nettamente inferiore (395,7 µg/L per la PROVA 2) rispetto a quella ottenibile conducendo una coltura in beuta, in cui il caso peggiore tra quelli esaminati ha comunque portato ad estrarre 832,8 µg di tali pigmenti per litro di coltura (beuta contenente sciroppo tal quale derivante da estrazione in autoclave). Come evidenziato precedentemente, invece, la coltura caratterizzata dalla concentrazione di carotenoidi estratti più elevata (1205,8 µg/L) è quella contenente lo sciroppo di BSG *Forna*, ottenuto tramite estrazione in shaker, addizionato di estratto di lievito e peptone.

La motivazione principale connessa ai bassi quantitativi di carotenoidi estratti in bioreattore (PROVA 2) è sia collegata alla limitata produzione degli stessi durante la fermentazione (111,19 µg/g lievito secco), sia alla scarsa concentrazione di biomassa prodotta (4,29 g/L dopo 72 ore).

Coltura	Massima resa di carotenoidi [$\mu\text{g/g}$ lievito secco]	Concentrazione massima carotenoidi [$\mu\text{g/L}$]
Beuta (Sciroppo t.q. – Shaker)	203,92 \pm 15,07	845,14 \pm 73,54
Beuta (Sciroppo + YE + PEP – Shaker)	161,63 \pm 12,43	1205,77 \pm 64,15
Beuta (Sciroppo t.q. – Autoclave)	171,85 \pm 16,67	832,82 \pm 52,38
Beuta (Sciroppo + YE + PEP – Autoclave)	229,97 \pm 14,84	1159,05 \pm 70,27
Reattore (PROVA 1)	65,86 \pm 6,85	98,04 \pm 11,43
Reattore (PROVA 2)	111,19 \pm 8,36	395,65 \pm 17,94

Tabella 3.7.2 – Resa ($\mu\text{g/g}$ lievito secco) e concentrazione ($\mu\text{g/L}$) massime di carotenoidi estratti a partire dalla biomassa ricavata dalle colture in beuta e in reattore

Confrontando i risultati ottenuti, relativi alla quantità di carotenoidi estratti per litro di coltura, con quanto riportato in letteratura (gli articoli di riferimento sono sintetizzati nel paragrafo 1.4.5), si evince che la sperimentazione ha portato a risultati confrontabili, seppure inferiori, con quanto ottenuto da Cheng & Yang (2016), i quali hanno realizzato una coltura in beuta (mantenuta a 25°C per 216 ore) raggiungendo una concentrazione di carotenoidi estratti pari a circa 2500 $\mu\text{g/L}$. Parallelamente, Rodrigues et al. (2019) hanno portato a termine una sperimentazione, basata su una fermentazione *batch* in beuta (protratta per 144 ore), che ha permesso di ottenere una concentrazione di lievito pari a 1248,5 $\mu\text{g/L}$; Questo dato appare molto simile a quello determinato nella presente tesi, nella quale, conducendo una coltura in beuta contenente gli sciroppi di BSG *Forna* (addizionati di estratto di lievito e peptone) ottenuti a partire da un'estrazione in shaker e in autoclave, si sono determinate concentrazioni pari rispettivamente a 1205,8 e 1159,1 $\mu\text{g/L}$. In ultimo, si evidenzia come anche El-Banna et al. (2012), tramite la realizzazione di una coltura in beuta (per 72 ore) ad opera di *R. glutinis*, abbiano ottenuto un quantitativo di carotenoidi estratti (per litro di coltura), in condizioni operative confrontabili con quelle adottate nella presente sperimentazione, pari a circa 1700 $\mu\text{g/L}$.

4. Conclusioni e prospettive future

Nel presente lavoro di tesi è stata valutata la possibilità di valorizzare il BSG, un sottoprodotto del processo di produzione della birra, tramite la conduzione di fermentazioni allo stato liquido ad opera del lievito *Rhodotorula mucilaginosa* CBS316. Le prime sperimentazioni, effettuate al fine di determinare quale tra i BSG utilizzati (*Edit*, *Leumann* e *Forna*) permette di ottenere un estratto con acqua in grado di promuovere maggiormente la crescita del lievito, hanno portato alle seguenti considerazioni:

- Gli estratti di BSG *Edit* e *Leumann*, utilizzati come terreni di coltura, sono caratterizzati da una crescita di *R. mucilaginosa* molto simile tra loro (OD 600 prossimo a 0,4 dopo 72 ore di coltura);
- La produzione di un estratto circa quattro volte più concentrato, denominato sciroppo, di BSG *Forna* promuove la crescita del lievito in modo più sostenuto (OD 600 pari a circa 1,2, dopo 72 ore di fermentazione) di quanto avvenga tramite l'impiego degli estratti di BSG *Edit* e *Leumann*.

A seguito di questi commenti, che hanno portato alla scelta dello sciroppo di BSG *Forna* come principale *medium* di coltura adottato nelle prove sperimentali, si è deciso di effettuare un *Design of Experiment (DOE)* in piastra multiwell, finalizzato a individuare la miglior formulazione, nonché la miglior procedura estrattiva, per l'ottenimento dello sciroppo di BSG *Forna*. Il DOE ha permesso di comprendere che:

- L'estrazione del BSG tramite autoclave (121°C per 20 minuti) permette di ottenere uno sciroppo t.q. con un quantitativo superiore di zuccheri (6,0°Br) rispetto a quella condotta in shaker (24°C per 2 ore, 220 rpm) (4,3°Br);
- Lo sciroppo t.q. prodotto mediante estrazione in autoclave, impiegato come terreno di coltura, è in grado di favorire maggiormente la crescita di *R. mucilaginosa* (OD 600 pari a 1,16) e la produzione di carotenoidi (OD 490 con un valore di 1,31) rispetto a quello derivante da estrazione in shaker (OD 600 pari a 0,89 e OD 490 di 0,97) dopo 72 ore di fermentazione;
- Aggiungere xilosio oppure NH₄Cl allo sciroppo di BSG *Forna* non apporta benefici apprezzabili in termini di crescita di biomassa e di produzione di carotenoidi;
- L'aggiunta di estratto di lievito e peptone allo sciroppo derivante da estrazione in autoclave promuove sia la crescita di *R. mucilaginosa*, sia la produzione di carotenoidi (aventi OD 600 e OD 490 pari rispettivamente a 1,42 e 1,63 dopo 72 ore);

Una volta raggiunti tali risultati, è stato possibile proseguire la sperimentazione testando gli sciroppi di BSG *Forna* come *media* per realizzare una prova in beuta. Questa ha permesso di giungere alle seguenti considerazioni:

- Le colture costituite dagli sciroppi addizionati di estratto di lievito e peptone sono caratterizzate da concentrazioni di biomassa superiori, dopo 48 ore di fermentazione, (pari a 7,63 e 6,16 g/L a seconda che si faccia uso di sciroppo derivante da estrazione in shaker o in autoclave) rispetto a quelle ottenibili impiegando gli sciroppi tal quali;
- La quantità massima di carotenoidi estratti, a partire dalla biomassa recuperata nel corso delle fermentazioni, è maggiore se si utilizzano sciroppi addizionati di estratto di lievito e peptone (1206 e 1159 µg/L per sciroppo ottenuto rispettivamente tramite shaker e autoclave), piuttosto che quelli tal quali, caratterizzati da una concentrazione di carotenoidi estratti pari a 845 e 833 µg/L.

Infine, sono state realizzate due prove di *scale-up* in bioreattore, le quali differiscono per lo più riguardo alla portata iniziale di aria somministrata, pari a 50 L/h e a 200L/h, rispettivamente nella PROVA 1 e nella PROVA 2. Queste ultime hanno permesso di comprendere che:

- L'aerazione, nonché la saturazione iniziale del *medium* con aria, giocano un ruolo fondamentale sulla crescita del lievito; in particolare, l'aumento della portata di aria favorisce la produzione di biomassa (avente concentrazioni, misurate dopo 72 ore di coltura, pari a 1,7 e 4,3 g/L rispettivamente nelle PROVE 1 e 2);
- La concentrazione massima di carotenoidi estratti è più elevata nella coltura in cui viene somministrata la portata di aria superiore (PROVA 2), contraddistinta da 395,7 µg/L, rispetto a quella identificativa della PROVA 1, in cui l'aerazione è minore (98,0 µg/L).

A valle di questa prova, è stato anche possibile valutare come la coltura in bioreattore, a parità di condizioni adottate, non permetta di raggiungere le concentrazioni di biomassa e di carotenoidi estratti osservate nel corso delle prove in beuta. Tale comportamento trova una probabile causa nella portata di aria insufflata al reattore; questa, infatti, potrebbe essere stata insufficiente al fine di permettere alla biomassa contenuta in quest'ultimo di crescere con quantitativi superiori, confrontabili con quelli ottenuti durante le prove in beuta precedenti.

I risultati ottenuti nella presente tesi di laurea hanno quindi dimostrato la possibilità di utilizzare lo sciroppo ottenuto dal BSG come terreno di coltura per il lievito *R. mucilaginosa CBS316*. Quest'ultimo, infatti, è in grado di crescere su tale *medium* e di produrre carotenoidi in quantità rilevanti e confrontabili con i risultati riportati in letteratura.

Tra le ottimizzazioni da effettuare, sicuramente vi sono le condizioni di fermentazione relative allo *scale-up* in bioreattore. A questo proposito, sarebbe molto interessante valutare il contributo dell'aerazione sulla crescita del lievito e sulla produzione di carotenoidi, prevedendo l'utilizzo di un agente antischiuma nel terreno di coltura. Inoltre, si potrebbe indagare la possibilità di utilizzare in coltura sciroppo di BSG *Forna* ottenuto mediante estrazione in shaker. Quest'ultimo, infatti, oltre a promuovere maggiormente la

produzione di biomassa (7,63 g/L nella prova in beuta, facente uso di sciroppo addizionato di estratto di lievito e peptone), richiede meno energia per portare a termine l'estrazione delle trebbie, configurandosi come un'alternativa, meno dispendiosa, all'autoclave.

Un ultimo miglioramento si potrebbe apportare alla procedura di estrazione dei carotenoidi, formulando un protocollo estrattivo ottimizzato per il processo in esame.

5. Bibliografia

- Bertinotti, D., & Faraggi, M. (2015). *La tua birra fatta in casa* (Edizioni Lswr (ed.); Quarta edi).
- Bianco, A., Budroni, M., Zara, S., Mannazzu, I., Fancello, F., & Zara, G. (2020). The role of microorganisms on biotransformation of brewers' spent grain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(20), 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*(9), 1–12. <https://doi.org/10.3390/antiox8090380>
- Casas-Godoy, L., González-Escobar, J. L., Mathis, A. G., & Barrera-Martínez, I. (2020). Revalorization of untreated Brewer's spent grain: novel and versatile feedstock to produce cellulases, lipases, and yeast biomass in a biorefinery approach. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01157-3>
- Cheng, Y. T., & Yang, C. F. (2016). Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *61*, 270–275. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2015.12.027>
- Cooray, S. T., Lee, J. J. L., & Chen, W. N. (2017). Evaluation of brewers' spent grain as a novel media for yeast growth. *AMB Express*, *7*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0414-1>
- Cutzu, R. (2013). *Produzione di carotenoidi in Rhodotorula glutinis su glicerolo*. Università degli studi di Sassari.
- Del Forno, A. (2018). *Corso di degustazione birra - Primo livello: conoscere e degustare le birre* (Vol. 53, Issue 9).
- Dyaa, A., Soliman, H., Abdelrazak, A., Samra, B. N., Khojah, E., Ahmed, A. F., El-Esawi, M. A., & Elsayed, A. (2022). Optimization of Carotenoids Production from *Rhodotorula* sp. Strain ATL72 for Enhancing Its Biotechnological Applications. *Journal of Fungi*, *8*(2). <https://doi.org/10.3390/jof8020160>
- El-Banna, A. A., El-Razek, A. M. A., & El-Mahdy, A. R. (2012). Some Factors Affecting the Production of Carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*; *Food and Nutrition Sciences*, *03*(01), 64–71. <https://doi.org/10.4236/fns.2012.31011>
- Ezeonu, F. C., & Okaka, A. N. C. (1996). Process kinetics and digestion efficiency of anaerobic batch fermentation of brewer's spent grains (BSG). *Process Biochemistry*, *31*(1), 7–12. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)00064-6](https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)00064-6)

- Guowang, H., Nur, F. B. I., Yimin, L., Yang, W., & Zeng, T. (2020). Naftifine inhibits pigmentation through down-regulation on expression of phytoene desaturase gene CAR1 in *Rhodotorula mucilaginosa*. *African Journal of Microbiology Research*, *14*(5), 166–174. <https://doi.org/10.5897/ajmr2020.9316>
- Hernández-Almanza, A., Montañez-Sáenz, J., Martínez-Ávila, C., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2014). Carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* YB-252 in solid-state fermentation. *Food Bioscience*, *7*, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2014.04.001>
- Igreja, W. S., Maia, F. de A., Lopes, A. S., & Chisté, R. C. (2021). Biotechnological production of carotenoids using low cost-substrates is influenced by cultivation parameters: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16). <https://doi.org/10.3390/ijms22168819>
- Kaur, P., Ghoshal, G., & Jain, A. (2019). Bio-utilization of fruits and vegetables waste to produce β -carotene in solid-state fermentation: Characterization and antioxidant activity. *Process Biochemistry*, *76*(June 2018), 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.10.007>
- Lopes, F. C., & Ligabue-Braun, R. (2021). Agro-Industrial Residues: Eco-Friendly and Inexpensive Substrates for Microbial Pigments Production. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *5*(March). <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.589414>
- Lynch, K. M., Steffen, E. J., & Arendt, E. K. (2016). Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. *Journal of the Institute of Brewing*, *122*(4), 553–568. <https://doi.org/10.1002/jib.363>
- Lyu, X., Lyu, Y., Yu, H., Chen, W. N., Ye, L., & Yang, R. (2022). Biotechnological advances for improving natural pigment production: a state-of-the-art review. *Bioresources and Bioprocessing*, *9*(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00497-4>
- Miceli, M. H., Díaz, J. A., & Lee, S. A. (2011). Emerging opportunistic yeast infections. *The Lancet Infectious Diseases*, *11*(2), 142–151. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70218-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70218-8)
- Mot, A. C., Pârvu, M., Pârvu, A. E., Roșca-Casian, O., Dina, N. E., Leopold, N., Silaghi-Dumitrescu, R., & Mircea, C. (2017). Reversible naftifine-induced carotenoid depigmentation in *Rhodotorula mucilaginosa* (A. Jörg.) F.C. Harrison causing onychomycosis. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11600-7>
- Mussatto, S. I., Dragone, G., & Roberto, I. C. (2006). Brewers' spent grain: Generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, *43*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.06.001>
- Patel, A., Mikes, F., Bühler, S., & Matsakas, L. (2018). Valorization of brewers' spent grain for the production of lipids by oleaginous yeast. *Molecules*, *23*(12). <https://doi.org/10.3390/molecules23123052>
- Piccolo, T. (2021). *Valorizzazione degli scarti della birrificazione mediante processi estrattivi*. Politecnico di Torino.

- Plaza, P. E., Gallego-Morales, L. J., Peñuela-Vásquez, M., Lucas, S., García-Cubero, M. T., & Coca, M. (2017). Biobutanol production from brewer's spent grain hydrolysates by *Clostridium beijerinckii*. *Bioresource Technology*, *244*(July), 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.139>
- Pozo, M. I., Bartlewicz, J., van Oystaeyen, A., Benavente, A., van Kemenade, G., Wäckers, F., & Jacquemyn, H. (2018). Surviving in the absence of flowers: do nectar yeasts rely on overwintering bumblebee queens to complete their annual life cycle? *FEMS Microbiology Ecology*, *94*(12), 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy196>
- Rachwał, K., Waśko, A., Gustaw, K., & Polak-Berecka, M. (2020). Utilization of brewery wastes in food industry. *PeerJ*, *8*, 1–28. <https://doi.org/10.7717/peerj.9427>
- Ribeiro, B. D., Barreto, D. W., & Coelho, M. A. Z. (2011). Technological Aspects of β -Carotene Production. *Food and Bioprocess Technology*, *4*(5), 693–701. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0545-3>
- Rodrigues, T. V. D., Amore, T. D., Teixeira, E. C., & Burkert, J. F. de M. (2019). Carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa* in Batch and Fed-Batch fermentation using agroindustrial byproducts. *Food Technology and Biotechnology*, *57*(3), 388–398. <https://doi.org/10.17113/ftb.57.03.19.6068>
- Russ, W., Mörtel, H., & Meyer-Pittroff, R. (2005). Application of spent grains to increase porosity in bricks. *Construction and Building Materials*, *19*(2), 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2004.05.014>
- Silbir, S., & Goksungur, Y. (2019). Natural red pigment production by *monascus purpureus* in submerged fermentation systems using a food industry waste: Brewer's spent grain. *Foods*, *8*(5). <https://doi.org/10.3390/foods8050161>
- Unionbirrai. (2018). *Report 2018 - Filiera italiana e mercati*.