

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
della produzione della birra:
Estrazione di proteine
Per la produzione di film biodegradabili**



Relatore
prof.ssa Francesca Bosco

Candidato
Giulia Cavallone

Novembre 2022

Indice

1. Introduzione	1
1.1. Scarti della birra.....	4
1.1.1. La produzione della birra	4
1.1.2. Brewer's Spent Grain (BSG)	7
1.2. Stato dell'arte	10
1.2.1. Applicazioni del BSG	10
1.2.1.1. Alimentazione animale	10
1.2.1.2. Alimentazione umana	10
1.2.1.3. Produzione di energia	11
1.2.1.4. Processi biotecnologici	12
1.2.1.5. Composti fenolici.....	14
1.2.1.6. Altre applicazioni.....	14
1.2.2. Estrazione di proteine da Brewer's spent grain	15
1.2.3. Applicazioni delle proteine estratte da BSG.....	18
1.2.4. Film da BSGP	19
1.3. Scopo della tesi.....	22
2. Materiali e Metodi.....	24
2.1. Estrazione di proteine	24
2.1.1. Brewer's Spent Grain (BSG) utilizzato e sua caratterizzazione preliminare	24
2.1.1.1. Valutazione del contenuto di umidità del BSG	24
2.1.1.2. Valutazione del pH del BSG	25
2.1.2. Estrazioni di proteine da BSG	25
2.1.2.1. Preparazione dei campioni.....	26
2.1.2.2. Estrazione	26
2.1.2.3. Separazione.....	27
2.1.3. Analisi del contenuto proteico	27
2.1.3.1. Retta di taratura.....	28
2.1.3.2. Elettroforesi su gel di poliacrilammide	28
2.2. Filmazione delle proteine estratte	33

2.2.1. Estratti utilizzati per la preparazione dei film	33
2.2.2. Preparazione dei film	34
2.2.3. Tipologie e tecniche per la separazione.....	35
2.2.3.1. Ultrafiltrazione.....	35
2.2.3.2. Separazioni con garza in nylon.....	38
2.2.4. Caratterizzazione dei film prodotti	39
2.2.4.1. Microscopia Ottica	39
2.2.4.2. Spettroscopia ad infrarossi a trasformata di Fourier (FT-IR)	39
2.2.4.3. Spettroscopia Ultravioletta-Visibile (UV-Vis).....	40
2.2.4.4. Diffrazione dei Raggi X	41
3. Risultati e discussione	43
3.1. Estrazione di proteine	43
3.1.1. Valutazioni preliminari del BSG	43
3.1.2. Estrazione.....	44
3.2.1.2. Analisi SDS-PAGE	48
3.2. Filmazione proteine estratte.....	51
3.2.1. Condizioni ottimali individuate	51
3.2.1.1. Influenza del pH	51
3.2.1.2. Influenza del solvente di estrazione e della concentrazione di proteine	53
3.2.1.3. Influenza della tipologia di stampo	55
3.2.1.4. Influenza del congelamento dei campioni.....	56
3.2.1.5. Influenza dell'essiccazione del BSG	57
3.2.1.6. Influenza del rapporto Volume/Superficie	58
3.2.2. Tipologie di separazione.....	59
3.2.2.1. Ultrafiltrazione.....	59
3.2.2.2. Separazione con garza in nylon.....	61
3.2.3. Caratterizzazione	67
3.2.3.1. Microscopio ottico	67
3.2.3.2. Spettroscopia FT-IR	68
3.2.3.3. Spettroscopia UV-Vis.....	70

3.2.3.4. Diffrazione dei Raggi X	72
4. Conclusioni e prospettive future	74
Bibliografia.....	77
Appendice.....	83

*Un ringraziamento speciale al piccolo
impianto di produzione di birra della
famiglia Forna (TO) per la gentile
concessione delle trebbie esauste
utilizzate nel presente lavoro di tesi*

1. Introduzione

L'aumento di perdite e sprechi alimentari è stato uno tra i principali effetti collaterali della crescita economica e dell'urbanizzazione avvenuta negli ultimi 50 anni (Kamal et al., 2021). Il maggior benessere e potere d'acquisto ha portato ad un consumo e una richiesta di cibo sempre maggiori, a cui il mercato ha risposto con un incremento della produzione alimentare e di conseguenza anche degli sprechi lungo tutta la filiera, dal campo (*farm*) alla tavola (*fork*). Ogni anno vengono infatti sprecate circa 1.3 miliardi di tonnellate di cibo nel mondo, pari a circa un terzo di quanto viene raccolto e prodotto per l'alimentazione umana (Peydayesh et al., 2022). Questa enorme quantità di rifiuti alimentari è causa di un importante impatto ambientale ed è uno tra i principali contributori al cambiamento climatico, con una percentuale compresa tra l'8 e il 10% (Peydayesh et al., 2022). L'impatto è sicuramente anche economico, con perdite che ammontano a circa 940 milioni di dollari all'anno (Handson C. e al, 2016). Questa problematica gioca, infine, un ruolo importante anche da un punto di vista sociale, inasprendo l'insicurezza alimentare e la denutrizione della popolazione mondiale più povera. La soluzione al problema non può essere la riduzione della produzione alimentare, dato il crescente aumento della popolazione e della sua vita media. È invece indispensabile rendere gli attuali sistemi alimentari più efficienti, in modo da essere in grado di sostenere, attraverso una dieta sostenibile e salutare, una popolazione che è destinata a raggiungere i 9 miliardi entro il 2050 (Charles et al., 2010). A questo proposito, l'obiettivo 12 dell'Agenda 2030 dello Sviluppo Sostenibile è quello di volgersi ad un consumo e una produzione più responsabili. In particolar modo, il punto 12.3 (Figura 1.1) si propone di “dimezzare gli sprechi alimentari legati al consumatore e alla vendita al dettaglio e di abbassare le perdite lungo l'intera filiera alimentare” (Handson C. e al,

2016). Il raggiungimento di questo obiettivo non ha solo come vantaggio quello di abbassare l'impatto ambientale del settore, ma aiuta anche nel raggiungimento di altri obiettivi dell'agenda, come l'eliminazione della fame nel mondo (*Zero Hunger*), dal momento che meno spreco equivale ad una maggiore disponibilità di risorse per la popolazione mondiale.

L'aumento di domanda di cibo è in particolar modo indirizzata verso alimenti ad alto contenuto proteico, necessari per la salute umana (Kamal et al., 2021; Peydayesh et al., 2022). Non essendo l'uomo in grado di sintetizzare gli amminoacidi essenziali, questi devono essere, infatti, necessariamente introdotti con la dieta. La conseguente intensificazione, di allevamento e agricoltura, necessaria per rispondere alla crescente domanda, è causa di un severo impatto ambientale: l'intensificazione nella produzione di proteine animali contribuisce per il 12% all'emissione di gas serra (Peydayesh et al., 2022), mentre quella nell'agricoltura è causa di deforestazione ed alterazione dei cicli di azoto e fosforo. Entrambe queste intensificazioni sono poi legate ad un elevato consumo di acqua, cambiamenti del suolo, inquinamento e perdita di biodiversità. Si rende quindi necessario rivolgersi a delle risorse proteiche alternative in grado di poter rispondere alle attuali sfide mondiali. A questo proposito, la valorizzazione degli scarti proteici si dimostra essere una delle soluzioni più allettanti. Questo risulta ancor più vero, perché spesso questi scarti, essendo caratterizzati da alti valori di BOD e COD, sono anche legati ad una difficoltà di smaltimento (Peydayesh et al., 2022). Una strategia vincente sembra quindi essere quella di allontanarsi da un'economia lineare che volge allo spreco di proteine, per inserire queste ultime in un'economia circolare che le trasformi da rifiuto a risorsa. In particolar modo, queste possono essere sfruttate attraverso una reintroduzione nella filiera alimentare, per soddisfare la crescente domanda, oppure possono essere utilizzate al di fuori della

catena alimentare, come ad esempio nel campo dei materiali bioplastici (Peydayesh et al., 2022). In entrambi i casi si riesce a ridurre l'impatto ambientale, sociale ed economico.

In questo contesto, si rende interessante la valorizzazione del Brewer's Spent Grain (BSG), principale scarto dell'industria di birrificazione: quest'ultimo, prodotto in quantitativi enormi e caratterizzato da un elevato contenuto proteico, si propone come un'interessante risorsa proteica dall'elevata disponibilità e dal basso costo. Dalle proteine estratte da BSG, tra le diverse applicazioni, si ha la possibilità di produrre film dalle stesse, utilizzabili ad esempio nell'industria farmaceutica o del *packaging*. Questo tipo di valorizzazione del BSG ha un duplice vantaggio: da un lato la valorizzazione di uno scarto, dall'altro la produzione di un prodotto finale utilizzabile come potenziale sostituto della plastica da petrolio in particolari applicazioni, alleggerendo così ancor di più il contributo ad inquinamento e cambiamento climatico.



Figura 1.1: Obiettivo 12.3 dell'Agenda 2030 per lo Sviluppo Sostenibile. *Figura tratta da <https://champions123.org/target-123>*

1.1. Scarti della birra

1.1.1. La produzione della birra

Il processo di birrificazione si basa sull'utilizzo di quattro ingredienti base: cereale, acqua, luppolo e lievito. Il cereale maggiormente utilizzato è l'orzo, che sottoposto ad un processo di maltazione, viene trasformato in malto d'orzo. Può essere previsto l'inserimento di altri tipi di cereali durante la fase di ammostamento, quali: orzo non maltato, riso, granturco o frumento (Esslinger, 2009; Mussatto, 2009).

All'interno del chicco d'orzo si ritrovano sezioni dalla diversa struttura e funzione (Figura 1.2). Nel cuore del chicco è presente il germe o embrione, frazione che germoglia dando origine ad una nuova pianta, e l'endosperma. Quest'ultimo è costituito da granuli di amido sospesi in una matrice proteica e funge da nutrimento per il germe, al quale fornisce tutto il necessario per la crescita. L'endosperma è poi circondato dall'aleurone, uno strato spesso due o tre cellule e contenente proteine, fosfolipidi, RNA e carboidrati. Il cuore è avvolto dall'involucro esterno, costituito da tegumento, pericarpo e guscio. In particolare, il tegumento funge da membrana semipermeabile che avvolge il cuore del chicco; il pericarpo, di materiale ceroso e idrofobico, avvolge a sua volta il tegumento; e lo strato più esterno è costituito dal guscio che funge da protezione per il chicco ed è costituito principalmente da materiale lignocellulosico, con piccole quantità di proteine, resine e tannini (Lynch et al., 2016; Mussatto et al., 2006).

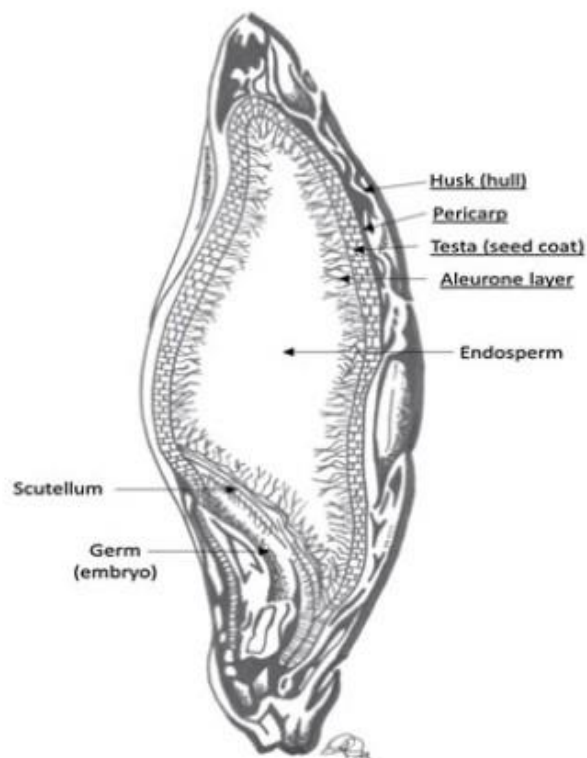


Figura 1.2.: Sezione trasversale di un chicco d'orzo. *Figura tratta da Lynch et al. 2016.*

Prima di poter essere sottoposti al processo di maltazione, i chicchi sono puliti, separati per dimensione tramite apposito setaccio e sottoposti ad un periodo di dormienza di 4-6 settimane. Segue quindi la maltazione, divisa in: macerazione, germinazione ed essiccazione. La fase di macerazione avviene in vasche di macerazione, all'interno delle quali i chicchi sono messi a contatto con acqua, a temperatura compresa tra i 5 e i 18 °C per circa due giorni, con un cambio d'acqua che avviene ogni 6-8 h (Mussatto et al., 2006). Questo *step* è necessario per assicurare un buon assorbimento di acqua da parte del chicco (si passa infatti dal 12 % iniziale a valori compresi tra il 42 e il 48 %). La fase di germinazione, che dura 6-7 giorni, prevede un contatto diretto del chicco con un flusso d'aria umida a temperatura compresa tra 15 e 21 °C (Mussatto et al., 2006). Si promuove così la sintesi e l'attivazione di enzimi nell'endosperma, che ne degradano le pareti cellulari e permettono il rilascio dei granuli di amido interni. In questo modo, l'orzo è trasformato in malto d'orzo (Gupta et al., 2010). Successivamente, il malto è sottoposto ad essiccazione a temperatura compresa tra i 40 e gli 80 °C, che riduce il

contenuto di umidità fino al 4-5% (Mussatto et al., 2006). In questo modo si va a stabilizzare il cambiamento fisico e biologico introdotto nel chicco, oltre ad evitare la contaminazione microbica ed a generare gli aromi desiderati. Dopo essere stato essiccato il malto è conservato per 3-4 settimane. Dopo la fase di maltazione si ha la macinazione, necessaria per scomporre il chicco e facilitare così l'azione enzimatica della fase successiva: l'ammostamento. Nell'ammostamento il malto macinato è messo a contatto con acqua in un tino di ammostamento. Il graduale aumento della temperatura (da 37 a 78 °C) promuove l'idrolisi enzimatica dell'amido, convertito in zuccheri fermentabili e non fermentabili, e delle proteine, parzialmente convertite in polipeptidi e amminoacidi (Mussatto et al., 2006). La temperatura risulta essere il parametro controllante dell'intero processo di ammostamento, essendo l'attività degli enzimi fortemente dipendente da essa (Gupta et al., 2010). Al termine di questo *step* si ottiene il mosto, un liquido dolce contenente i prodotti di idrolisi, che si separa dal solido residuo, il Brewer's Spent Grain (BSG). Quest'ultimo è poi successivamente utilizzato come letto filtrante per la filtrazione del mosto. Il BSG costituisce il principale scarto del processo di produzione della birra ed è costituito dalle frazioni solide non solubili o degradate dei chicchi. In Figura 1.3 è illustrato il processo ivi descritto. A valle della filtrazione con il BSG, il mosto è sottoposto poi ad una serie di *step* che portano alla produzione della birra. In particolare, si ha l'aggiunta del luppolo (additivo aromatico che dona il caratteristico gusto alla birra), a cui segue l'ebollizione, che favorisce la dissoluzione delle componenti aromatiche, distruzione degli enzimi prodotti e sterilizzazione del mosto. Si effettua poi una filtrazione per separare i nuovi solidi prodotti. Infine, la fermentazione, tramite l'aggiunta di lieviti, permette la conversione degli zuccheri disciolti in etanolo, CO₂ e sostanze aromatiche (Mussatto, 2009).

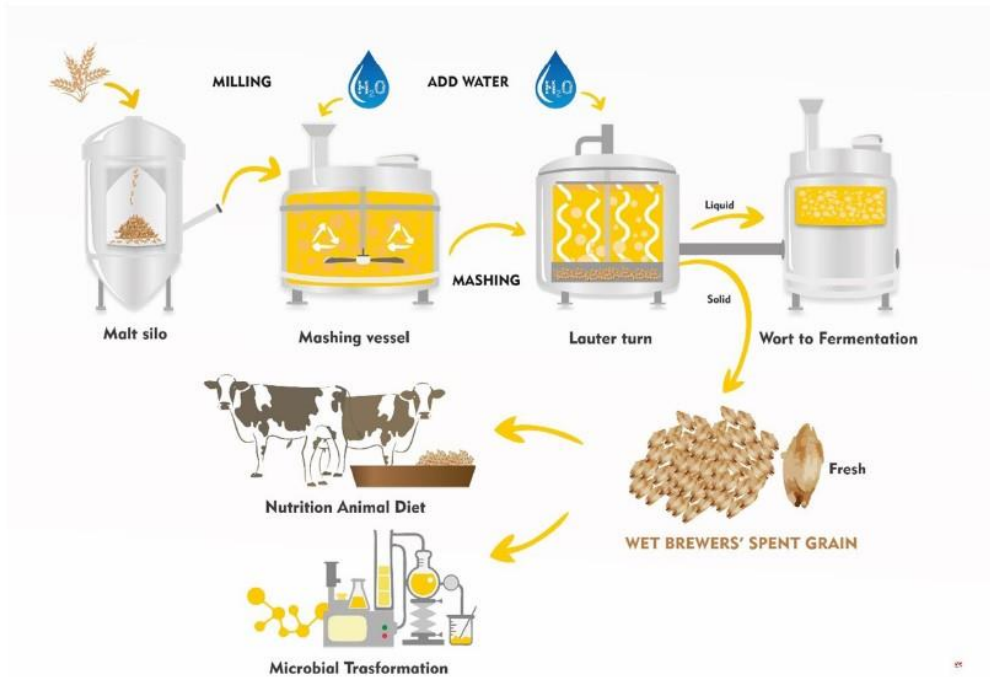


Figura 1.3.: Processo produttivo dal malto al mosto. Figura tratta da Bianco A. e al, 2020.

1.1.2. Brewer's Spent Grain (BSG)

La composizione del BSG può variare di molto in base a: condizioni di processo utilizzate nelle fasi di maltazione e ammostamento, varietà di cereale utilizzato, periodo di raccolta del cereale e tipologia di luppolo aggiunto. Può inoltre variare in base ad eventuali altre sostanze aggiunte e,

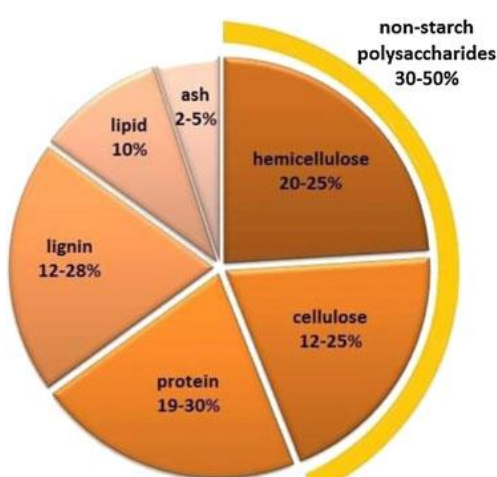


Fig 1.4.: Composizione standard di BSG derivante da malto d'orzo.
Figura tratta da Lynch et al., 2016.

dependendo in particolar modo dalla loro tipologia e qualità (Lynch et al., 2016; Mussatto, 2009; Xiros & Christakopoulos, 2012). Si riscontra invece una omogeneità strutturale e composizionale tra campioni di BSG provenienti da uno stesso birrificio, ottenuti quindi a parità di condizioni sopra elencate (Lynch et al., 2016). Nel BSG confluiscono principalmente le frazioni appartenenti all'involucro esterno del chicco (tegumento, pericarpo e guscio), ma possono essere presenti anche frazioni di endosperma o residui di

luppolo, a seconda delle condizioni di processo, così come eventuali residui

di altri cereali, se sono stati questi aggiunti durante la fase di ammostamento (Mussatto, 2009; Mussatto et al., 2006). Il BSG è quindi un residuo solido lignocellulosico, costituito principalmente da cellulosa ed emicellulosa (costituenti insieme circa il 50% del peso totale), lignina (tra il 10 e il 28%) e proteine (per circa il 20%). Tra le proteine, quelle maggiormente presenti sono le ordeine, seguite da gluteline, globuline e albumine. Oltre a questi composti sono presenti anche minerali, vitamine, aminoacidi e monosaccaridi quali xilosio, glucosio e arabinosio (Mussatto et al., 2006).

L'elevato contenuto in acqua del BSG (70-80%), oltre a renderne costoso il trasporto, lo lega a problematiche di deterioramento e crescita microbica, favorite anche dalla composizione, ricca in polisaccaridi e proteine o dal cambiamento strutturale a cui va incontro durante le fasi di maltazione e ammostamento. Infatti, dopo pochi giorni dalla fase di produzione, si arriva a valori di 10^6 CFU/g dovuti principalmente a batteri microaerofili, aerobici, anaerobici, termofili e mesofili (Bianco et al., 2020a), e dopo 30 giorni, si constata la presenza di diverse specie di funghi appartenenti ai generi *Fusarium*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* e *Aspergillus* (Bianco et al., 2020a; Lynch et al., 2016). Sono quindi stati proposti diversi metodi per la conservazione del BSG. In questo modo si permette un suo utilizzo postumo, aumentando la possibilità di utilizzarlo in altre applicazioni, rispetto al rapido smaltimento in aziende agricole locali. Tra questi metodi, particolarmente efficace si dimostra il trattamento con soluzioni acide, come acido lattico, acetico, formico e benzoico. Nel caso in cui però si voglia utilizzare il BSG per applicazioni alimentari, questo pretrattamento acido si scontra con le preferenze del consumatore, volto sempre più all'utilizzo di cibi ed ingredienti naturali. (Lynch et al., 2016). Esistono invece diversi metodi fisici utilizzabili, tra cui il congelamento, la liofilizzazione, l'essiccazione in forno e l'utilizzo di vapore surriscaldato. Il congelamento

comporta degli aumenti di volume del BSG, con conseguente aumento dei costi di immagazzinamento, e provoca delle alterazioni composizionali, legate in particolar modo al contenuto di arabinosio. La liofilizzazione ha invece come vantaggio quello di non alterare la composizione chimica del BSG e di ridurre il volume, ma è considerato un processo non economicamente vantaggioso. Anche l'essiccazione in forno è legata ad un'assenza di alterazione composizionale e ad una riduzione in volume. Si tratta però comunque di un processo energivoro. Inoltre, le zone vicino all'uscita dell'essiccatore possono causare locali bruciature del BSG. È quindi preferita all'essiccazione in forno l'utilizzo di vapore surriscaldato, essendo quest'ultimo un processo meno energivoro, dall'aumentata efficienza di essiccazione e in grado di aumentare il recupero di composti organici dall'elevato valore aggiunto. Si evitano inoltre in questo modo il rischio di fumo e incendio (Lynch et al., 2016).

Per i sopracitati problemi di gestione del BSG, il suo utilizzo preferenziale rimane l'invio alle aziende agricole locali. Ciò è dovuto non soltanto ai problemi di sviluppo microbico, ma anche per i costi di trasporto determinati dall'elevato contenuto di umidità. Date però le sue grandi potenzialità in termini di composizione, l'elevata disponibilità a basso costo e il crescente interesse verso la valorizzazione degli scarti, negli ultimi tempi si è incentrato lo studio verso i diversi possibili impieghi del BSG.

1.2. Stato dell'arte

1.2.1. Applicazioni del BSG

1.2.1.1. Alimentazione animale

Ad oggi, il BSG è principalmente utilizzato per alimentazione animale. L'utilizzo del BSG come parziale sostituto nell'alimentazione animale si è dimostrato in grado di aumentarne la crescita, a seguito dell'elevato apporto di proteine e amminoacidi essenziali (Mussatto et al., 2006), sostituendosi così agli additivi sintetici utilizzati per aumentare l'apporto nutrizionale, come promotori della crescita e antibiotici (Lao et al., 2020), rischiosi per il consumatore e la sua salute. (Chang et al., 2015; Lao et al., 2020). Inoltre, l'aggiunta di BSG, dato il suo basso costo, diminuisce di molto anche il costo finale del mangime, apportando così dei benefici anche dal punto di vista economico (Chetrariu & Dabija, 2020).

In particolare, il BSG si è dimostrato adatto all'utilizzo come mangime per bovini, pollame, maiali e pesci. Nell'alimentazione dei ruminanti, combinato con altre fonti di azoto, permette di fornire tutti gli amminoacidi essenziali (Mussatto et al., 2006). Inoltre, si è dimostrato come una sua integrazione nell'alimentazione dei bovini da latte apporti un aumento della produzione del latte e del quantitativo di grassi e solidi in esso contenuti, senza interferire con la fertilità dell'animale. In ultimo, un utilizzo del BSG come sostituto al 50% della farina di soia per l'alimentazione del pesce *Pangasiusanodon hypophthalmus* ne ha incrementato la crescita, per il maggior apporto proteico (Chetrariu & Dabija, 2020).

1.2.1.2. Alimentazione umana

Il BSG sta avendo un crescente interesse come ingrediente da inserire nell'alimentazione umana, grazie al suo elevato valore nutrizionale e al basso costo: principale impiego in questo contesto è un suo utilizzo nei prodotti da

forno. Tuttavia, alcune sue peculiari caratteristiche ne limitano l'utilizzo in questo campo: l'eccessiva granulosità ne rende possibile un inserimento solo in forma di farina; il colore brunastro ne limita l'inserimento a prodotti di farina non bianca; infine, il sapore, così come alcune caratteristiche fisiche che influenzano la consistenza del prodotto finale, ne limita l'aggiunta in piccole quantità (Mussatto et al., 2006).

Ad ogni modo un suo inserimento, nelle limitazioni sopraccitate, porta ad un aumento del contenuto in proteine, amminoacidi essenziali e fibre. Inoltre, il contenuto calorico dimezzato rispetto alla maggior parte dei cereali, ne mette in luce le potenzialità per diete ipocaloriche (Mussatto et al., 2006). Oltre a ciò, si è dimostrato che l'inserimento del BSG nell'alimentazione umana apporta importanti benefici alla salute: accelera, ad esempio, il metabolismo ed allevia i problemi di stipsi e diarrea (Mussatto et al., 2006). Oltre ai prodotti farinacei, è stato studiato un suo inserimento anche in altre tipologie di prodotti, come in salsicce a basso contenuto di grasso (Chetrariu & Dabija, 2020), succhi di frutta e centrifughe ad elevato contenuto fenolico e attività antiossidante o pasta fresca all'uovo con elevato contenuto in fibre (Chetrariu & Dabija, 2020).

1.2.1.3. Produzione di energia

Il BSG può essere utilizzato per la produzione di energia: sia attraverso combustione diretta sia per la produzione di biogas (Chetrariu & Dabija, 2020; Maqhuzu et al., 2021; Xiros & Christakopoulos, 2012).

Se da un lato la combustione diretta può risultare vantaggiosa, in quanto un utilizzo nel birrifico dell'energia prodotta è in grado di sopperire alle richieste energetiche, dall'altro lato è legata a fenomeni di inquinamento e richiede fasi di processo e costi aggiuntivi per il pre-essiccamento della biomassa (Mussatto et al., 2006).

Una produzione alternativa di energia a partire dal BSG è la produzione di biogas, per fermentazione.

Il gas naturale è una miscela gassosa principalmente costituita da metano ed anidride carbonica ed è considerato un combustibile *green*, in quanto non legato ad emissioni di CO₂ durante la fase di utilizzo. Tuttavia, il gas naturale oggi utilizzato proviene principalmente da fonti fossili e quindi il suo utilizzo risulta comunque indirettamente legato all'emissione di gas serra. La possibilità, dunque, di produrre biogas a partire da BSG, rifiuto naturale a basso costo, si dimostra interessante anche per ragioni ambientali, in quanto permette di ridurre le emissioni di gas serra e la dipendenza dai combustibili fossili, in rapido esaurimento. La fermentazione anaerobica avviene in due *step* consecutivi di idrolisi e metanogenesi (Emmanuel et al., 2022; Mussatto et al., 2006). L'idrolisi è volta alla degradazione del materiale fibroso del BSG, necessaria per ottenere rese elevate del prodotto finale, e costituisce lo *step* limitante dell'intero processo. Può però essere migliorato tramite diverse tipologie di pretrattamenti (trattamento alcalino, enzimatico o attraverso macinatura). Nella metanogenesi, invece, si ha un'iniziale conversione da parte di microrganismi della materia fibrosa complessa in acidi grassi volatili, i quali vengono successivamente convertiti in metano da batteri metanigeni. Così come l'energia termica prodotta per combustione del BSG, anche il biogas prodotto per fermentazione anaerobica può essere utilizzato per l'ottenimento di energia termica da utilizzare direttamente nell'impianto di birrificazione (Mussatto et al., 2006).

1.2.1.4. Processi biotecnologici

Il BSG si dimostra essere anche un ottimo substrato da poter utilizzare in processi biotecnologici, grazie all'elevato contenuto di polisaccaridi, proteine e minerali. In particolare, può essere utilizzato come:

- substrato per la crescita di funghi; si è visto come favorisca la crescita di funghi appartenenti ai generi *Pleurotus*, *Agrocybe* e *Lentinus*, dei quali favorisce la crescita principalmente per l'elevato contenuto proteico e l'elevata umidità (Bianco et al., 2020b; Mussatto et al., 2006).
- substrato per la produzione di enzimi: xilanasi da colture di *Aspergillus awamori*, *Streptomyces avermitilis* o isolati di *Streptomyces* (Bhumibhamon O.,1978); α -amilasi da *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Aspergillus oryzae*(Mussatto, 2009); cellulasi da *Trichoderma reesei* (Sire & Oh, 1990).
- substrato per la produzione di xilitolo (con lievito *Candida guilliermondii*), acido lattico (con *Lactobacillus delbrueckii*) o bioetanolo (con *Zymomonas mobilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, o *Pichia pastoris*) (Chetrariu & Dabija, 2020). In tutti e tre i casi è necessario un pretrattamento di delignificazione seguito da idrolisi enzimatica, in modo da ottenere zuccheri semplici a partire dalla biomassa di partenza. In particolare, lo xilitolo si presenta come interessante sostituto a basso potere calorifico del saccarosio, l'acido lattico può essere utilizzato per la produzione di PLA, una plastica biodegradabile, mentre il bioetanolo può essere utilizzato come combustibile o come *building block* nell'industria chimica.
- substrato per la produzione di pigmenti naturali; si è infatti studiata la produzione pigmenti naturali da parte del ceppo *CM001 di Monascus purpureus* in un sistema di fermentazione sommersa (Silbir & Goksungur, 2019). In questo modo si riesce ad ottenere un'alternativa ai pigmenti sintetici, pericolosi per l'ambiente e per la salute umana (Silbir & Goksungur, 2019).

- substrato a basso costo per la produzione di poliidrossialcanoati (PHA) (Chetrariu & Dabija, 2020). Questi ultimi faticano ad imporsi sul mercato, come sostituti alla plastica da petrolio, proprio per l'elevato costo di produzione ad essi associato. L'utilizzo quindi di BSG come substrato a basso costo potrebbe migliorare la concorrenza di questa bioplastica alla plastica tradizionale.

Il BSG può inoltre essere riutilizzato nella stessa industria birraria come agente antischiuma nel fermentatore o per l'immobilizzazione del lievito *Saccharomyces uvarum* (Brányik et al., 2001; Chetrariu & Dabija, 2020; Mussatto et al., 2006).

Infine, il BSG può essere utilizzato come fonte di prebiotici, sostanze che migliorano la salute dell'animale in quanto stimolano l'attività del microbiota intestinale (Lao et al., 2020). In particolare, il BSG risulta essere un'importante fonte di arabinoxilani (AX) (Lao et al., 2020).

1.2.1.5. Composti fenolici

Il BSG può essere considerato una promettente fonte di acidi fenolici, importanti antiossidanti naturali. Questi composti si dividono in acidi idrossicinnamici (HCA) e acidi idrossibenzoici (HBA). Nel BSG si trovano principalmente acidi appartenenti al primo gruppo, tra cui il più abbondante è l'acido felurico, seguito dall'acido *p*-cumarico (Chetrariu & Dabija, 2020). L'acido felurico, in particolare, si dimostra un composto in grado di proteggere la pelle dall'azione dei radicali liberi, riducendone l'invecchiamento, oltre a prevenire l'ossidazione degli alimenti (Chetrariu & Dabija, 2020).

1.2.1.6. Altre applicazioni

Il BSG può essere utilizzato anche per la produzione di *biochar* tramite pirolisi, processo termochimico in presenza di un quantitativo di ossigeno

sotto i valori stechiometrici. Il *biochar* si presenta come un materiale poroso, dall'alto contenuto in carbonio e minerali e dalla struttura stabile (Mussatto et al., 2006): per questo è utilizzato come ammendante naturale per il terreno, nel quale rilascia gradualmente nutrienti necessari alla crescita delle piante. Inoltre, il BSG può essere utilizzato come materiale da costruzione, grazie all'alto quantitativo di materiale fibroso e il basso contenuto in ceneri (Russ et al., 2005), aumentando la porosità e contribuendo a rendere il prodotto finale maggiormente asciutto (Chetrariu & Dabija, 2020; Mussatto et al., 2006). Il BSG è stato studiato anche per un utilizzo nella produzione della carta, dato l'elevato contenuto in materiale fibroso. In particolare, è stato utilizzato per la produzione di rotoli di carta, biglietti da visita e sottobicchieri (Mussatto et al., 2006). Un'ulteriore interessante applicazione del BSG è quella di un suo utilizzo come adsorbente, sia come BSG tal quale, utilizzato ad esempio per la decolorazione di acque reflue, sia considerando il *biochar* prodotto da BSG tramite pirolisi, che si è dimostrato invece un ottimo adsorbente dei composti organici volatili (VOCs) presenti nei gas di scarico (Mussatto et al., 2006).

1.2.2. Estrazione di proteine da Brewer's spent grain

Oltre alle diverse applicazioni riportate nel paragrafo precedente, il BSG può essere anche utilizzato, dato il suo elevato contenuto proteico, per l'estrazione di proteine. Le proteine così estratte possono essere a loro volta utilizzate per l'alimentazione umana o per la produzione di materiale da imballaggio (Jaeger et al., 2021). Nel primo caso, infatti, dato il crescente spostamento verso un'alimentazione vegetale e l'incapacità di soddisfare la crescente domanda con processi sostenibili, si rende necessario lo studio di proteine vegetali derivanti dagli scarti (Peydayesh et al., 2022). Nel secondo caso invece, una produzione di materiali da imballaggio a partire dalle

proteine estratte, permette a questo sottoprodotto di birrificazione di candidarsi come potenziale sostituto della plastica sintetica (Proaño et al., 2020). Di quest'ultima applicazione, in particolare, se ne parlerà nel paragrafo successivo.

Tra i diversi metodi utilizzati per l'estrazione di proteine da BSG (Brewer's Spent Grain Proteins, BSGP) l'estrazione alcalina risulta essere quella maggiormente utilizzata. In questo caso, il pH alcalino fornisce una carica netta negativa alle proteine, che aumenta la repulsione tra di esse e favorisce l'interazione con la soluzione: ciò ne permette la solubilizzazione (Jaeger et al., 2021). Un successivo abbassamento del pH al punto isoelettrico neutralizza la carica sulle proteine e diminuisce l'interazione col solvente; diminuisce così la solubilità delle proteine, che precipitano (Jaeger et al., 2021). Tra le soluzioni basiche utilizzate (KOH, Na₂CO₃ o NaOH), NaOH si dimostra quello più efficace nell'estrazione di proteine (Jaeger et al., 2021). Un altro metodo utilizzato per l'estrazione di BSGP è l'estrazione con solventi organici, principalmente utilizzata per estrarre la frazione di proteine non solubile in acqua, in soluzioni acide, basiche o saline (Wen et al., 2019). Inoltre, Qin e al. (2018) hanno confrontato tra loro una serie di trattamenti per l'estrazione di BGSP, quali: un trattamento sequenziale costituito da estrazione con acqua, con NaOH 1 M e successivamente con H₂SO₄ 1 M; un trattamento sequenziale analogo a quello riportato al punto precedente, ma senza l'iniziale trattamento con acqua; un trattamento acido con H₂SO₄ in *mild* (120 mg di H₂SO₄/g soluzione liquida, con rapporto liquido su solido pari a 10) o *strong conditions* (40 mg di H₂SO₄/g soluzione liquida, con rapporto liquido su solido pari a 285); e un trattamento idrotermale (Qin et al., 2018). Quest'ultimo, in particolare, si rivela estremamente interessante perché, nonostante le rese estrattive inferiori rispetto ai casi precedenti, risulta più selettivo nei confronti dell'estrazione

di proteine, estraendo un quantitativo inferiore di lignina e carboidrati. Inoltre, si propone come un'interessante alternativa da un punto di vista ambientale, in quanto non prevede l'utilizzo di agenti chimici (Qin et al., 2018).

Lin Du (2020) e al. hanno confrontato tra loro come metodi per l'estrazione di BSG il trattamento alcalino, l'estrazione con acqua e il trattamento idrotermale, proponendo quest'ultimo come metodo promettente per il recupero di proteine. In particolare, nel caso del trattamento idrotermale si ottengono proteine con un più basso peso molecolare, il che ne migliora le funzionalità come agente schiumogeno o emulsionante (Du et al., 2020). A titolo di esempio, si riportano in Figura 1.5 i pesi molecolari delle proteine estratte a partire da diverse biomasse: BSG, foraggio (*pasture grass*, PG) e cianobatteri (*Arthrospira platensis*, AP). Si nota come gli estratti ottenuti dai diversi processi di trattamento alcalino siano caratterizzati da una elevata variabilità di pesi molecolari, quelli ottenuti con trattamento idrotermale presentano pesi molecolari più bassi, qui presentati nel caso di AP (inferiori ai 20kDa).

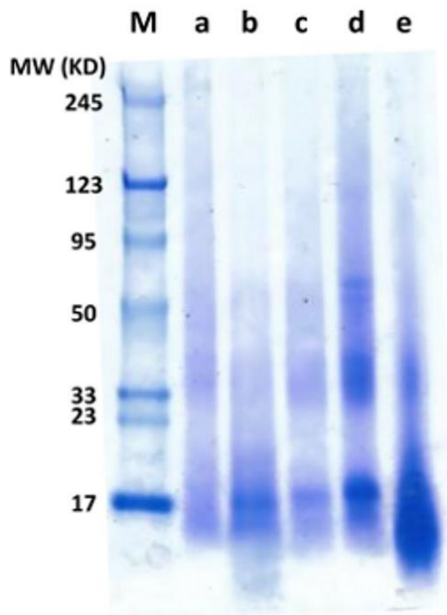


Figura 1.5.: Pesì molecolari delle proteine estratte. M: standard di pesì molecolari, a: proteine da BSG con trattamento alcalino; b: proteine da PG con trattamento alcalino; c: proteine da AP con trattamento alcalino; d: proteine da AP con estrazione con acqua; e: proteine da AP con trattamento idrotermale. *Figura tratta da* (Du et al., 2020).

Infine, è crescente l'utilizzo di tecniche di estrazione innovative che abbracciano l'ottica dell'intensificazione di processo. Tra queste trovano spazio, nell'estrazione di BSGP, l'estrazione assistita con ultrasuoni o l'applicazione di campi elettrici pulsati (Bonifácio-Lopes et al., 2020; Kamal et al., 2021).

1.2.3. Applicazioni delle proteine estratte da BSG

Le proprietà fisiche, chimiche e funzionali delle BSGP hanno portato ad un crescente interesse circa un loro possibile utilizzo. In particolare, le BSGP possono essere impiegate nell'industria alimentare come importante ingrediente funzionale e dall'elevato valore nutrizionale aggiunto, contribuendo inoltre a creare benefici economici e sociali. In particolare, le BSGP sono state inserite come ingrediente nell'impasto di prodotti da forno.

Si è visto come un loro inserimento in biscotti porti un aumento del valore nutrizionale, della qualità e del gusto (Wen et al., 2019).

Le BSGP possono essere inoltre utilizzate per la preparazione di film biodegradabili (Wen et al., 2019). Sono stati infatti eseguiti diversi studi su un loro possibile utilizzo per la formulazione di film compositi o film utilizzando solo BSGP come materia prima, ottenendo film dalle buone proprietà meccaniche e funzionali (Castanho et al., 2022; Lee et al., 2015; Proaño et al., 2020; Shroti & Saini, 2022).

Altre possibili applicazioni delle proteine estratte da BSG risultano essere: complessi proteici, mangimi ad alto contenuto proteico, bevande fermentate, prodotti proteici edibili, idrolizzati proteici (Jaeger et al., 2021; Wen et al., 2019).

1.2.4. Film da BSGP

Tra le diverse applicazioni delle BSGP sicuramente interessante risulta il loro utilizzo per la produzione di film edibili, realizzabili a partire da proteine, polisaccaridi, lipidi o da una loro combinazione (Shroti & Saini, 2022). In particolare, i film prodotti a partire da proteine si rivelano quelli caratterizzati da superiori proprietà meccaniche e di barriera. Ciò è dovuto al fatto che le proteine sono in grado di creare forti interazioni tra le catene polipeptidiche (Proaño et al., 2020). Inoltre, la forza di queste interazioni può essere modificata tramite aggiustamenti del pH, migliorando così formulazione e proprietà dei film. Il film prodotto però dal solo polimero risulta eccessivamente fragile, proprio per l'elevata forza di queste interazioni, e diviene quindi necessaria l'introduzione di un agente plasticizzante che vada a ridurre la forza, aumentando così la flessibilità del film prodotto. Gli agenti plasticizzanti più utilizzati sono: sorbitolo, polietilenglicole (PEG) e glicerolo (Proaño et al., 2020). L'elevata

potenzialità di questo tipo di applicazione ha portato ad un crescente interesse del mondo scientifico verso la formulazione di film dalle proteine estratte da BSG e verso lo studio dei parametri influenzanti le proprietà del film prodotto. A questo proposito, Proaño J. L. e al. (2020) hanno indagato la produzione di film a partire dagli estratti di proteine da BSG al variare di pH (2,8 o 11), tipologia di plasticizzante (PEG o glicerolo) e quantitativo di plasticizzante introdotto (0-0.25 g/g), ottenendo film omogenei, senza fori o aree dal comportamento fragile solo a pH=2, film migliori nel caso di utilizzo di PEG come plasticizzante e a concentrazioni intermedie di quest'ultimo (Proaño et al., 2020).

In un altro esperimento sono invece state studiate le proprietà del film prodotto al variare del pH (11,12,13) e della concentrazione di proteine (4,6,8 e 10%) (Shroti & Saini, 2022). Si è visto come l'aumento del pH fosse legato ad un aumento di solubilità, resistenza a trazione e punto di rottura nonché ad una diminuzione di capacità di rigonfiamento, attività dell'acqua e permeabilità dell'acqua. L'aumento della concentrazione di proteine invece si è dimostrata causa di un aumento del contenuto in umidità e dell'attività dell'acqua, nonché di un miglioramento delle proprietà meccaniche.

Il BSG è stato studiato anche per la produzione di film compositi. Tra questi Lee J-H e al. (2015) hanno valutato la produzione di film utilizzando chitosano e BSG, variando le concentrazioni dei due costituenti (Lee et al., 2015): il film prodotto a partire da 100% BSG si è dimostrato essere quello a minor resistenza a trazione e maggior modulo elastico. L'esatto opposto si è avuto invece nel caso del film prodotto da 100% chitosano. Il film quindi prodotto a partire da un rapporto tra i due costituenti di tipo 1:1 si è rilevato il miglior compromesso in termini di proprietà ad esso associate. Le diverse formulazioni presenti in letteratura per la produzione di film a partire dalle

proteine estratte da BSG hanno permesso di fissare e scegliere alcuni parametri di processo nella filmazione di proteine studiata nel presente lavoro di tesi.

1.3. Scopo della tesi

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è quello di valorizzare le trebbie esauste ottenute in un piccolo impianto di produzione della birra denominato "Forna", indagando in particolare modo la possibilità di poter utilizzare acqua come solvente alternativo rispetto a quelli maggiormente presenti in letteratura, al fine di rendere il processo più *green* e sostenibile. È indagata, inoltre, la possibilità di poter ottenere film dalle proteine estratte con proprietà meccaniche adatte ad un loro utilizzo nel *food packaging* o in campo farmaceutico.

In particolare, la prima fase del lavoro di tesi è relativa all'ottimizzazione delle condizioni di estrazione al fine di aumentare la resa in proteine. Questa si articola nei seguenti passaggi:

- Caratterizzazione del BSG;
- Analisi di diverse tipologie di estrazione, attraverso una variazione dei seguenti parametri:
 1. Temperatura;
 2. Tempo di estrazione;
 3. Tipologia di estrazione (agitazione con magnete, agitazione su piastra oscillante o estrazione in autoclave);

Una volta individuate le condizioni ottimali di estrazione con acqua, la seconda fase del lavoro di tesi si concentra sullo studio della filmazione delle proteine estratte nelle suddette condizioni, valutando le condizioni ottimali di filmazione attraverso la variazione di:

- pH;
- Tipologia campione;
- Tipologia stampo;
- Condizioni di stoccaggio;

- Rapporto volume/superficie di colatura;
- Essiccazione BSG;

Una volta individuate le condizioni ottimali per i suddetti parametri in termini di filmabilità delle proteine, il lavoro studia diverse possibilità per migliorare le proprietà fisiche e meccaniche dei film ottenuti, attraverso un focus sul processo di separazione delle proteine, a valle dell'estrazione delle stesse, considerando in particolare le tecniche di:

- Ultrafiltrazione;
- Filtrazione con garza di nylon;

Infine, la caratterizzazione dei film ottenuti ha permesso di analizzarne le proprietà fisiche, chimiche e meccaniche. In particolar modo, si sono effettuate le seguenti analisi di caratterizzazione:

- Microscopia ottica;
- Spettroscopia ad infrarossi a trasformata di Fourier;
- Spettroscopia ultravioletta/visibile;
- Diffrazione dei raggi X;

2. Materiali e Metodi

2.1. Estrazione di proteine

2.1.1. Brewer's Spent Grain (BSG) utilizzato e sua caratterizzazione preliminare

Nel presente lavoro sperimentale si è utilizzato il BSG derivante da un piccolo impianto di produzione denominato "Forna". Questo BSG è ottenuto nel processo di produzione di una birra chiara (Forna, 2022). Le trebbie ottenute sono state prelevate ancora calde, fatte raffreddare per qualche ora e successivamente congelate a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in modo da garantire la conservazione per tempi lunghi. Il BSG così prodotto e conservato è stato utilizzato nel presente lavoro di tesi per l'estrazione di proteine.

All'inizio del presente lavoro sperimentale è stata effettuata una caratterizzazione preliminare del BSG, al fine di valutarne il contenuto di umidità e il pH.

2.1.1.1. Valutazione del contenuto di umidità del BSG

Si è valutato il contenuto di umidità del BSG mediante metodo gravimetrico.

Si è scongelata una certa quantità di BSG e la si è suddivisa in porzioni di circa 7 g ciascuna; sono stati preparati 5 campioni. Questi sono stati pesati mediante una bilancia di precisione (*SCALTEC SBC 31*).

Successivamente i campioni sono stati essiccati in stufa (*ISCO 9000*) a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ per un tempo necessario al raggiungimento del peso costante. Prima di ciascuna pesata, i campioni sono stati fatti raffreddare per 10 min a temperatura ambiente, all'interno di un essiccatore, e da qui prelevati di volta in volta per la valutazione del peso secco. La differenza tra il peso di BSG

umido e BSG secco ha consentito di calcolare la massa di acqua contenuta nel campione. Attraverso la formula:

$$Umidità \% = \frac{massa\ BSG\ umido(g) - massa\ BSG\ secco(g)}{massa\ BSG\ umido\ (g)} \times 100$$

è stato possibile ottenere il valore di umidità percentuale del campione.

I valori ottenuti per i cinque campioni di BSG sono stati mediati al fine di ottenere un valore identificativo del lotto di BSG considerato.

La sostanza secca % del campione è stata calcolata come complemento a 100 rispetto al valore di umidità percentuale ottenuto.

2.1.1.2. Valutazione del pH del BSG

Per la misurazione del pH del BSG sono stati utilizzati i seguenti solventi: acqua deionizzata, 1 M KCl e 0,01 M CaCl₂. Di questi solventi è stato preventivamente valutato il pH tramite pH-metro (*inoLab® pH 730*), dotato di un elettrodo *SenTix® 81*. Successivamente, sono state preparate tre sospensioni contenenti 20 g di BSG umido e 50 mL di ciascuno dei tre solventi (rapporto peso/volume pari a 0,4). Queste sono state mantenute in agitazione a 150 rpm per 2 h a temperatura ambiente, tramite agitatore magnetico (*IKA® C-MAG HS4*). Al termine delle due ore si è misurato il valore di pH della frazione liquida di ciascuna delle miscele preparate.

2.1.2. Estrazioni di proteine da BSG

L'estrazione della frazione proteica di BSG è stata effettuata utilizzando come solvente acqua. Come primo obiettivo, si è cercato di individuare le condizioni migliori di estrazione. Si sono quindi testate diverse condizioni operative, valutando di volta in volta il contenuto proteico corrispondente.

Di seguito saranno riportati i parametri dell'estrazione modificati di volta in volta.

2.1.2.1. Preparazione dei campioni

Il BSG scongelato è stato essiccato in stufa a 60 °C, per 24 h. L'estrazione è stata realizzata in beute da 200 mL utilizzando 10,7 g di BSG secco e 200 mL di acqua. I grammi di BSG utilizzati si sono ottenuti considerando un rapporto di 0,0535 tra BSG secco e acqua ($g_{\text{BSG_SECCO}}/mL_{\text{H}_2\text{O}}$). Si sono così preparate cinque diverse beute, una per ognuna delle tipologie di estrazione che si è voluto testare.

2.1.2.2. Estrazione

Si sono eseguite diverse estrazioni con acqua, in modo da valutare l'influenza di tempo, temperatura e modalità di estrazione sulla resa in proteine. Le estrazioni hanno avuto una durata da 20 minuti sino a 24 ore, mentre le temperature testate sono state 20 °C, 30 °C e 121 °C. Infine, si è utilizzata l'agitazione con magnete (si sono utilizzate beute da 200 mL senza frangiflutti), oppure l'agitazione su piastra oscillante (in questo caso, si sono utilizzate beute da 200 mL con frangiflutti) o l'estrazione in autoclave senza agitazione. Per l'agitazione con magnete si è utilizzato un agitatore magnetico *IKA C Mag KS*, l'agitazione su piastra oscillante è avvenuta in un termostato *Thermo Scientific MaxQ™ 6000*. Infine, l'estrazione in autoclave è stata effettuata utilizzando un'autoclave verticale *Fedegari FVG2*. Le diverse condizioni di estrazione, secondo la combinazione di temperatura, durata e tipo di estrazione, sono riassunte in Tabella 2.1

Denominazione estrazione	Temperatura	Durata	Modalità di estrazione
A	20°C	2h	Agitazione con magnete, 500 rpm
B	20°C	2h	Agitazione su piastra oscillante, 150 rpm
C	30°C	2h	Agitazione su piastra oscillante, 150 rpm
D	30°C	24h	Agitazione su piastra oscillante, 150 rpm
E	121°C	20 min	Estrazione in autoclave

Tabella 2.1: Condizioni di estrazione testate.

2.1.2.3. Separazione

Al termine dell'estrazione, la separazione dell'estratto dalla fase solida residua è stata ottenuta tramite l'utilizzo di una *centrifuga refrigerata Centrikon T-42* con rotore fisso a 6 alloggiamenti. L'operazione è stata condotta a 20 °C, per 20 min, a 15000 rpm. Al termine della centrifugazione le trebbie esauste sono state separate tramite filtrazione con garza a singolo strato.

2.1.3. Analisi del contenuto proteico

Una volta filtrati i diversi estratti, ottenuti nelle condizioni precedentemente riportate, li si è utilizzati per le successive analisi. Al fine di ottenere campioni omogenei da cui prelevare le aliquote destinate alla caratterizzazione, si è proceduto ad una miscelazione tramite un agitatore

magnetico. In particolare, da ciascun estratto sono stati prelevati dei campioni per l'analisi spettrofotometrica, effettuando una valutazione diretta del contenuto di proteine alla lunghezza d'onda di 280 nm, cui assorbono gli amminoacidi aromatici. Si è utilizzato uno spettrofotometro *LAMBDA 465 UV/Vis PerkinElmer*. L'intensità del picco, a 280 nm, è proporzionale alla concentrazione di proteine totali presenti nel campione. Per procedere con la lettura dei valori di assorbanza per i campioni a disposizione, si è realizzata in primo luogo una lettura del "bianco", utilizzando acqua deionizzata, e si è poi proceduto alla lettura dei campioni di estratto. Questi sono stati opportunamente diluiti in modo da ottenere un valore di assorbanza nel campo di linearità secondo la legge di Lambert-Beer, che correla l'assorbanza di un campione con la concentrazione.

2.1.3.1. Retta di taratura

I valori di assorbanza ottenuti per i campioni analizzati sono stati correlati alle concentrazioni proteiche utilizzando una retta di taratura costruita con una miscela di proteine commerciali, ricavate dal siero di latte (*whey protein isolate*, WPI) e prodotte da *Milei*. Si è preparata una soluzione iniziale, avente concentrazione 2 g/L in acqua deionizzata, opportunamente miscelata tramite miscelatore vortex. Da questa si sono realizzate delle progressive diluizioni, con acqua deionizzata, in modo da ottenere le seguenti concentrazioni: 1, 0.5, 0.25, 0.125 g/L. Al fine di costruire una retta di taratura si è letto il valore di assorbanza a 280 nm delle differenti diluizioni e, successivamente, si è ricavata l'equazione della retta stessa.

2.1.3.2. Elettroforesi su gel di poliacrilammide

Gli estratti proteici sono stati, inoltre, analizzati tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide. Questa tecnica consente di separare le proteine in un campo elettrico attraverso la matrice di cui è composto il gel, la

poliacrilamide, e sfrutta la diversa velocità di migrazione in base alla dimensione e alla carica superficiale.

Per l'esecuzione di tale prova si è utilizzato un apparato di elettroforesi verticale *Mini-PROTEAN Bio-Rad*, costituito da una cella elettroforetica, deputata ad ospitare i gel ed il tampone di corsa, ed un alimentatore (Figura 2.1). Si è utilizzato come gel di separazione un *gel di poliacrilamide a gradiente 4–15%* (*Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels della Bio-Rad*), in presenza di sodio dodecil-solfato (*10 x tris/Glycine/SDS buffer Bio-Rad*). Quest'ultimo è un detergente denaturante che carica negativamente le proteine. Il gel di poliacrilamide utilizzato, inserito in un supporto in plastica, è caratterizzato da 10 pozzetti, per ospitare i campioni proteici ed i pesi molecolari di riferimento (*Precision Plus Protein Standards, PPPS*). I campioni sono stati analizzati tal quali oppure opportunamente diluiti; prima del caricamento nei pozzetti del gel, essi sono stati miscelati con un ugual volume di *Laemmli Buffer* a concentrazione 2X. I pesi molecolari di riferimento sono stati caricati nel primo e nell'ultimo pozzetto del gel, mentre negli altri sono stati posizionati i vari campioni. Il tampone di Tris/Glicina/SDS è stato utilizzato per riempire la cella elettroforetica sino a coprire completamente anodo e catodo.

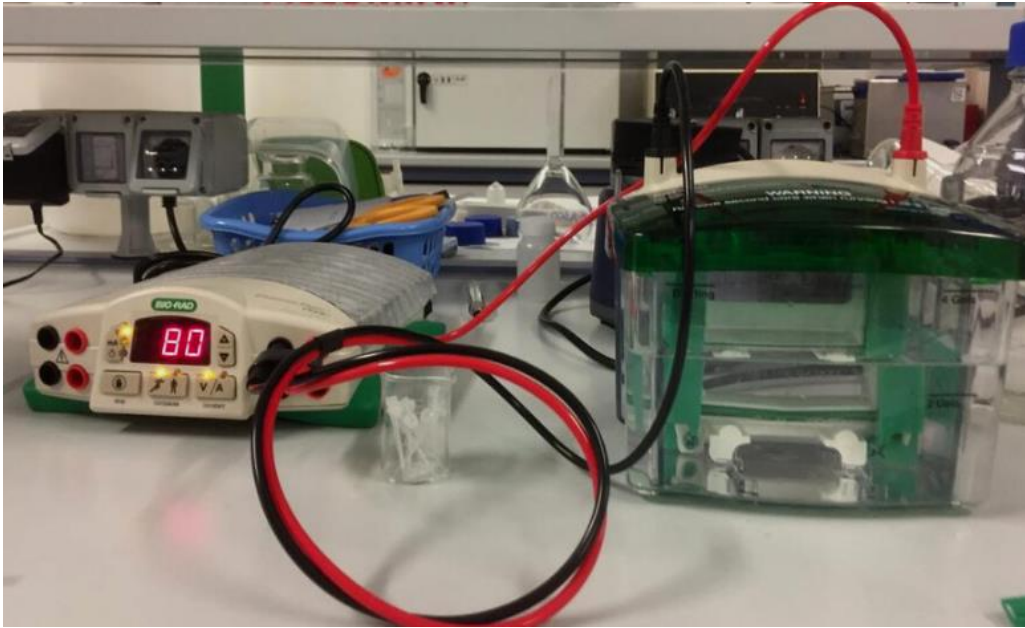


Figura 2.1.: Alimentatore (a destra) e cella elettroforetica (a sinistra).

La tipologia dei campioni e l'ordine di riempimento dei pozzetti nella corsa elettroforetica realizzata sono riportati nella Tabella 2.2.

L'eventuale diluizione dei campioni è stata determinata in base alla concentrazione proteica precedentemente valutata spettrofotometricamente.

N° pozzetto	Denominazione estratto	tipologia	Descrizione tipologia estratto
1	PPPS		
2	A		Estratto da estrazione a 20 °C, per 2 h, agitazione con magnete a 500 rpm
3	B		Estratto da estrazione a 20 °C, per 2 h, agitazione su piastra oscillante a 150 rpm
4	C		Estratto da estrazione a 30 °C, per 2 h, agitazione su piastra oscillante a 150 rpm
5	D		Estratto da estrazione a 30 °C, per 24 h, agitazione su piastra oscillante a 150 rpm
6	D, diluito 1:2		Estratto da estrazione a 30 °C, per 2 h, agitazione su piastra oscillante a 150 rpm. Diluito 1:2
7	E		Estratto da estrazione a 121 °C, per 20 min, in autoclave
8	E, diluito 1:2		Estratto da estrazione a 121 °C, per 20 min, in autoclave. Diluito 1:2
9	E, diluito 1:5		Estratto da estrazione a 121 °C, per 20 min, in autoclave. Diluito 1:5
10	PPPS		

Tabella 2.2: Elenco e descrizione dei campioni analizzati nell' elettroforesi.

Ultimato il caricamento del gel, la cella è stata alimentata con corrente a 80 V per 10 min e poi a 100 V per circa 1 h sino al raggiungimento, da parte delle bande che evidenziano i campioni, del limite inferiore del gel. Successivamente, al fine di rimuovere i residui di SDS, il gel è stato rimosso dal supporto in plastica, inserito in una vaschetta e lavato tre volte con acqua deionizzata. Il gel è stato poi ricoperto con un opportuno quantitativo di colorante (*Bio-sfe Coomassie G-250 Stain*) e messo in agitazione su una piattaforma basculante per 1 h. Infine, il gel è stato lavato con acqua deionizzata per circa 12 ore.

2.2. Filmazione delle proteine estratte

Una volta valutate le diverse condizioni di estrazione, ci si è focalizzati sullo studio della filmabilità delle proteine estratte e sulla valutazione delle proprietà e caratteristiche dei film prodotti, al fine di valutarne una loro possibile applicazione in campi quali il *food packaging* o l'industria farmaceutica.

2.2.1. Estratti utilizzati per la preparazione dei film

Si riportano in Tabella 2.3 le varie tipologie di estratto testate per la produzione di film proteici.

N° estratto	Tipologia di estratto e condizioni di indagine
1	Estratto ottenuto da BSG secco, in Autoclave, sottoposto ad un processo di congelamento e scongelamento e successivamente filtrato con filtri a trottola di porosità 0,45 µm.
2	Estratto ottenuto da BSG secco, estrazione con NaOH 1 M, sottoposto ad un processo di congelamento e scongelamento e successivamente filtrato con filtri a trottola di porosità 0,45 µm.
3	Estratto ottenuto da BSG secco, in Autoclave, non sottoposto a cicli di congelamento e scongelamento.
4	Estratto ottenuto da BSG umido, in Autoclave, non sottoposto a cicli di congelamento e scongelamento.

Tabella 2.3: Estratti testati per la produzione di film proteici.

2.2.2. Preparazione dei film

Il processo generale utilizzato per la produzione di film è descritto di seguito.

Il pH del surnatante contenente le proteine estratte è corretto mediante progressive aggiunte di HCl 1 M o NaOH 1 M fino ad un valore di pH uguale a 2 o 13 rispettivamente, per valutare l'influenza sulla successiva formazione dei film. Il pH è monitorato tramite l'utilizzo di un *pH-metro inoLab® pH 370 con elettrodo manuale SenTix® 81*. Il surnatante è stato quindi immerso in un *bagno termostatico Huber 112A-E* alla temperatura di 45 °C ed ivi mantenuto per 30 minuti in agitazione continua (Figura 2.2)(Lee et al., 2015). Al termine del trattamento termico, il glicerolo è introdotto in quantità pari al 35% w/w rispetto al peso delle proteine e la miscela viene tenuta in agitazione per 5 minuti. La frazione di glicerolo è stata scelta come valore intermedio tra quelli riportati nella letteratura scientifica (Lee et al., 2015; Proaño et al., 2020; Shroti & Saini, 2022). Successivamente, la soluzione è colata all'interno di stampi in quantità tali da ottenere un rapporto tra volume di soluzione colata e superficie dello stampo pari a 0,135 o 0,270 m rispettivamente, per valutare l'impatto sulla robustezza finale del film. Sono stati testati sia stampi in silicone che in polipropilene (piastre Petri) per individuare il materiale che meglio favorisse il successivo distaccamento dei film. Infine, gli stampi contenenti le soluzioni filmogene sono stati introdotti in una stufa *ISCO 9000* per essiccamento a 60°C per 5 h. Al termine dell'essiccamento, nel caso di filmazione e possibilità di distacco del film dallo stampo, si è proceduto con l'estrazione del film e la successiva caratterizzazione, descritta nel paragrafo 2.2.4.



Figura 2.2.: Bagno termostatico per la produzione di film dalle proteine estratte.

2.2.3. Tipologie e tecniche per la separazione

Una volta individuate le condizioni ottimali per l'ottenimento dei film, queste si sono utilizzate nella seconda parte dell'indagine sulla filmabilità delle proteine, incentrata sul processo di separazione. In particolare, si sono indagate tecniche e tipologie di separazione per un potenziale miglioramento delle proprietà fisiche e meccaniche dei film prodotti, attraverso un aumento della concentrazione di proteine o una riduzione del contenuto di inclusioni, frazioni solide o impurità, secondo quanto riportato in letteratura (Baldasso et al., 2011; Reis & Zydney, 2010). Le tecniche di separazione sperimentate sono state l'ultrafiltrazione e la filtrazione mediante garza in nylon.

2.2.3.1. Ultrafiltrazione

La prima tecnica testata per un potenziale miglioramento dei film prodotti è stata l'ultrafiltrazione, tecnica molto diffusa per la concentrazione delle proteine in soluzione e la parziale purificazione dell'estratto. Durante il processo la soluzione è posta all'interno di una cella, in cui è applicata una certa pressione e in fondo alla quale è posta una membrana semipermeabile con *cut-off* ben definito. In questo modo, il liquido solvente passa attraverso

la membrana e va a costituire il permeato, mentre le macromolecole, caratterizzate da pesi molecolari superiori al *cut-off* di membrana e non in grado, quindi, di oltrepassarla, rimangono nella cella. Di conseguenza, nel liquido che rimane all'interno della cella (retentato) aumenta la concentrazione di proteine.

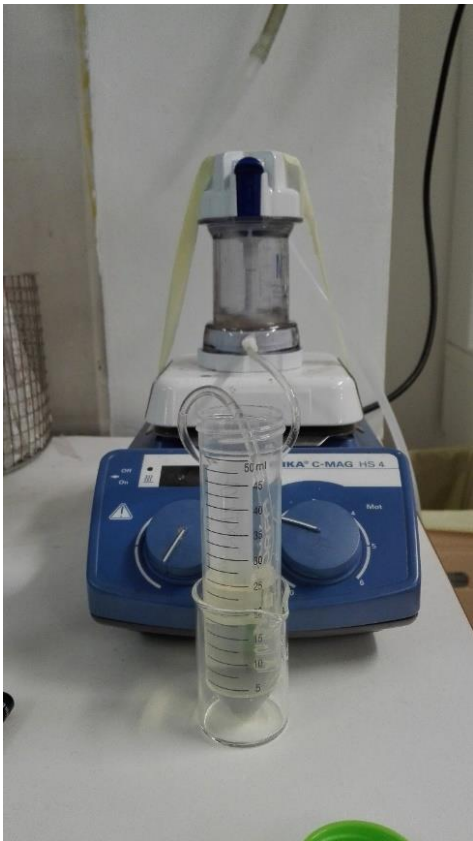


Fig. 2.3: Ultrafiltrazione degli estratti di BSG

Si è quindi deciso di sperimentare l'ultrafiltrazione per provare ad aumentare la concentrazione di proteine degli estratti da utilizzare per la produzione di film, in modo da arrivare a dei valori comparabili con quelli riportati in letteratura (Lee et al., 2015; Proaño et al., 2020; Shroti & Saini, 2022). A tal proposito, si è utilizzata una cella per ultrafiltrazione *Millipore Amicon* da 50 mL e delle membrane con *cut-off* da 10 kDa o 1 kDa.

Prima di poter però procedere con l'ultrafiltrazione è necessario chiarificare il campione. Sono state quindi eseguiti i seguenti *step*: centrifugazione a

15000 rpm per 20 min, a 20 °C; filtrazione con garza, filtrazione con carta filtro *Whatman TM*, tipo 1, 185mm Ø.



Fig.2.4: Filtrazione con carta filtro *Whatman TM*, tipo 1, 185mm Ø.

Si è scelto di eseguire l'ultrafiltrazione con un meccanismo di tipo *semi-batch* ad alimentazione intermittente (Marchetti, 1994). Si è definito “ciclo di ultrafiltrazione” il periodo di tempo intercorso tra due alimentazioni successive. I dettagli della procedura adottata sono di seguito riportati: si è alimentata la cella con 20 mL di soluzione ottenuta a valle dei diversi *step* di chiarificazione (*feed*). Ad ogni dimezzamento di volume nella cella (10 mL di retentato), si è questo riportato al valore iniziale attraverso l'aggiunta di 10 mL di soluzione chiarificata (*feed*) in modo da avere ogni volta un rapporto di tipo 1:1 tra *feed* e retentato. Si sono prelevati campioni per l'analisi spettrofotometrica dopo il secondo, il quarto e il sesto ciclo, in modo da monitorare la concentrazione di proteine ottenuta nel retentato e nel permeato. Infine, si sono realizzati film utilizzando il permeato dopo il sesto ciclo, secondo i parametri ottimali precedentemente stabiliti.

2.2.3.2. Separazioni con garza in nylon

Si sono volute indagare diverse tecniche di separazione, per testare la possibilità di ridurre il quantitativo di inclusioni e impurità, nonché la diminuzione in concentrazione di proteine. Ciò è stato valutato attraverso l'utilizzo di garza di nylon con fibre da 20 e 120 den. I diversi processi di separazione, riassunti in Tabella 2.4, sono stati testati sugli estratti 3 e 4 (Tabella 2.3), ottenuti rispettivamente da BSG umido e secco.

N° estratto	Step di separazione	Estratto utilizzato
1	Centrifugazione (15000 rpm, 20 min, 20 °C) e filtrazione con garza	Estratti n° 3 e 4
2	Centrifugazione (15000 rpm, 20 min, 20 °C) e filtrazione con garza di nylon con fibre da 20 den	Estratto n° 4
3	Centrifugazione (15000 rpm, 20 min, 20 °C), filtrazione con garza e filtrazione con garza di nylon con fibre da 120 den	Estratto n° 3 e 4
4	Centrifugazione (15000 rpm, 20 min, 20 °C), filtrazione con garza, Centrifugazione (15000 rpm, 20 min, 20 °C), filtrazione con garza	Estratto n° 3 e 4
5	Centrifugazione (15000 rpm, 20 min, 20 °C) e filtrazione con garza di nylon con fibre da 120 den	Estratto n° 3

Tabella 2.4.: Processi di separazione a cui sono stati sottoposti i diversi estratti per la produzione di film proteici.

A valle di ogni tipologia di separazione analizzata è stata effettuata un'analisi spettrofotometrica per valutare la concentrazione di proteine. La discussione circa i risultati ottenuti è riportata nel capitolo "Risultati".

2.2.4. Caratterizzazione dei film prodotti

Nei casi in cui è avvenuta filmazione delle proteine e i film prodotti sono risultati staccabili ed elastici, è stato possibile procedere con una caratterizzazione del film stesso, in modo da valutare proprietà fisiche e meccaniche e discuterne così una possibile applicabilità futura. Vengono di seguito riportate le diverse tecniche di caratterizzazione utilizzate.

2.2.4.1. Microscopia Ottica

Il microscopio ottico utilizza un sistema di lenti capaci di raccogliere ed indirizzare i raggi di luce emessi da una sorgente. In questo modo si riesce a visualizzare un'immagine ingrandita di oggetti molto piccoli. Quest'immagine ingrandita è poi ulteriormente amplificata tramite l'utilizzo di lenti aggiuntive. Per effettuare la caratterizzazione dei film prodotti, si è utilizzato un microscopio ottico *Olympus BH2*: si sono prelevati campioni per ogni tipologia di film ed inseriti su di un vetrino apposito. Le immagini ottenute sono riportate nella sezione "Risultati".

2.2.4.2. Spettroscopia ad infrarossi a trasformata di Fourier (FT-IR)

Per indagare la composizione chimica superficiale dei vari film ottenuti è stata utilizzata la spettroscopia ad infrarossi a trasformata di Fourier (FT-IR), con metodo ATR (*Attenuated total reflectance*, Riflettanza totale attenuata) (ATR-FTIR). Questa tecnica si basa sull'interazione delle molecole con una

radiazione elettromagnetica di lunghezza d'onda tra 800 e 4000 nm e la trasposizione del segnale dal dominio del tempo al dominio delle frequenze, tramite trasformata di Fourier. I picchi visualizzabili nello spettro ottenuto sono tipici di specifici legami molecolari: si riescono così ad ottenere informazioni sui composti presenti, tramite confronto con spettri noti. In particolare, per le analisi di caratterizzazione, si è utilizzato uno spettrofotometro *FTIR Nicolet iS50, con diamante ATR e ottica Smart iTX*. Sono stati posizionati di volta in volta i diversi film sullo strumento e tramite il posizionamento del puntale in punti diversi del campione, sono state effettuate più misurazioni, ottenendo così più spettri, in modo da identificare disomogeneità composizionali nei film. Si sono quindi ottenuti gli spettri per le diverse tipologie di film a disposizione e si sono attribuiti i diversi picchi a particolari legami chimici attraverso un confronto con quanto riportato in letteratura. Infine, dai legami chimici presenti si è ipotizzata la presenza di particolari composti ad essi legati.

2.2.4.3. Spettroscopia Ultravioletta-Visibile (UV-Vis)

Si è inoltre indagato lo spettro UV-Vis dei diversi film a disposizione. La spettroscopia Ultravioletta-Visibile (UV-Vis) è una tecnica spettroscopica legata ai fenomeni di assorbimento delle radiazioni nel campo del visibile (350-700 nm) e del vicino ultravioletto (200-350 nm). In quest'apparecchiatura, è misurata, tramite dei rilevatori, l'intensità del flusso luminoso all'ingresso (I_0 , luce incidente) e all'uscita della cella col campione (I , luce trasmessa): da queste misure si ottiene il valore di trasmittanza, definita come il rapporto tra la luce trasmessa e quella incidente, espresso in percentuale:

$$T = \frac{I}{I_0} \cdot 100$$

Bassi valori di trasmittanza stanno quindi ad indicare un elevato assorbimento da parte del film. Può quindi questa essere presa come una misura della trasparenza del film, caratteristica da prendere in considerazione nel caso di applicazioni per *food packaging* o per l'industria farmaceutica. Per la caratterizzazione dei film si è utilizzato uno spettrofotometro *Lambda 465 UV/Vis Perkin Elmer* e si sono indagati i valori di trasmittanza al variare della lunghezza d'onda.

2.2.4.4. Diffrazione dei Raggi X

La diffrattometria dei raggi X (XRD) è utilizzata per la determinazione della struttura cristallina di un materiale. In particolare, nel diffrattometro si invia un fascio di raggi X sul campione, con un certo angolo di incidenza, e si misura la dispersione dei raggi X da parte del materiale, in termini di intensità e gli angoli di diffusione. Nel caso di un solido cristallino, a determinati angoli di incidenza, si ha un'interferenza costruttiva delle onde parallele diffratte e la creazione di picchi di intensità, andando così a generare uno spettro che ne costituisce l'impronta digitale. Attraverso un confronto con gli spettri presenti in letteratura, è possibile l'identificazione del materiale analizzato. Gli angoli per cui si genera quest'interferenza costruttiva sono angoli per cui è soddisfatta la legge di Bragg:

$$2d\sin\theta = n\lambda$$

Dove d è la distanza tra due piani del reticolo cristallino, θ è l'angolo di incidenza, che si ha tra la direzione dei raggi incidenti e la famiglia dei piani cristallini e λ è la lunghezza d'onda della radiazione. Nel caso invece di un solido amorfo, non si ha interferenza costruttiva e lo spettro generato quindi non presenta picchi di intensità al variare dell'angolo di incidenza.

Nelle prove si è utilizzato un diffrattometro *PANalytical X'Pert*, radiazione *Cu K α* .

3. Risultati e discussione

3.1. Estrazione di proteine

3.1.1. Valutazioni preliminari del BSG

In Tabella 3.1 sono riportati i risultati ottenuti dalla valutazione del contenuto di umidità per le trebbie utilizzate. In particolare, si riportano le percentuali in peso di acqua e solidi totali presenti, dove quest'ultimo valore è calcolato come complemento a 100 rispetto al valore di umidità percentuale ottenuto. Il valore di umidità ottenuto, pari al $69,13 \pm 1,00$ %, è in linea con i tipici valori di umidità associati al BSG e riportati in letteratura (Bianco et al., 2020).

% in peso	
Acqua	$69,13 \pm 1,00$
Solidi totali	$30,87 \pm 1,00$

Tabella 3.1: Percentuali in peso di solidi totali ed acqua nelle trebbie utilizzate (produzione “Forna”).

Dai valori ottenuti dalle misurazioni del pH e riportati in Tabella 3.2 si constata un abbassamento del pH rispetto al singolo solvente puro, nel caso dell'introduzione di BSG nel sistema. Ciò è indice di una sua leggera acidità.

Tipologia solvente	pH solvente puro	pH soluzione
acqua deionizzata	$6,02 \pm 0,12$	$5,27 \pm 0,07$
cloruro di potassio 1 M	$6,45 \pm 0,09$	$6,00 \pm 0,01$
cloruro di calcio 0,01 M	$5,33 \pm 0,20$	$5,13 \pm 0,02$

Tabella 3.2: Risultati misurazione del pH delle trebbie esauste analizzate (produzione “Forna”).

Il BSG utilizzato nel presente lavoro di tesi è stato utilizzato anche in un secondo lavoro sperimentale per la produzione di carotenoidi tramite processi di fermentazione con *R. mucilaginosa*. In questo lavoro, oltre alla caratterizzazione del BSG *Forna*, si è effettuato anche un confronto del suddetto BSG con BSG derivanti da birrifici professionali, quali *Edit* e *Leumann*, ottenendo valori non troppo dissimili in termini di pH e contenuto di umidità per i tre diversi BSG analizzati (Forna, 2022).

3.1.2. Estrazione

Si riporta la retta di taratura costruita con una miscela di WPI commerciali, interpolando i valori di assorbanza ottenuti a diverse concentrazioni. Questa retta di taratura è stata successivamente utilizzata per il calcolo del contenuto proteico nei diversi campioni analizzati, a partire dai valori di assorbanza ottenuti dall'analisi spettrofotometrica.

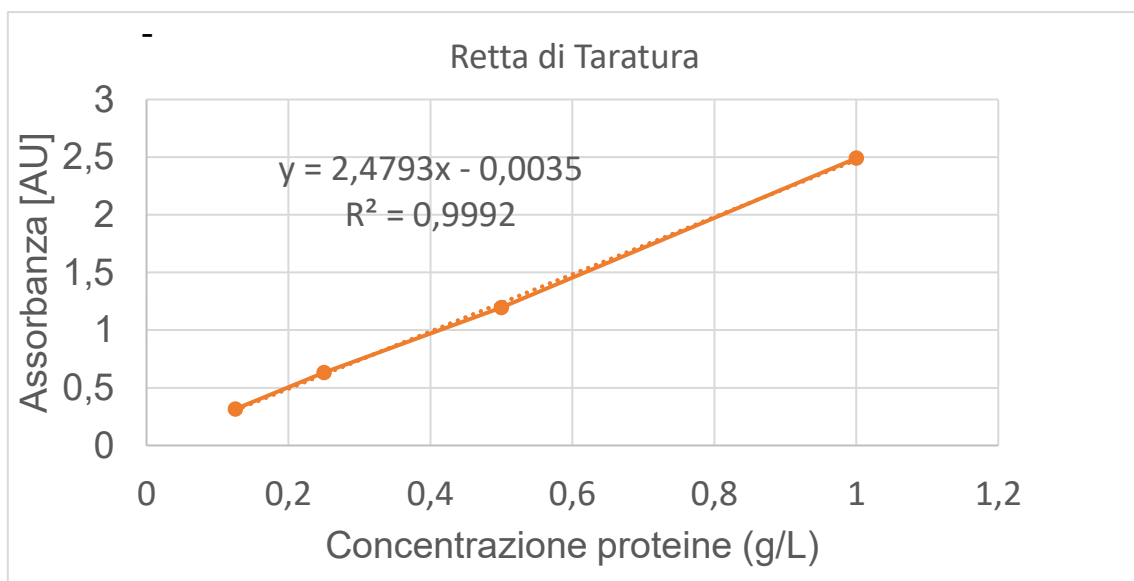


Figura 3.1.: Retta di taratura realizzata tramite una lettura spettrofotometrica diretta a 280nm, utilizzando come standard WPI commerciali (prodotti da *Milei*).

Vengono riportati in Tabella 3.3 i risultati ottenuti dall'analisi dei campioni di estratti analizzati, in termini di pH, °Br e contenuto proteico.

Tipologia estratto	pH	°Br (Brix %)	Contenuto proteico (g/L)	$\frac{g_{proteine}}{Kg_{BSGsecco}}$ (g/Kg)
Estrazione a 20 °C, per 2 h, agitazione con magnete a 500 rpm. (estratto A)	6,15± 0,10	1,2± 0,05	1,205± 0,50	19,93± 10,20
Estrazione a 20 °C, per 2 h, agitazione su piastra oscillante a 150 rpm. (estratto B)	5,96 ± 0,17	0,97 ± 0,06	4,31 ± 0,34	70,19 ± 7,82
Estrazione a 30 °C, per 2 h, agitazione su piastra oscillante a 150 rpm. (estratto C)	5,97 ± 0,20	1,13 ± 0,06	4,61 ± 0,55	77,90 ± 8,68
Estrazione a 30 °C, per 24 h, agitazione su piastra oscillante a 150 rpm. (estratto D)	4,38 ± 0,02	1,57 ± 0,15	8,16 ± 0,52	134,38 ± 15,07
Estrazione a 121 °C, per 20 min, in autoclave. (estratto E)	5,82 ± 0,12	1,63 ± 0,21	10,03 ± 1,59	154,15 ± 23,80

Tabella 3.3.: Risultati valutazioni pH,°Br e contenuto proteico dei diversi campioni analizzati.

Si riporta inoltre un grafico di confronto tra i diversi valori ottenuti, in termini di quantitativo di proteine per BSG secco ($\frac{g_{proteine}}{Kg_{BSG}}$).

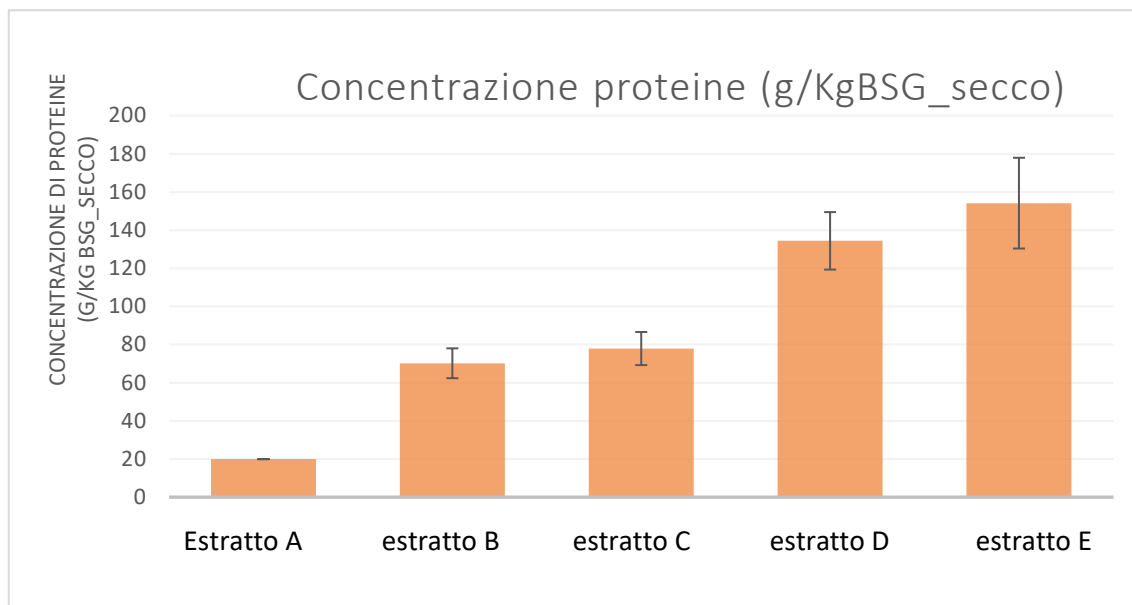


Figura 3.2: Grafico relativo alla concentrazione proteine (g/KgBSGsecco) per i diversi campioni analizzati.

Dall'analisi dei risultati ottenuti dalla valutazione del pH si riscontra una leggera acidità in tutti i campioni analizzati. In particolare, il trattamento a 30 °C, per 24 h, con agitazione su piastra oscillante (estratto D), produce il surnatante caratterizzato da un'acidità maggiore ($4,38 \pm 0,02$). Ciò, quindi, potrebbe star ad indicare che una durata di agitazione maggiore comporti un maggiore rilascio di composti acidi. Per quanto invece riguarda il contenuto zuccherino, si ottengono dei valori simili tra loro e tutti abbastanza elevati. Nel caso di estrazione a 30°C, per 24 h (estratto D) e nell'estrazione in autoclave (estratto E) si ottengono risultati più elevati in termini di °Br, pari a $1,57 \pm 0,15$ e $1,63 \pm 0,21$ Brix %, rispettivamente. Ciò sta ad indicare che le condizioni più estreme di estrazione, caratterizzate cioè da una durata o temperatura superiori, provocano, oltre all'estrazione di proteine, un maggior rilascio di contenuto zuccherino. Questo quantitativo però non risulta essere molto più elevato rispetto al caso delle altre condizioni estrattive (estratti A, B e C), il che sta ad indicare un'importante selettività del solvente nei confronti delle proteine. Ad ogni modo, la similarità dei

risultati in termini di pH e °Br tra i diversi casi e l'assenza di valori discostanti, confermano la potenziale applicabilità delle diverse condizioni per l'estrazione di proteine.

Per quanto riguarda il contenuto proteico si riscontrano, invece, differenze non trascurabili tra le diverse tipologie di estratto. In primo luogo, la modalità di estrazione risulta essere influente sul processo stesso. Infatti, la miscelazione su piastra oscillante rispetto a quella con magnete (estratti B e A, rispettivamente) permette di passare da valori di $1,205 \pm 0,50$ a valori di $4,31 \pm 0,34$ g/L. Il lieve aumento di temperatura invece (passaggio da estratti B a estratti C) non sembra apportare apprezzabili modifiche in termini di contenuto proteico. Si ottengono infatti dei valori di concentrazione pari a $4,61 \pm 0,55$ g/L nel caso dell'estratto C. Un aumento del tempo di estrazione invece risulta favorire il processo estrattivo: prolungando infatti la durata da 2 a 24 h (passaggio da estratti C a estratti D), si riesce ad ottenere un contenuto proteico estratto quasi raddoppiato rispetto al caso di partenza e pari a $8,16 \pm 0,52$ g/L. È da tener presente però in questo caso, che la maggiore durata di agitazione comporta aumenti anche in termini di consumo energetico. Infine, il trattamento in autoclave si dimostra essere quello legato ad una maggiore concentrazione proteica nell'estratto, proponendosi come il miglior metodo di estrazione di proteine tra quelli analizzati, con una concentrazione di proteine pari a $10,03 \pm 1,59$ g/L. Ciò è in accordo con quanto riportato in letteratura circa le interessanti potenzialità del trattamento idrotermale per l'estrazione di proteine (Qin e al., 2018; Du e al., 2020). In questo modo si individua un metodo efficace che permette di evitare l'utilizzo di un agente chimico per l'operazione di estrazione, proponendosi così come alternativa sostenibile e *green* rispetto alle tecniche estrattive convenzionali. Ciò risulta di primaria importanza dato il progressivo e sostanziale spostamento dell'industria chimica verso processi

e prodotti più *green*, in grado di abbracciare i 12 principi della *Green Chemistry*.

Individuato quindi l'estratto ottenuto tramite estrazione in autoclave come quello ottimale, in quanto legato ad una maggiore concentrazione di proteine, si è utilizzato quest'ultimo nella fase successiva del lavoro, volta all'applicazione delle proteine estratte per la produzione di film proteici.

3.2.1.2. Analisi SDS-PAGE

Si riporta, in Figura 3.3, l'immagine dell'elettroforesi su gel di poliacrilammide. I campioni analizzati sono stati gli estratti ottenuti con le diverse metodologie di estrazione. Per gli estratti caratterizzati da una concentrazione proteica superiore, quali l'estrazione a 30 °C, per 24 h, con agitazione su piastra oscillante (estratto D) e l'estrazione in autoclave (estratto E), si è prevista una diluizione 1:2. Per l'estratto E si è prevista un'ulteriore diluizione 1:5. Per gli estratti A (agitazione con magnete, estrazione a 20°C, per 2 h), B (estrazione a 20°C, per 2 h, con, con agitazione su piastra oscillante) e C (estrazione a 30°C, per 2 h, con, con agitazione su piastra oscillante) si sono invece analizzati i soli campioni tal quali. Tramite l'analisi SDS-PAGE, si è voluto indagare l'influenza delle condizioni di estrazione sulla distribuzione dei pesi molecolari delle proteine. La legenda del tipo di estratto e dei µg di proteine totali inseriti in ogni pozzetto del gel è riportata nella Tabella 3.4.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tipologia estratto	PPPS	A	B	C	D	D dil. 1:2	E dil. 1:2	E	E dil. 1:5	PPPS
Totale proteine nel pozzetto(µg)		6,02	21,56	23,04	40,78	20,39	25,08	50,15	10,03	

Tabella 3.4: Elenco dei campioni inseriti nei pozzetti del gel.

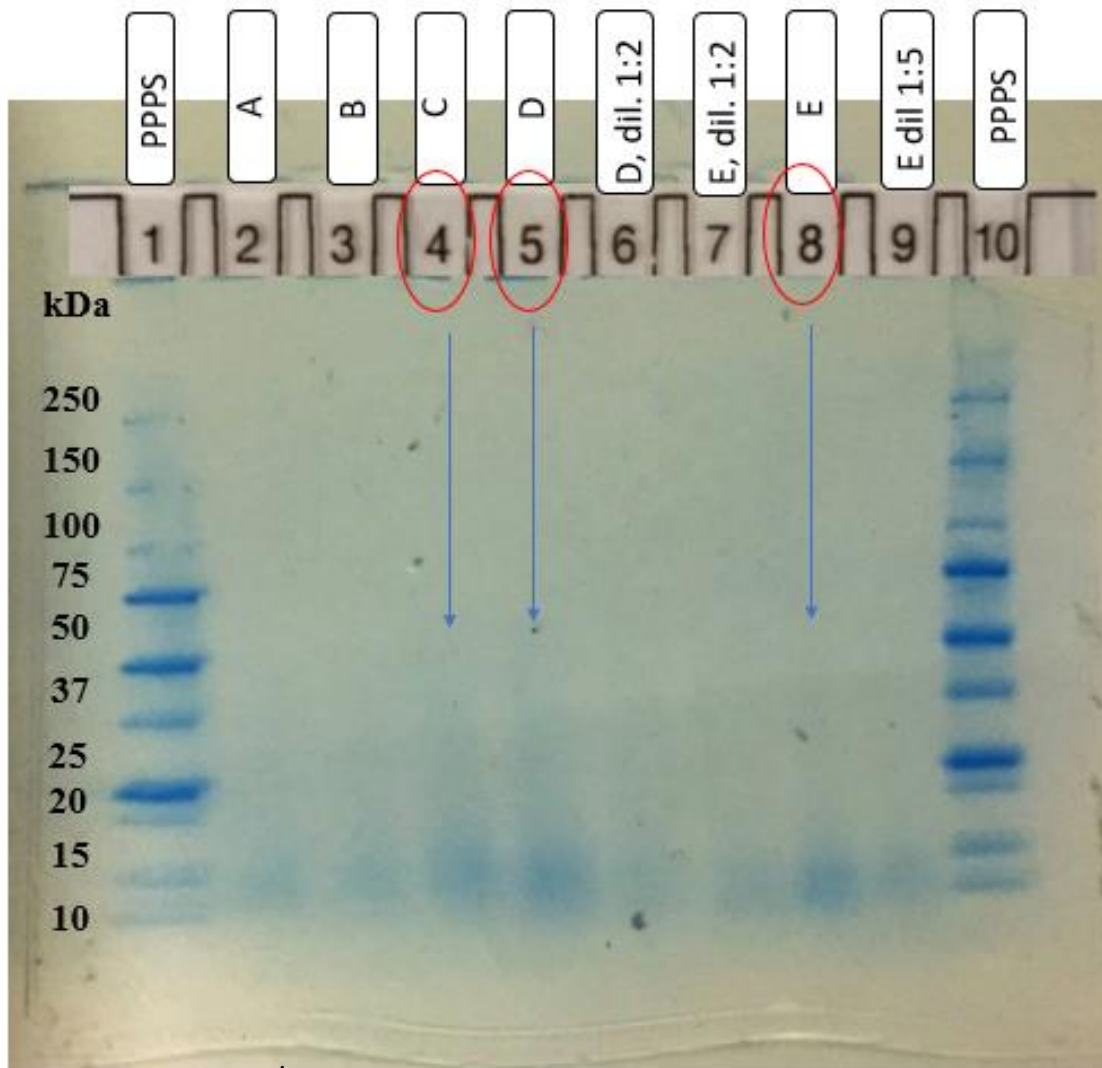


Figura 3.3: Elettroforesi su gel di poliacrilamide relativa ai campioni ottenuti con estrazione con acqua, in diverse condizioni di tempo, temperatura e modalità di estrazione.

In generale, le bande ottenute per i vari campioni risultano poco evidenti e si trovano in corrispondenza di un intervallo di pesi molecolari bassi, compresi tra 10 e 15 kDa; risultano più intense solo le bande relative ai campioni C, D ed E, caratterizzati da una concentrazione proteica maggiore. Occorre sottolineare che la banda relativa al campione C (23,04 µg) risulta più intensa rispetto a quelle dei campioni in posizione 3, 6 e 7 (campioni B, D dil. 1:2 e E dil. 1:2), nonostante un quantitativo molto simile di proteine (rispettivamente 21,56 µg, 20,39 µg, 25,08 µg). Dall'osservazione del gel si può dedurre che il peso molecolare delle proteine estratte non sia influenzata dalle condizioni di estrazione applicate.

I valori caratteristici riportati in letteratura, in termini di pesi molecolari di proteine estratte da BSG, risultano compresi tra 30 e 90 kDa (Proaño et al., 2020). I valori inferiori, compresi tra 10 e 15 kDa, ottenuti nel presente lavoro sperimentale potrebbero essere dovuti ad un'idrolisi verificatasi in tutti i campioni analizzati, indipendentemente dal tipo di estrazione.

Al fine di confermare le osservazioni riportate nel presente paragrafo, si sono realizzate due ulteriori corse elettroforetiche, i cui dettagli e risultati sono riportati in "Appendice".

3.2. Filmazione proteine estratte

3.2.1. Condizioni ottimali individuate

L'analisi della variazione dei parametri di processo ha permesso di identificare le condizioni ottimali per l'ottenimento di film a partire dalle proteine estratte dal BSG. Di seguito vengono riportati i diversi risultati ottenuti negli esperimenti effettuati e i valori quindi scelti come ottimali per la formulazione di film proteici.

3.2.1.1. Influenza del pH

Per la valutazione dell'influenza del pH si è utilizzato l'estratto n°1 (Tabella 2.3), ottenuto da BSG secco, estrazione con acqua in autoclave e sottoposto ad un processo di congelamento, scongelamento e filtrazione. A valle della filtrazione con filtri a trottola di porosità 0,45 μm , è stato prelevato un campione di 3 mL per un'analisi spettrofotometrica, da cui si è ottenuta una concentrazione di proteine pari a 2,6 g/L. L'estratto è stato indagato a pH=2 e pH=13, utilizzando soluzioni di HCl 1 M e NaOH 1 M e considerando un rapporto Volume/superficie di colatura pari a 0,135 m.

I film ottenuti vengono riportati in Figura 3.6.

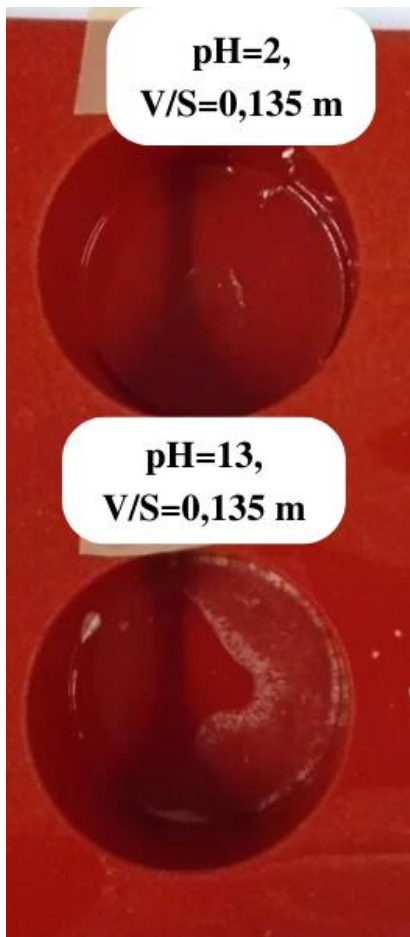


Fig 3.6.: Film prodotti da estratti di tipo 1, a pH=2(in alto) e pH=13(in basso). V/S=0,135m.

La *film forming solution* preparata a pH=13 non filma, risulta di composizione pastosa e presenta una leggera colorazione superficiale biancastra. Quella ottenuta invece a pH=2 filma, ma il film non risulta strutturalmente continuo, omogeneo da un punto di vista di rugosità superficiale o staccabile dallo stampo. Non è stato quindi possibile estrarlo dallo stampo ed utilizzarlo per successive analisi.

Da questo primo esperimento quindi il pH acido risulta essere più favorevole alla filmazione di proteine da BSG. Questo può essere spiegato dal fatto che il pH è in grado di influenzare la carica delle proteine e quindi la modalità di interazione tra i peptidi nella formazione del film: pH prossimi al punto isoelettrico risultano favorire l'interazione tra proteine e quindi la formulazione di film (Proaño et al., 2020). La non continuità o staccabilità

del film ottenuto potrebbe essere dovuta alla bassa concentrazione di proteine nell'estratto di partenza. Si è quindi deciso di indagare estratti caratterizzati da una concentrazione di proteine maggiori.

3.2.1.2. Influenza del solvente di estrazione e della concentrazione di proteine

Per la valutazione dell'influenza del solvente di estrazione si è utilizzato l'estratto n°2 (Tabella 2.3), ottenuto mediante estrazione con NaOH e sottoposto ad un processo di congelamento, scongelamento e filtrazione. Si è quindi valutata la concentrazione di proteine nel campione a valle della filtrazione, ottenendo un valore pari a 9,1 g/L. Si è indagato l'estratto agli stessi valori di pH dell'estratto n°1 (pH=2, pH=13). Si è utilizzato un analogo rapporto volume/superficie di colatura pari a 0,135m. I campioni a pH = 13 sono stati ottenuti aggiungendo all'estratto soluzioni di NaOH 6,25 M e 1 M, diluendolo così fino alle concentrazioni proteiche di 7,3 e 3 g/L rispettivamente, quest'ultima prossima alla concentrazione di 2,6 dell'estratto n°1, ottenuto mediante estrazione con acqua in autoclave. Questo ha permesso, da un lato, di valutare il ruolo della concentrazione di proteine a parità di pH e di solvente di estrazione, e, dall'altro, di valutare l'influenza del solvente di estrazione per valori simili di concentrazione proteica. I valori di concentrazione di proteine, diversi per i tre film, sono stati utilizzati per l'aggiunta di glicerolo da aggiungere alla formulazione.

Si riportano in Figura 3.7 i film ottenuti con questa diversa tipologia di estratto.

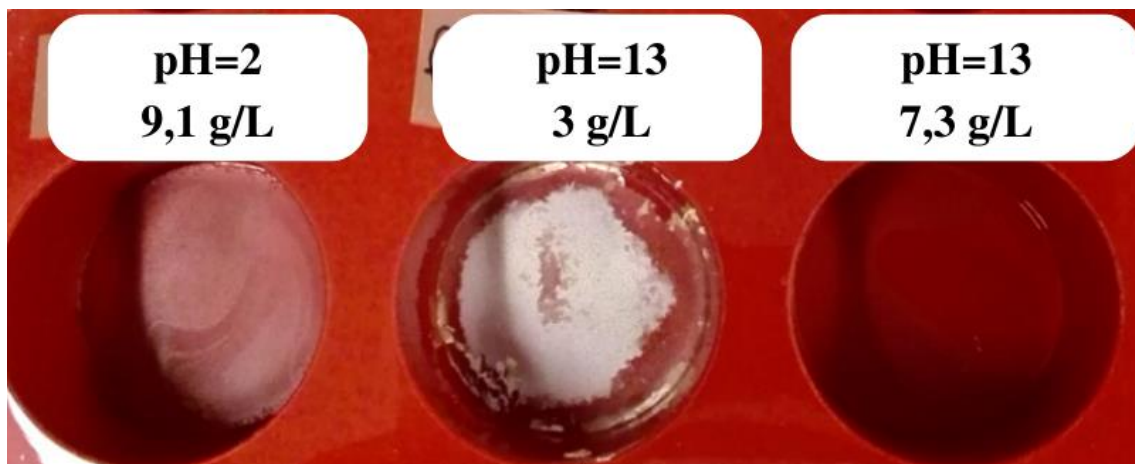


Fig 3.7.: Film da estratto n°2.

I risultati ottenuti con questo secondo esperimento confermano quanto ottenuto in termini di influenza del pH, mostrandosi visibilmente migliori nel caso di pH=2. Si ha quindi come primo risultato di questo secondo esperimento una conferma di quanto ottenuto nel primo. In questo caso però, né per i due valori di pH (2 e 13), né per le diverse concentrazioni di proteine si ha la formazione di un film, neanche alle maggiori concentrazioni di proteine. L'estratto n°2 quindi non si dimostra adatto alla produzione di film, nonostante la maggiore concentrazione di proteine, il che può dipendere dal pH alcalino di partenza. Inoltre, la colorazione biancastra, già ottenuta nell'esperimento precedente, risulta in questo caso più marcata ed evidente, soprattutto nel caso della minor concentrazione di proteine (3 g/L). Si è quindi deciso di studiare la polvere biancastra ottenuta per individuarne la natura. In particolare, si è prelevato il solido ottenuto a pH=13 nel presente esperimento e lo si è sospeso in 5 mL di acqua deionizzata. La soluzione ottenuta è stata analizzata allo spettrofotometro, il quale ha messo in evidenza un picco di assorbanza a 280 nm, corrispondente ad una concentrazione di proteine pari a 1,66 g/L. Si conclude che il pH=13 per la formulazione di film da proteine da BSG può comportare una parziale precipitazione di proteine, che impedirebbe dunque la formazione di un film.

3.2.1.3. Influenza della tipologia di stampo

Per la valutazione dell'influenza del tipo di stampo, si sono utilizzate le stesse *film forming solutions* realizzate nel punto precedente (da estratto n°2, a pH=2, pH=13 e pH=13 con correzione del pH tramite soluzione di NaOH 6,25 M), che sono state colate in stampi in polipropilene (piastre Petri), in modo da effettuare un confronto con quanto ottenuto in precedenza. Si sono ottenuti risultati non dissimili rispetto alla colatura in stampo in silicone. Si registrano infatti risultati migliori nel caso di pH=2 e una colorazione biancastra nel caso di pH=13, maggiormente accentuata nel caso di correzione del pH tramite soluzione NaOH 1 M. Sulla base quindi di una non evidente influenza della tipologia di stampo adottata sulle proprietà del film prodotto, si è deciso di adottare lo stampo in silicone per la produzione dei film successivi, in quanto legato ad una maggiore facilità di prelievo del film. Si riportano in Figura 3.8 i risultati ottenuti con le piastre Petri. Anche in questo caso l'assenza di filmazione non ha permesso un prelievo dallo stampo.

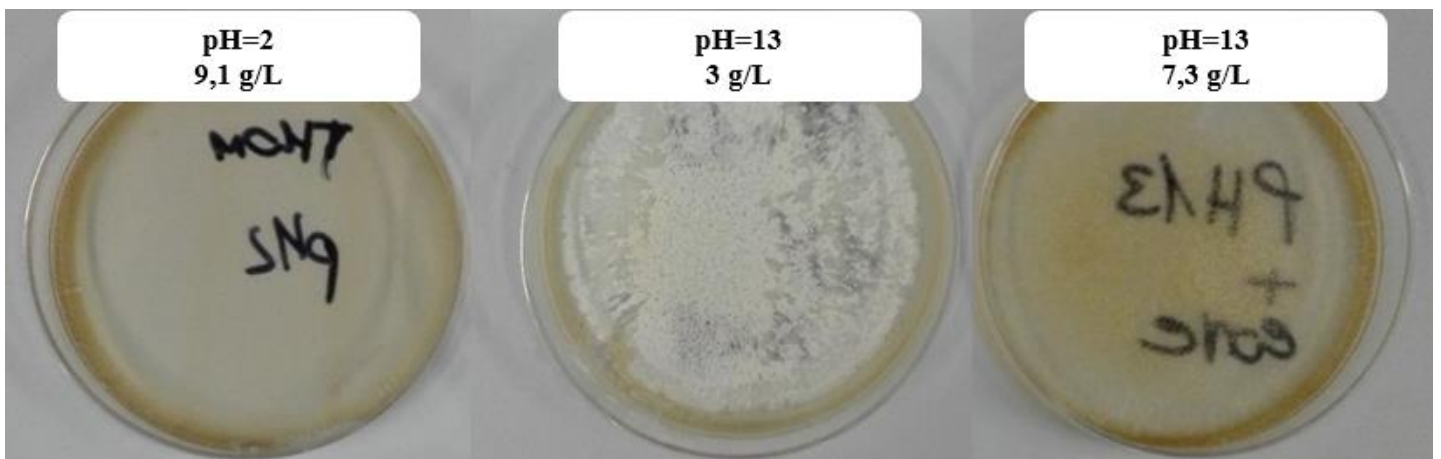


Fig 3.8.: Film su piastre Petri da estratto n°2.

3.2.1.4. Influenza del congelamento dei campioni

Dall'analisi spettrofotometrica dei campioni utilizzati nei precedenti esperimenti, si è visto come lo scongelamento degli stessi e la successiva filtrazione sia stata causa di un'importante diminuzione della concentrazione di proteine, come si può vedere dai valori riportati in Tabella 3.11, per i diversi *step*.

Tipologia campione	Concentrazione proteine pre-congelamento (g/L)	Concentrazione proteine post-scongelo (g/L)	Concentrazione proteine post-scongelo e filtrazione (g/L)
Estratto n°2	34	12,1	10
Estratto n°1	7	2,6	2,6

Tabella 3.11.: Concentrazione proteine negli estratti scongelati, nei diversi step di scongelamento.

A questo proposito si è deciso di utilizzare estratti che non abbiano subito processi di congelamento e scongelamento, in modo da avere a disposizione estratti con concentrazioni di proteine superiori.

Per la valutazione dell'influenza del congelamento dei campioni, si sono realizzati estratti del tipo n°3, ottenuto da BSG secco, tramite estrazione con acqua in Autoclave e non sottoposto a cicli di congelamento e scongelamento (Tabella 2.3). Il surnatante ottenuto a valle di centrifugazione e filtrazione con garza è stato valutato attraverso un'analisi spettrofotometrica, ottenendo un valore di concentrazione pari a 5,3 g/L. Si è quindi ottenuto un estratto di

partenza con concentrazione di proteine superiore rispetto a quella relativa all'estratto del tipo n°1 (2,6 g/L), prodotto a partire dalle stesse condizioni di estrazione ma sottoposto a processi di congelamento e scongelamento. Il film ottenuto da questo nuovo estratto è riportato in Figura 3.9: si ottiene un film visivamente migliore, in linea con quanto atteso, continuo, ma difficilmente staccabile. Nei successivi esperimenti si sono quindi utilizzati estratti che non abbiano subito processi di congelamento e scongelamento.

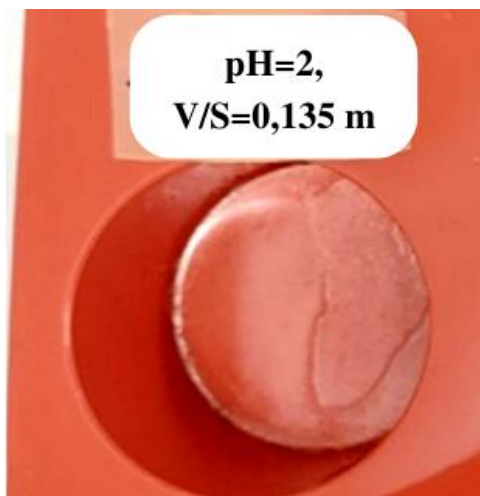


Fig.3.9: Film prodotto a partire dall'estratto n°3.

3.2.1.5. Influenza dell'essiccazione del BSG

Per la valutazione dell'influenza dell'essiccazione del BSG, si è realizzato un film a partire dall'estratto n°4 (Tabella 2.3), prodotto nelle stesse condizioni dell'estratto n°3 ma a partire da BSG umido. Si ottengono in questo caso valori di concentrazioni di proteine (4,2 g/L) inferiori rispetto al BSG essiccato (5,3 g/L). Si riporta in Figura 3.10 il film ottenuto nel caso di BSG umido, a pH=2: il film si dimostra non staccabile né strutturalmente continuo. Dunque, l'essiccazione del BSG si dimostra favorevole per la filmazione delle proteine da BSG. Un confronto più approfondito tra BSG secco e umido è riportato nel paragrafo "Separazioni con garza in nylon".

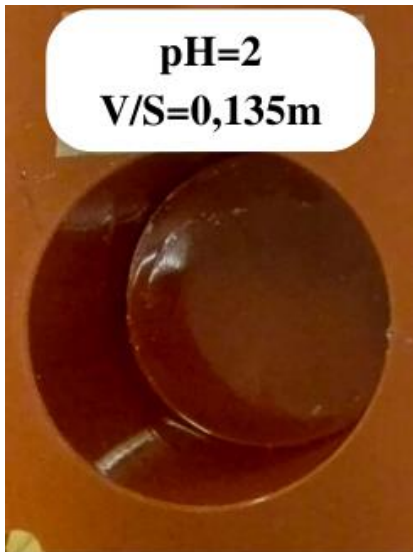


Fig 3.10.: Film da estratto n°4.

3.2.1.6. Influenza del rapporto Volume/Superficie

Per valutare l'influenza del rapporto Volume/Superficie di colatura, si è realizzato un film (riportato in Figura 3.11) a partire sempre dall'estratto n°3, a pH=2, ma considerando un rapporto $V/S=0,270$ m. Questo raddoppiamento del rapporto ha permesso di ottenere un film migliore (continuo e omogeneo da un punto di vista di rugosità superficiale) e facilmente staccabile. Le proprietà meccaniche del film risultano però troppo scarse per poterlo utilizzare per una successiva caratterizzazione.

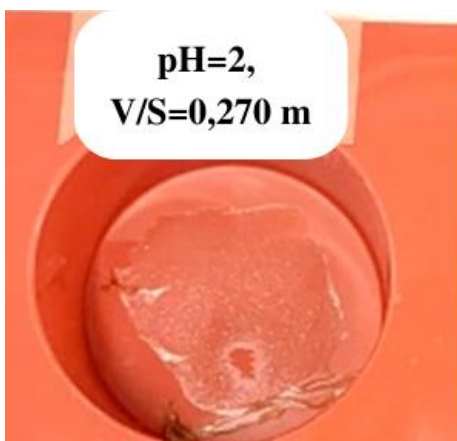


Fig. 3.11.: Film a partire estratto n°3, $V/S=0,270$ m.

3.2.2. Tipologie di separazione

Dagli esperimenti effettuati si è quindi appurato che la condizione ottimale per l'ottenimento dei film proteici è l'utilizzo dell'estratto n°3, a pH=2, con V/S=0,270 m. Questa condizione è stata utilizzata nella successiva produzione di film, in cui si è tentato di incrementare la concentrazione di proteine nella *film forming solution* e di ridurre le impurezze nel film attraverso differenti tecniche di separazione, quali ultrafiltrazione e filtrazione con garza in nylon.

3.2.2.1. Ultrafiltrazione

A valle dei diversi processi effettuati per la chiarificazione del campione descritti nella sezione 2.2.3.1., necessari per poter utilizzare l'ultrafiltrazione, sono stati prelevati dei campioni di retentato e se ne sono analizzate le concentrazioni di proteine attraverso analisi spettrofotometrica. Le concentrazioni di proteine a seguito degli *step* di chiarificazione e dei vari cicli di ultrafiltrazione sono riportate nelle Tabelle 3.12 e 3.13, rispettivamente.

Step di chiarificazione	Concentrazione proteine (g/L)
Centrifugazione (20°C, 20 min, 15000 rpm) e filtrazione con garza	5,2
Centrifugazione (20°C, 20 min, 15000 rpm)	2,8
Filtrazione con carta filtro (porosità 11 µm)	2,8

Tab 3.12: Concentrazione di proteine a valle dei diversi step di chiarificazione dell'estratto.

Si riscontra un'importante diminuzione della concentrazione di proteine a seguito della seconda centrifugazione (2,8 g/L), rispetto ai valori ottenuti a valle della singola centrifugazione e successiva filtrazione con garza (5,2

g/L). La filtrazione con carta filtro invece non sembra apportare variazioni in termini di concentrazione proteica. Ciò sta ad indicare che è il processo di centrifugazione quello maggiormente legato ad una diminuzione di concentrazione di proteine. In generale, l'insieme degli *step* di chiarificazione riduce di molto la concentrazione proteica dell'estratto.

Tipologia stream	Concentrazione proteine (g/L)		
	2° ciclo	4° ciclo	6° ciclo
Permeato	2	2	2
Retentato	4,42	4,8	5,2

Tabella 3.13: Concentrazione di proteine a valle dei diversi cicli di ultrafiltrazione.

In Figura 3.12 è invece riportato il film ottenuto utilizzando il retentato al sesto ciclo di ultrafiltrazione. Nonostante la concentrazione di proteine sia simile a quella del “tal quale” (estratto n°3 ottenuto a valle della prima centrifugazione e successiva filtrazione con garza) con cui si è ottenuto un buon film, il film prodotto è eccessivamente fragile per essere prelevato dallo stampo. Un motivo di ciò potrebbe essere che, così come riportato in alcuni lavori (Proaño et al., 2020), le proteine con peso molecolare inferiore al *cut-off* di membrana (10 kDa), più polari e solubili, svolgono una funzione auto-plasticizzante. In questo caso, avendo eliminato proprio questa frazione di proteine, viene a mancare quest'effetto.



Fig. 3.12.: Film da retentato a valle di sei cicli di ultrafiltrazione.

Se ne conclude che l'ultrafiltrazione non risulta essere una tecnica vantaggiosa per la concentrazione di proteine nella produzione di film proteici da BSG. Infatti, aumentando il numero di cicli, sicuramente si arriva a valori di concentrazione proteica superiori rispetto a quelli di partenza, ma allo stesso tempo si aumentano di molto i costi energetici e si ottengono dei film più fragili, in quanto viene eliminata proprio la frazione a più basso peso molecolare, che ne migliora la plasticità. Inoltre, i necessari *step* di chiarificazione a monte dell'ultrafiltrazione vanno ad eliminare le impurezze, che hanno un'azione rinforzante sulla struttura del film.

3.2.2.2. Separazione con garza in nylon

Riscontrata una drastica diminuzione della concentrazione di proteine nei processi di separazione con duplice centrifugazione e successiva filtrazione con garza, così come mostrato nei risultati precedenti, si è voluto indagare un'alternativa di separazione, con un solo *step* di centrifugazione ed impiegando garze in nylon con fibre da 20 o 120 den. Per un ulteriore confronto tra film prodotti a partire da BSG secco o umido, si sono indagati estratti sia di tipo 3 che di tipo 4 (Tabella 2.3), ma sottoposti a diversi

processi di separazione, come indicato nelle tabelle seguenti (Tabella 3.14 e Tabella 3.15), in cui sono riportati anche i risultati dell'analisi spettrofotometrica dei diversi estratti. Si sono considerati, per confronto, anche gli estratti ottenuti con separazione tramite centrifugazione e filtrazione con garza (separazione standard). Per comodità di esposizione ogni tipologia di estratto così ottenuto è accompagnata da una lettera diversa, come riportato in Tabella 3.14.

Tipologia separazione	Concentrazione proteine (g/L)
Centrifuga, garza (3.a)	12,3
Centrifuga, garza, garza in nylon con fibre da 120 den (3.b)	7,6
Centrifuga, garza, centrifuga, garza (3.c)	3,4
Centrifuga, garza in nylon con fibre da 120 den (3.d)	7,4

Tabella 3.14.: Concentrazione di proteine nei diversi estratti di tipo 3, ottenuti con diversi processi di separazione.

Tipologia separazione	Concentrazione proteine (g/L)
Centrifuga, garza (4.a)	5,06
Centrifuga, garza in nylon con fibre da 20 den (4.b)	4,86
Centrifuga, garza, garza in nylon con fibre da 120 den (4.c)	4,1
Centrifuga, garza, centrifuga, garza (4.d)	3,26

Tabella 3.15: Concentrazione di proteine nei diversi estratti di tipo 4, ottenuti con diversi processi di separazione.

Si riportano le immagini dei film ottenuti attraverso i diversi processi di separazione sopra indicati.



Fig 3.13.: Film ottenuto con estratto 3.a.(a sinistra) e con estratto 4.a (a destra).



Fig. 3.14.: Film ottenuto con estratto 4.b.



Fig. 3.15.: Film ottenuto con estratto 3.b (a sinistra) e 4.c (a destra).



Fig. 3.16.: Film ottenuto da estratto 3.c (a sinistra) e 4.d (a destra)



Fig. 3.17.: Film ottenuto da estratto 3.d.

Si nota come si siano ottenuti film omogenei e staccabili in tutte le tipologie di film analizzati. Si può dunque concludere che l'influenza del processo di separazione sull'ottenimento di film non sia così elevata. Si riscontra però una maggiore fragilità di film nel caso di film ottenuti con doppia centrifugazione (3.c e 4.d). Questo può essere dovuto all'eliminazione di un maggior quantitativo di impurezze, dall'effetto rinforzante sul film, e alla caduta della concentrazione di proteine che si ha a valle di questi processi (Tabella 3.14 e Tabella 3.15). Inoltre, si ottengono, in generale, film migliori

nel caso di utilizzo di BSG secco (estratti di tipo 3), il che può essere legato alla maggiore concentrazione di proteine (Tabella 3.14). L'utilizzo invece di garza in nylon con fibre da 20 den (4.b) come sostituto della garza (4.a) non comporta differenze sia in termini di concentrazione di proteine che in termini di film ottenuto. Per gli estratti ottenuti da BSG secco, in virtù della maggior concentrazione di proteine di cui sopra, si è invece valutata la possibilità ulteriore di rimuovere la filtrazione con garza a valle della centrifugazione, procedendo direttamente alla filtrazione con la garza di nylon 120 den. Come mostrato dai valori di concentrazione proteica in Tabella 3.14, i due estratti risultano infatti equivalenti. Questo implica che il processo di filtrazione può essere semplificato e reso più rapido.

Nel caso delle *film forming solutions* prodotte a partire da BSG secco, queste sono state colate nello stampo man mano che sono state prodotte e quindi sono andate incontro ad un tempo di essiccamento diverso. Ciò ha messo in luce la forte influenza di quest'ultima variabile sull'ottenimento dei film. Un tempo di essiccamento superiore alle 6 h conduce ad un'eccessiva evaporazione del solvente, che porta a film fragili e di colorazione scura. Per contro, tempi inferiori a 4 h non consentono un'adeguata evaporazione del solvente, impedendo pertanto l'effettiva formazione del film. Alla luce di queste osservazioni, il miglior trattamento di asciugatura dei film è stato individuato in un primo *step* di essiccazione in stufa a 60 °C per 5 h, seguito da un secondo *step* di asciugatura a temperatura ambiente per 24 h.

A valle, dunque, dei vari esperimenti effettuati si sono individuate come condizioni ottimali per la filmazione:

- Essiccazione del BSG, come fase preliminare a monte dell'estrazione;
- Estrazione con acqua in Autoclave;

- Separazione dell'estratto semplificata e resa più rapida (tramite centrifugazione e filtrazione con garza in nylon, ad esempio);
- Estratto non sottoposto a processi di congelamento e scongelamento;
- Correzione a pH=2 dell'estratto;
- Colatura della *film forming solution* in stampi in silicone;
- Rapporto volume/superficie di colatura (V/S) pari a 0,270 m;
- Asciugatura del film prodotto per un tempo di 5 h;

3.2.3. Caratterizzazione

3.2.3.1. Microscopio ottico

Dal microscopio ottico si ottengono delle immagini simili per i diversi film analizzati, evidenziando così analoghe caratteristiche superficiali. Si riscontrano inclusioni e striature, quest'ultime probabilmente legate alla fase di prelievo del film o alla fase di asciugatura. In Figura 3.18 è riportata l'immagine relativa al campione ottenuto da estratto 3.c.

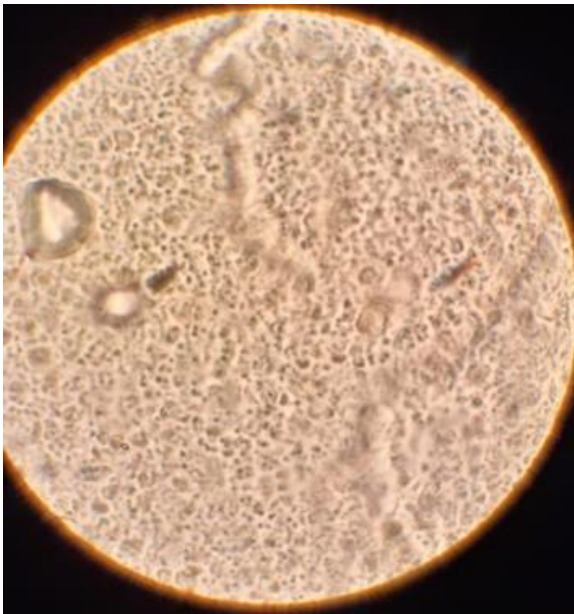


Fig.3.18.: Immagine al microscopio ottico di un campione di film prodotto estratto 3.c.

3.2.3.2. Spettroscopia FT-IR

Si riportano i grafici ottenuti dall'analisi FT-IR dei film analizzati.

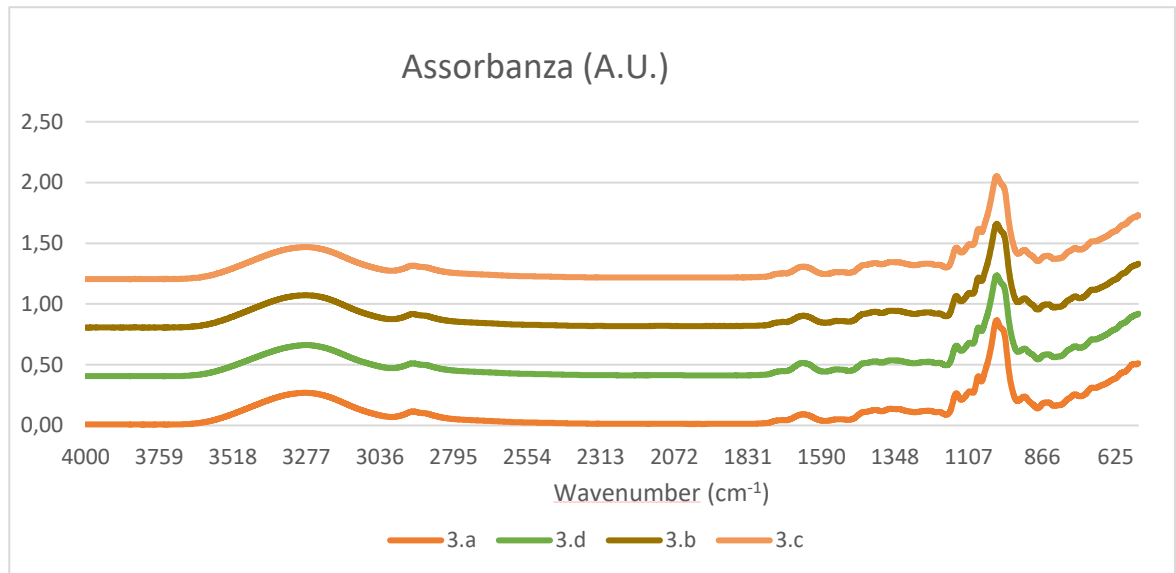


Fig.3.19.: Spettro di assorbanza ottenuto dall'analisi FT-IR dei film ottenuti da BSG secco (estratti di tipo 3).

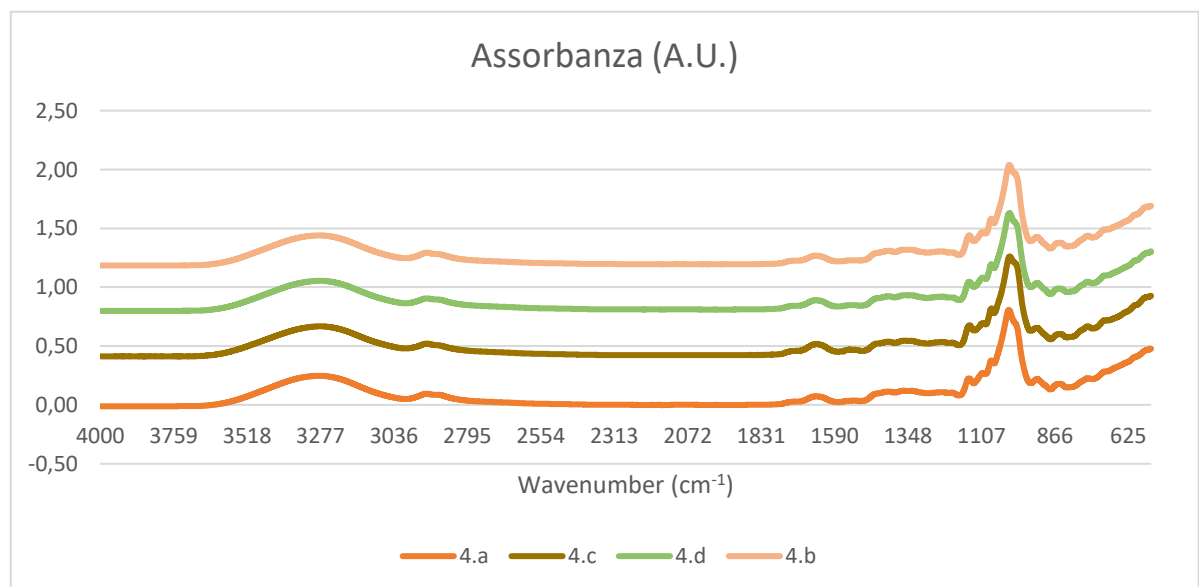


Fig.3.20.: Spettro di assorbanza ottenuto dall'analisi FT-IR dei film ottenuti da BSG umido (estratti di tipo 4).

Si nota come le curve ottenute siano sovrapponibili, sia tra i film ottenuti attraverso diverse tecniche di separazione (a,b,c,d), sia tra quelli ottenuti con BSG secco o umido (3 o 4). Se ne deduce che a livello di composizione superficiale i film ottenuti risultano equivalenti. Confrontando i picchi ottenuti con quelli presenti in letteratura, si può osservare un ampio picco a $\lambda \sim 3200 \text{ cm}^{-1}$ legato ai legami OH dovuti alla presenza di acqua e un leggero picco si ha per $\lambda \sim 2920 \text{ cm}^{-1}$ correlabile allo *stretching* dei legami C-H (Castanho et al., 2022). I picchi tra 1700 e 1200 cm^{-1} , invece, sono quelli associabili alle proteine: in particolare si ha un picco relativo allo *stretching* del gruppo C=O intorno a 1640 (ammide I) e uno tra 1480 e 1400 cm^{-1} correlabile al *bending* dei gruppi N-H (ammide II) (Shrotri & Saini, 2022). Il picco tra 1350 e 1200 cm^{-1} è infine correlabile ai legami N-H (*bending*) e C-H (*stretching*) dell'amide III (Shrotri & Saini, 2022). I picchi a 1160 , 1051 e 896 cm^{-1} si possono associare alla frazione cellulosica: si possono attribuire in particolare allo stretching simmetrico e asimmetrico dei suoi legami C-O-C e alle deformazioni vibrazionali dei suoi legami CO e C-H (Castanho et al., 2022). Infine, il picco tra 800 e 600 cm^{-1} è correlabile alle vibrazioni *out of plane* dei gruppi N-H (Shrotri & Saini, 2022).

3.2.3.3. Spettroscopia UV-Vis

Si riportano in Figura 3.21 gli spettri di trasmittanza legati ai diversi campioni analizzati.

Non è stato possibile ottenere gli spettri dei campioni 3.a e 3.d, in quanto eccessivamente danneggiati dalle analisi precedenti.

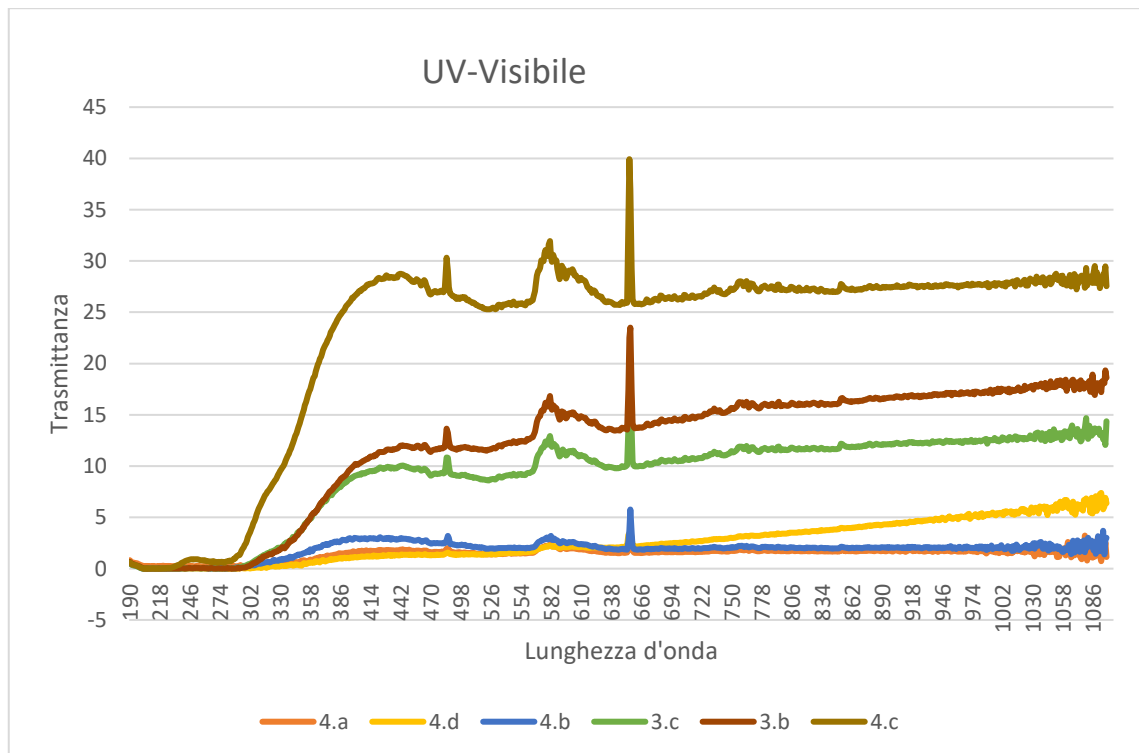


Fig 3.21: Spettri di trasmittanza per i campioni di film ottenuti.

Si nota che per la metà dei film analizzati ed in particolare per i film ottenuti con estratti del tipo 4.a, 4.b, 4.d si ottiene uno spettro di quasi totale opacità. Ciò si può collegare all'impossibilità di ottenere un campione perfettamente disteso. Infatti, i sopraccitati campioni risultano caratterizzati da diverse pieghe o sovrapposizioni, che alterano localmente le proprietà ottiche del film. I campioni 4.c e 3.b, ottenuti tramite centrifugazione, filtrazione con garza e filtrazione con garza in nylon con fibre da 120 den, da BSG umido e secco, rispettivamente, risultano essere quelli più trasparenti; in particolare

quello umido (4.c) risulta essere più trasparente di quello secco (3.b). La maggiore trasparenza del film ottenuto da centrifugazione, filtrazione con garza e filtrazione con garza in nylon con fibre da 120 den da BSG umido rispetto a quello ottenuto da BSG secco attraverso le stesse procedure di separazione, può veicolare la scelta in base al tipo di applicazione. Ciò significa che, nel caso in cui una certa applicazione richieda una maggiore trasparenza del film, come può essere nel caso del *food packaging*, si può pensare di utilizzare il primo film piuttosto che il secondo.

3.2.3.4. Diffrazione dei Raggi X

Si riportano i diffrattogrammi dei diversi campioni di film analizzati.

Non è stato possibile ottenere lo spettro del campione 3.a, in quanto eccessivamente danneggiato dalle caratterizzazioni precedenti.

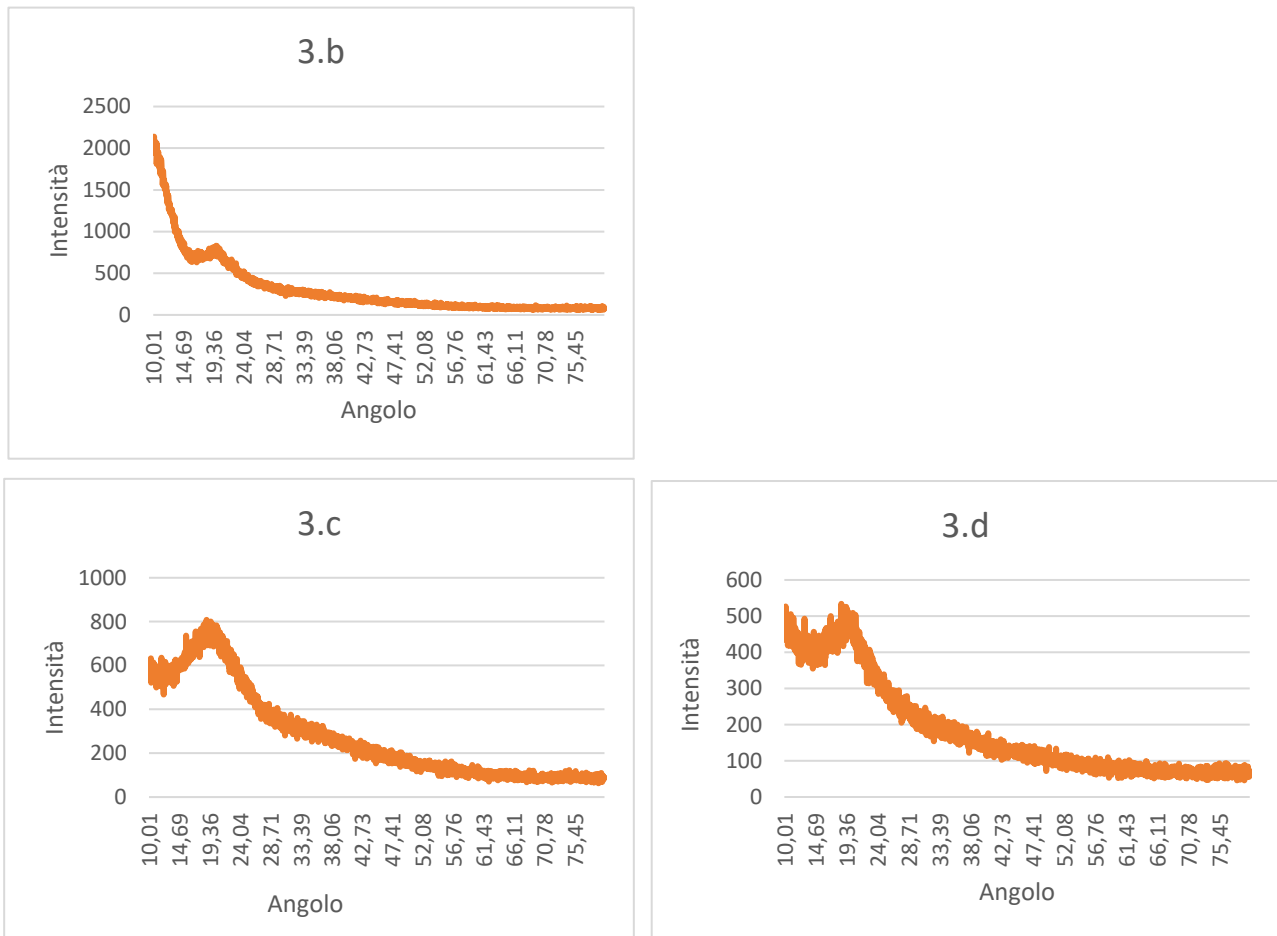


Fig 3.22: Risultati diffrazione a Raggi X per i campioni di film ottenuti da BSG secco (campioni di tipo 3).

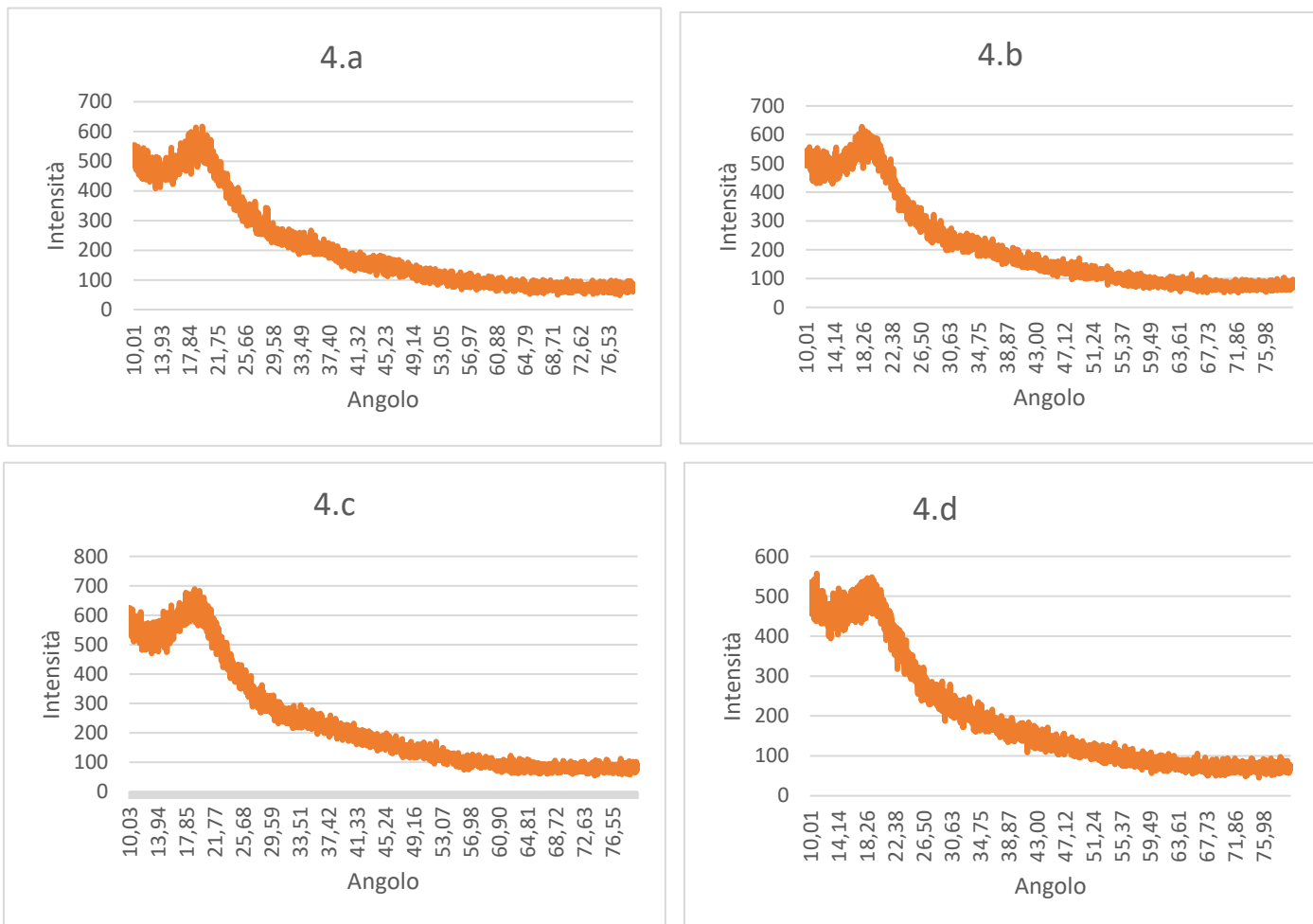


Fig 3.23: Risultati diffrazione a Raggi X per i campioni di film ottenuti da BSG umido (estratti di tipo 4).

In tutti i grafici sopra riportati si riscontra un'assenza di picchi. Ciò sta ad indicare una natura amorfa per tutti i campioni analizzati.

4. Conclusioni e prospettive future

Data l'elevata disponibilità, il basso costo e i problemi di smaltimento ad esse legate, si è cercato di valorizzare le trebbie esauste originate dall'industria della birra, tramite estrazione delle proteine in esse contenute e valutazione di un loro utilizzo per la produzione di film proteici.

Il lavoro si è incentrato sull'utilizzo di acqua come solvente di estrazione, indagando in particolar modo l'influenza sul processo di estrazione di: tempo, temperatura e modalità di estrazione. I risultati ottenuti hanno mostrato che:

- la modalità di miscelazione influenza in maniera non trascurabile il processo estrattivo. Infatti, la miscelazione su piastra oscillante, a parità di tempo e temperatura di estrazione, permette di ottenere un quantitativo superiore di proteine estratte rispetto alla miscelazione con magnete;
- anche l'aumento del tempo di miscelazione risulta favorire il processo estrattivo: infatti passando da 2 a 24 h, nel caso di miscelazione a 30 °C, si riesce ad ottenere un contenuto proteico estratto quasi raddoppiato; è da tener presente però in questo caso che il maggior tempo di miscelazione è legato anche a un maggior costo energetico;
- l'aumento della temperatura, infine, non comporta apprezzabili differenze in termini di capacità estrattiva nel caso in cui questo sia dell'ordine di pochi gradi °C (da 20 a 30 °C), ma risulta estremamente favorevole nel caso in cui le temperature raggiungano condizioni tali da ottenere un trattamento idrotermale. È ciò che si ha con il trattamento in autoclave che si dimostra quindi essere quello ottimale per l'estrazione di

proteine, in quanto legato ad un maggior quantitativo di proteine estratte.

In questo modo si sono quindi ottenute delle condizioni tali per cui l'estrazione con solvente acqua possa rendersi concorrenziale rispetto al tradizionale trattamento alcalino. In questo modo si direziona il processo verso trattamenti più *green* e sostenibili, che abbraccino i principi della *Green Chemistry*.

Si sono poi utilizzati diverse tipologie di estratto (da estrazione in Autoclave, estrazione con NaOH 1 M, considerando estratti sottoposti a processi di congelamento e scongelamento e no, da BSG secco o umido) per indagare la possibilità di ottenere film proteici. A questo proposito, l'utilizzo di un quantitativo di glicerolo pari al 35%w/w rispetto al peso di proteine, valore intermedio tra quelli presenti in letteratura, si è dimostrato efficace per l'ottenimento di buoni film. Inoltre, dall'indagine di diversi parametri si è giunti alle seguenti conclusioni, circa la produzione di film proteici:

- il pH acido risulta quello ottimale per la produzione di film. In particolare, si sono ottenuti dei buoni film a pH=2; la produzione di film a pH basico, invece, comporta una parziale precipitazione di proteine, visualizzabile con la formazione di un solido biancastro. Quest'effetto si ottiene in maniera più marcata nel caso di utilizzo di estratto con NaOH 1 M;
- L'estrazione con acqua in Autoclave risulta essere più favorevole rispetto all'estrazione con NaOH 1 M ai fini della filmazione;
- È preferibile utilizzare stampo in silicone per una maggiore facilità di prelievo del film, rispetto alle piastre Petri;
- Si ottengono film migliori con l'utilizzo di estratti che non abbiano subito cioè processi di congelamento e scongelamento, in quanto legati ad una maggiore concentrazione di proteine;

- Il raddoppiamento del rapporto V/S ($V/S=0,270$ m) rispetto a quanto riportato in letteratura ($V/S=0,135$ m) (Pino et al., 2021), permette di ottenere film più facilmente staccabili;
- L'essiccazione preliminare del BSG risulta favorevole in termini di robustezza del film ottenuto;

Dall'indagine del processo di separazione, inoltre, si è visto come l'ultrafiltrazione richieda degli *step* di purificazione iniziale che causano la drastica diminuzione di proteine in soluzione, annullando di fatto l'effetto successivo di concentrazione proteica. Invece, si ottengono dei buoni film con tutte le tipologie di estratto ottenute da diversi processi di separazione (a,b,c,d), che quindi non si dimostrano eccessivamente influenti sulle proprietà del film ottenuto. Dagli esperimenti effettuati però è emersa l'elevata influenza del tempo di asciugatura sulle proprietà finali del film.

I film ottenuti si dimostrano otticamente e a livello di composizione superficiale simili. Gli spettri di trasmittanza invece risultano compromessi a causa della presenza di ripiegamenti nel campione. Nel caso però degli estratti ottenuti con processo di separazione di centrifugazione, filtrazione con garza e filtrazione con garza in nylon da 120 den, a partire da BSG umido (4.c) o secco (3.b), quello a partire da BSG umido presenta una trasmittanza maggiore, il che può veicolare la scelta in base al tipo di applicazione. Infine, tutti i film ottenuti si dimostrano amorfi.

Studi futuri potrebbero prevedere un'indagine più approfondita del processo di estrazione tramite trattamento idrotermale, con l'utilizzo di nuove tecniche di intensificazione di processo, come l'estrazione assistita da microonde o da ultrasuoni. Inoltre, sarebbe interessante prevedere l'aggiunta nella formulazione dei film di additivi per migliorarne particolari proprietà, come ad esempio le proprietà antimicrobiche, tramite l'aggiunta di oli essenziali o ossido di zinco.

Bibliografia

- Baldasso, C., Barros, T. C., & Tessaro, I. C. (2011). Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination*, 278(1–3), 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.05.055>
- Bianco, A., Budroni, M., Zara, S., Mannazzu, I., Fancello, F., & Zara, G. (2020a). The role of microorganisms on biotransformation of brewers' spent grain. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 104, Issue 20, pp. 8661–8678). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10843-1>
- Bianco, A., Budroni, M., Zara, S., Mannazzu, I., Fancello, F., & Zara, G. (2020b). The role of microorganisms on biotransformation of brewers' spent grain. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 104, Issue 20, pp. 8661–8678). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10843-1>
- Bonifácio-Lopes, T., Teixeira, J. A., & Pintado, M. (2020). Current extraction techniques towards bioactive compounds from brewer's spent grain—A review. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 60, Issue 16, pp. 2730–2741). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1655632>
- Brányik, T., Vicente, A. A., Machado Cruz, J. M., & Teixeira, J. A. (2001). Spent grains—a new support for brewing yeast immobilisation. In *Biotechnology Letters* (Vol. 23).
- Castanho, M. N., de Souza do Prado, K., & de Paiva, J. M. F. (2022). Developing thermoplastic corn starch composites filled with brewer's

- spent grain for applications in biodegradable films. *Polymer Composites*, 43(2), 811–826. <https://doi.org/10.1002/pc.26412>
- Chang, Q., Wang, W., Regev-Yochay, G., Lipsitch, M., & Hanage, W. P. (2015). Antibiotics in agriculture and the risk to human health: How worried should we be? *Evolutionary Applications*, 8(3), 240–247. <https://doi.org/10.1111/eva.12185>
- Charles, H., Godfray, J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M., & Toulmin, C. (2010). *Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People*. <http://science.sciencemag.org/>
- Chetrariu, A., & Dabija, A. (2020). Brewer’s spent grains: Possibilities of valorization, a review. In *Applied Sciences (Switzerland)* (Vol. 10, Issue 16). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/app10165619>
- Du, L., Arauzo, P. J., Meza Zavala, M. F., Cao, Z., Olszewski, M. P., & Kruse, A. (2020). Towards the properties of different biomass-derived proteins via various extraction methods. *Molecules*, 25(3). <https://doi.org/10.3390/molecules25030488>
- Emmanuel, J. K., Nganyira, P. D., & Shao, G. N. (2022). Evaluating the potential applications of brewers’ spent grain in biogas generation, food and biotechnology industry: A review. *Heliyon*, 8(10), e11140. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11140>
- Esslinger, H. Michael. (2009). *Handbook of brewing: processes, technology, markets*. Wiley-VCH.
- Forna D. (2022). Valorizzazione degli scarti di birrificazione: processi di fermentazione con *R. mucilaginosa* per la produzione di carotenoidi. Politecnico di Torino.

- Gupta, M., Abu-Ghannam, N., & Gallagher, E. (2010). Barley for brewing: Characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(3), 318–328. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00112.x>
- Handson C. e al. (2016). Food Loss and Waste Accounting and Reporting Standard. *Food Loss + Waste Protocol*.
- Jaeger, A., Zannini, E., Sahin, A. W., & Arendt, E. K. (2021). Barley Protein Properties, Extraction and Applications, with a Focus on Brewers' Spent Grain Protein. *Foods*, 10(6), 1389. <https://doi.org/10.3390/foods10061389>
- Kamal, H., Le, C. F., Salter, A. M., & Ali, A. (2021). Extraction of protein from food waste: An overview of current status and opportunities. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 20, Issue 3, pp. 2455–2475). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12739>
- Lao, E. J., Dimoso, N., Raymond, J., & Mbega, E. R. (2020). The prebiotic potential of brewers' spent grain on livestock's health: a review. In *Tropical Animal Health and Production* (Vol. 52, Issue 2, pp. 461–472). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02120-9>
- Lee, J. H., Lee, J. H., Yang, H. J., & Song, K. bin. (2015). Preparation and characterization of brewer's spent grain protein-chitosan composite films. *Journal of Food Science and Technology*, 52(11), 7549–7555. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1941-x>
- Lynch, K. M., Steffen, E. J., & Arendt, E. K. (2016). Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. In *Journal of the Institute of Brewing* (Vol. 122, Issue 4, pp. 553–568). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jib.363>

- Maqhuzu, A. B., Yoshikawa, K., & Takahashi, F. (2021). Prospective utilization of brewers' spent grains (BSG) for energy and food in Africa and its global warming potential. *Sustainable Production and Consumption*, 26, 146–159. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2020.09.022>
- Marchetti, J. L. (1994). Optimum cycle time in semi-batch ultrafiltration systems, *Chemical Engineering Communications*, 129:1, 217-225. <http://doi.org/10.1080/00986449408936260>
- Mussatto, S. I. (2009). Biotechnological potential of brewing industry by-products. In *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues* (pp. 313–326). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9942-7_16
- Mussatto, S. I., Dragone, G., & Roberto, I. C. (2006). Brewers' spent grain: Generation, characteristics and potential applications. In *Journal of Cereal Science* (Vol. 43, Issue 1, pp. 1–14). <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.06.001>
- Peydayesh, M., Bagnani, M., Soon, W. L., & Mezzenga, R. (2022). Turning Food Protein Waste into Sustainable Technologies. In *Chemical Reviews*. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00236>
- Pino, P., Ronchetti, S., Mollea, C., Sangermano, M., Onida, B., & Bosco, F. (2021). Whey proteins–zinc oxide bionanocomposite as antibacterial films. *Pharmaceutics*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091426>
- Proaño, J. L., Salgado, P. R., Cian, R. E., Mauri, A. N., & Drago, S. R. (2020). Physical, structural and antioxidant properties of brewer's spent grain protein films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(15), 5458–5465. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10597>

- Qin, F., Johansen, A. Z., & Mussatto, S. I. (2018). Evaluation of different pretreatment strategies for protein extraction from brewer's spent grains. *Industrial Crops and Products*, *125*, 443–453. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.017>
- Reis, R. van, & Zydney, A. L. (2010). *PROTEIN ULTRAFILTRATION*.
- 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>
- Shroti, G. K., & Saini, C. S. (2022). Development of edible films from protein of brewer's spent grain: Effect of pH and protein concentration on physical, mechanical and barrier properties of films. *Applied Food Research*, *2*(1). <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100043>
- 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>
- Sire, T. S., & Oh, J. C. S. (1990). *Spent brewery grains as substrate for the production of cellulases by Trichoderma reesei QM9414*.
- Wen, C., Zhang, J., Duan, Y., Zhang, H., & Ma, H. (2019). A Mini-Review on Brewer's Spent Grain Protein: Isolation, Physicochemical Properties, Application of Protein, and Functional Properties of Hydrolysates. In *Journal of Food Science* (Vol. 84, Issue 12, pp. 3330–3340). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14906>
- Xiros, C., & Christakopoulos, P. (2012). Biotechnological potential of brewers spent grain and its recent applications. In *Waste and*

Biomass Valorization (Vol.3, Issue 2, pp. 213–232)
<https://doi.org/10.1007/s12649-012-9108-8>

Appendice

Oltre all'elettroforesi riportata nella sezione "Risultati" si è realizzata una seconda elettroforesi. Sono stati qui analizzati gli stessi campioni utilizzati nell'elettroforesi di cui si è discusso nel paragrafo 3.1.2.1, ad eccezione dell'estratto A, che non è stato più considerato. Inoltre, si sottolinea che, in questo caso, i campioni analizzati sono stati sottoposti a filtrazione (porosità 0,45 μ m) prima della preparazione per la corsa elettroforetica. Di questa se ne riporta l'immagine del gel in Figura A.1 e i dettagli sul riempimento dei pozzetti in Tabella A.1. Infine, è stata realizzata una terza elettroforesi in cui si è voluto effettuare un confronto con una soluzione di siero albumina bovina (BSA) avente concentrazione pari a 1 μ g/ μ L. I relativi dettagli sul riempimento dei pozzetti e l'immagine del gel ottenuta sono invece riportati in Tabella A.2 e Figura A.2, rispettivamente. In entrambi i casi sopraccitati si è ottimizzato il quantitativo totale di proteine (μ g) inserito nei diversi pozzetti, in modo da ottenere dei valori confrontabili.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tipologia estratto	PPPS	B	C	D	E	E dil. 1:2	D	C	B	PPPS
Totale proteine nel pozzetto(µg)		28,0	25,6	20,2	35,6	26,7	20,2	25,6	28,0	

Tabella A.1: Elenco dei campioni inseriti nei pozzetti del gel.

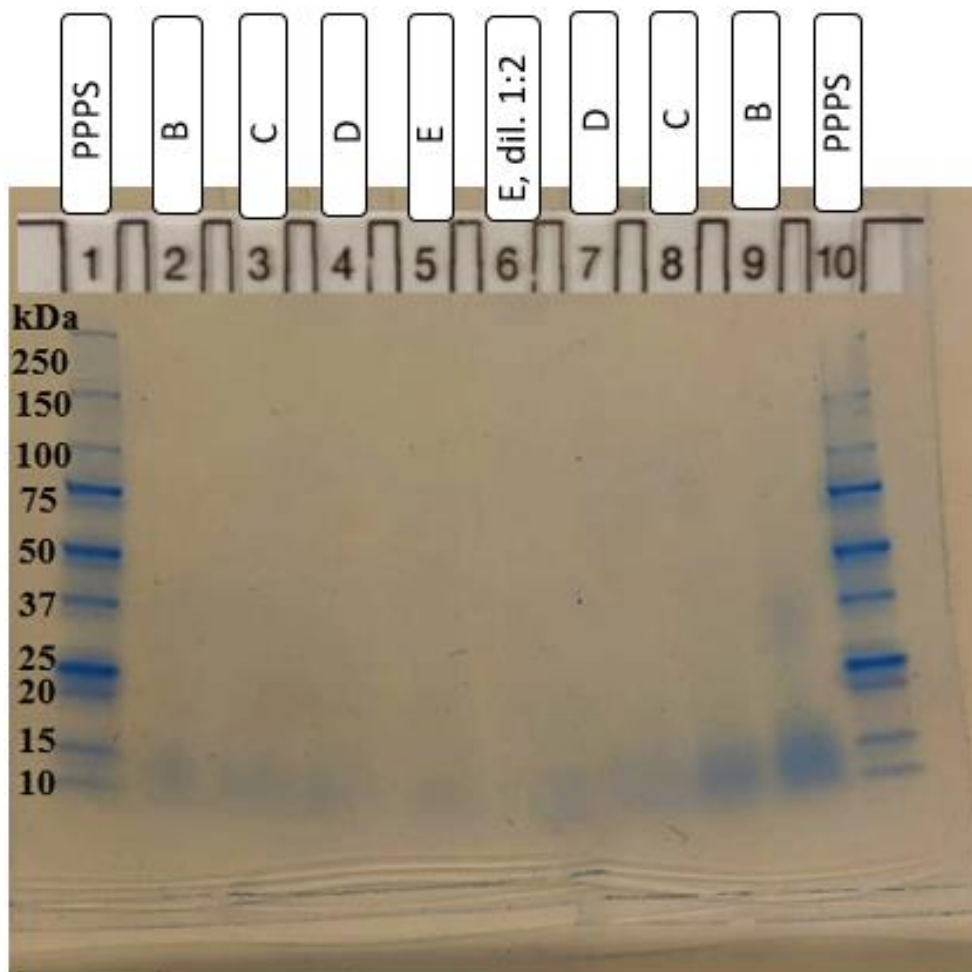


Figura A.1: Elettroforesi su gel di poliacrilamide relativa ai campioni ottenuti con estrazione con acqua, in diverse condizioni di tempo, temperatura e modalità di estrazione.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tipologia estratto	PPPS	A	B	C	D	E	E dil. 1:2	BSA	BSA	PPPS
Totale proteine nel pozzetto(µg)		18,0	43,0	46,0	40,8	50,1	50,1	15,0	30,0	

Tabella A.2: Elenco dei campioni inseriti nei pozzetti del gel.

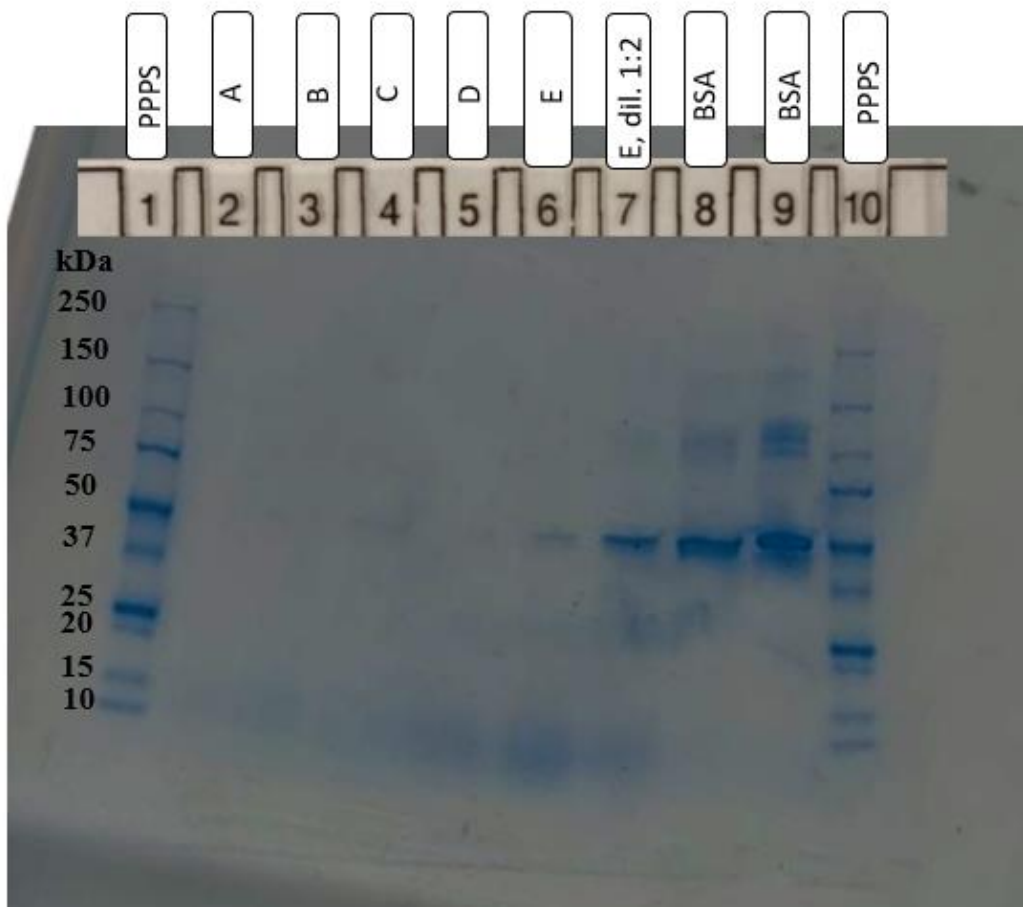


Figura A.2: Elettroforesi su gel di poliacrilamide relativa ai campioni ottenuti con estrazione con acqua, in diverse condizioni di tempo, temperatura e modalità di estrazione. Confronto con BSA.