



**Politecnico  
di Torino**

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

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

Tesi di Laurea Magistrale

**Valorizzazione degli scarti di  
birrificazione: produzione di carotenoidi  
con *Rhodotorula mucilaginosa***

**Relatore**

Prof.ssa Francesca Bosco

**Candidato**

Chiara Carapella

Ottobre 2024



Ai miei genitori.



# Indice

1.	Introduzione.....	1
1.1	Processi di birrificazione.....	1
1.2	Brewers' spent grain.....	3
1.2.1	Composizione di BSG.....	3
1.2.2	Impieghi del BSG.....	5
1.3	Biopigmenti .....	7
1.4	Carotenoidi.....	9
1.4.1	Produzione di carotenoidi.....	11
1.4.2	Ruolo dei carotenoidi.....	13
1.5	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> .....	14
1.5.1	Vie metaboliche per la produzione di carotenoidi .....	16
1.5.2	Crescita di <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> su scarti agroindustriali .....	17
1.6	Obiettivi della tesi.....	20
2.	Materiali e Metodi .....	21
2.1	Caratterizzazione di BSG.....	21
2.1.1	Contenuto di umidità.....	21
2.1.2	Valutazione del pH.....	23
2.2	Sciroppo di BSG .....	24
2.2.1	Preparazione dello sciroppo di BSG mediante estrazione in autoclave.....	24
2.2.2	Caratterizzazione dello sciroppo di BSG.....	27
2.3	Coltura di <i>R. mucilaginosa</i> su terreno solido.....	29
2.4	Colture di <i>R. mucilaginosa</i> in piastre multiwell.....	31
2.4.1	Allestimento della prova multiwell .....	32
2.5	Coltura di <i>R. mucilaginosa</i> in beuta .....	34
2.5.1	Coltura su terreno YM .....	35
2.5.2	Coltura su sciroppo di BSG .....	36
2.6	Recupero della biomassa.....	37
2.6.1	Determinazione della concentrazione della biomassa .....	39
2.7	Estrazione dei carotenoidi.....	39
2.7.1	Valutazione dei carotenoidi totali estratti da biomassa umida .....	39
2.7.2	Ottimizzazione del protocollo di estrazione dei carotenoidi .....	40
3.	Risultati e discussione .....	42
3.1	Caratterizzazione di BSG.....	42
3.1.1	Contenuto di umidità e solidi totali.....	42

3.1.2	Misurazione del pH.....	42
3.2	Sciropo di BSG.....	43
3.2.1	Parametri valutati .....	43
3.3	Coltura in piastre multiwell .....	45
3.3.1	Variazione del rapporto C/N.....	45
3.3.2	Parametri determinati.....	46
3.4	Prova 1 .....	56
3.4.1	Coltura su terreno YM .....	56
3.4.2	Coltura su sciropo di BSG .....	58
3.5	Prova 2 .....	60
3.5.1	Determinazione della concentrazione della biomassa su terreno YM .....	60
3.5.2	Determinazione della concentrazione della biomassa su sciropo di BSG .....	61
3.5.3	Determinazione del D-Glucosio.....	62
3.5.4	Estrazione dei carotenoidi.....	63
3.5.5	Concentrazione di carotenoidi estratti .....	64
3.5.6	Andamento dei parametri in funzione del tempo .....	65
3.5.7	Ottimizzazione del processo di estrazione dei carotenoidi.....	69
4.	Conclusioni e futuri sviluppi.....	79
5.	Bibliografia.....	81
	Ringraziamenti .....	84



# 1. Introduzione

“Nulla si crea, nulla si distrugge, tutto si trasforma”.

Nel XVIII secolo il chimico francese Antoine-Laurent de Lavoisier formulò il principio di conservazione della massa, dimostrando che la materia non può essere creata o distrutta, ma solo trasformata. Sulla base di questa premessa, e considerando che l'industrializzazione dell'ultimo secolo ha portato ad una crescita significativa di scarti e rifiuti, emerge l'importanza della loro valorizzazione. Il recupero e il riutilizzo degli scarti come nuove materie prime, è alla base del concetto di economia sostenibile e circolare che riduce l'impatto ambientale derivante dallo smaltimento dei rifiuti, e promuove il riciclo ed il riutilizzo delle risorse.

Attraverso i processi biotecnologici, si valorizzano gli scarti producendo terreni di coltura per favorire la crescita microbica, ottenendo simultaneamente prodotti ad alto valore aggiunto utilizzati nei settori alimentare, medicale, cosmetico, agricolo ed energetico. Nell'ottica dell'innovazione biotecnologica, si inserisce il riciclo di residui agroindustriali provenienti dall'industria alimentare e agricola. Questi scarti includono molteplici matrici derivanti dalle coltivazioni come soia, mais, riso, canna da zucchero, caffè e frutta, possiedono un potenziale significativo in quanto sono ricchi di carbonio, azoto ed altri nutrienti e quindi possono essere usati come terreni di coltura dai microrganismi che sono in grado di produrre importanti metaboliti primari e secondari (Lopes et al., 2021). Il loro impiego come materie prime per la produzione industriale non solo riduce il costo associato al loro smaltimento, ma promuove anche la sostenibilità ambientale in una visione di economia circolare. L'economia circolare estende il ciclo di vita dei prodotti, promuove la riduzione degli sprechi e riutilizza i sottoprodotti facendoli diventare materie prime per altri processi o prodotti alimentari (Chetrariu et al., 2023).

Il processo di produzione della birra ha recentemente suscitato sempre più interesse grazie al potenziale delle trebbie esauste, che costituiscono circa l'85% dei sottoprodotti della birrificazione (Lynch et al., 2016). Questi sottoprodotti, conosciuti come brewers' spent grain (BSG), rappresentano una risorsa preziosa utilizzabile in vari contesti industriali. A livello globale, la produzione media di BSG si attesta intorno a 39 milioni di tonnellate all'anno, con 3,4 milioni di tonnellate prodotte in Europa e 288.000 tonnellate annue in Italia (Bianco et al., 2020). Il BSG è considerato una materia prima interessante per la sua disponibilità in grandi quantità ed il suo costo relativamente basso. Ciò che rende il BSG particolarmente attraente però è la sua composizione ricca di nutrienti e composti adatti per i processi di bioraffineria (Lynch et al., 2016) volti alla produzione di beni ad alto valore aggiunto.

## 1.1 Processi di birrificazione

L'orzo, uno dei cereali più coltivati globalmente, riveste un ruolo fondamentale nel processo di produzione della birra. Nel corso dell'ultimo decennio, la produzione mondiale di orzo ha raggiunto circa 156 milioni di tonnellate annuali, dove quasi il 90% dei chicchi di orzo raccolti viene attualmente impiegata nell'alimentazione animale e nella produzione di bevande alcoliche inclusa la birra (Castro et al., 2021).

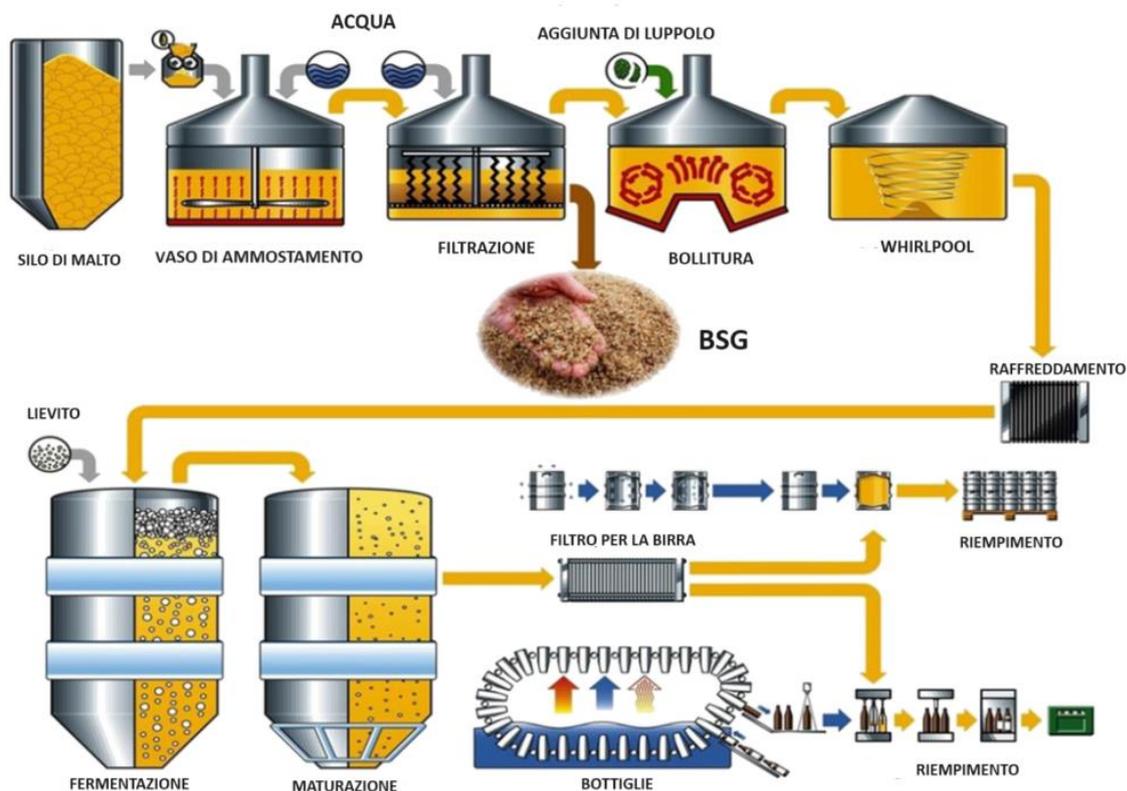
La birra è una delle bevande alcoliche più antiche e amate al mondo ed è prodotta con quattro ingredienti principali: malto, luppolo, lievito e acqua.

Il processo di produzione della birra coinvolge diverse fasi principali come indicato in Figura 1 e riportate di seguito nel dettaglio.

La **maltazione** è il processo di trasformazione dell'orzo in malto e si articola in tre fasi principali:

1. Macerazione: l'orzo viene posto a contatto con l'acqua per diverse ore affinché i chicchi assorbano l'umidità per germinare;
2. Germinazione: si forma la radichetta che induce l'attivazione di alcuni enzimi che trasformano l'amido presente nell'orzo in zuccheri più semplici;
3. Essiccazione: i chicchi germinati vengono essiccati in un forno per fermare la germinazione.

Seguono la fase di **ammostamento** dove il malto viene miscelato con acqua calda formando il mosto che successivamente viene sottoposto al processo di **filtrazione** dalle particelle solide caratterizzate dai residui e dalle bucce: è in questa fase che vengono recuperate le trebbie che possono essere riutilizzate come alimento per animali o per altre applicazioni industriali. Il mosto filtrato viene sottoposto alla **bollitura** per sterilizzarlo e si aggiunge il luppolo al fine di dare il gusto e l'aroma desiderati. Dopo la bollitura segue il processo **Whirlpool** che serve a separare i solidi in sospensione, come i residui di luppolo, dal mosto liquido che viene raffreddato e sottoposto al processo di **fermentazione** con lievito che converte gli zuccheri fermentabili in alcol e anidride carbonica. Dopo la fermentazione primaria, la birra viene lasciata maturare con il processo di **maturazione** per sviluppare il suo sapore finale e successivamente viene filtrata per migliorare la limpidezza. L'ultima fase è rappresentata dal confezionamento della birra per permetterne la distribuzione ed il consumo (Castro et al., 2021).



**Figura 1:** Schema del processo di produzione della birra e recupero di BSG. Tratta da Lynch et al., (2016) e modificata.

## 1.2 Brewers' spent grain

Il BSG è il sottoprodotto più abbondante del processo di produzione della birra, è a basso costo ed è disponibile durante tutto l'anno (Chetrariu et al., 2023). Da 100 kg di malto si ottengono circa 100-130 kg di BSG: si producono circa 21-22 kg di BSG per ogni ettolitro di birra (Bianco et al., 2020).

Come si può immaginare, la gestione delle trebbie rappresenta una sfida importante per l'industria birraria. Tuttavia, esse possono essere valorizzate come scarti, con il potenziale di contribuire allo sviluppo dei paesi emergenti attraverso la produzione di alimenti derivanti da esso. Per sfruttare al meglio questi scarti, è necessario superare norme severe e migliorare la percezione dei consumatori, che potrebbero considerarli come materiali di basso valore (Nyhan et al., 2023). Visto che il BSG è un sottoprodotto ad alto valore nutrizionale è importante trovare soluzioni innovative per inserire questo sottoprodotto nel ciclo produttivo al fine di ottenere prodotti di qualità (Chetrariu et al., 2023).

Si stima che circa il 70% del BSG prodotto viene utilizzato come mangime per animali, tuttavia, la quantità di BSG disponibile è ingente e si hanno problemi per il suo smaltimento. Un altro 10% di BSG viene utilizzato per la produzione di biogas contribuendo anche alla produzione di energia sostenibile. Il restante 20% di BSG viene smaltito in discarica (Bianco et al., 2020).

La problematica più ingente relativa alla gestione e al riutilizzo del BSG prodotto è da ricercarsi nel suo elevato contenuto di umidità che varia tra il 70 e l'80% (Bianco et al., 2020) che lo rendono un prodotto a breve durata di conservazione. In primo luogo, il trasporto del BSG umido è costoso e questo è uno dei motivi per cui la fornitura agli agricoltori locali è l'opzione principale; tuttavia, la domanda non sempre riesce ad assorbire tutta l'offerta disponibile. In secondo luogo, il BSG umido è altamente suscettibile alla crescita microbica e al deterioramento: questo limita la sua conservabilità ed utilizzo, richiedendo soluzioni rapide ed efficienti per il suo impiego o trasformazione. Metodi efficaci per prolungare la conservazione del BSG riguardano l'essiccazione in forno, la liofilizzazione, il congelamento e l'utilizzo di vapore surriscaldato (Lynch et al., 2016). Il congelamento del BSG a -20 °C, nonostante sia una valida opzione, è stato ritenuto inadatto a causa della necessità di immagazzinare grandi volumi. La liofilizzazione, sebbene efficace nel mantenere inalterata la composizione del BSG, non è stata considerata economicamente sostenibile. L'essiccazione in forno che riduce il contenuto di umidità a circa il 10% è risultata il metodo più adatto per la conservazione del BSG, tuttavia, questo metodo comporta rischi come la possibilità di tostatura o bruciatura dei cereali e richiede un'alta intensità energetica (Lynch et al., 2016).

Un'alternativa promettente è rappresentata dall'uso del vapore surriscaldato, che risulta essere meno dispendioso in termini di energia rispetto all'essiccazione in forno (Lynch et al., 2016).

### 1.2.1 Composizione di BSG

La composizione chimica del BSG varia notevolmente a seconda della varietà di orzo usato, dal periodo di raccolta, dai processi di birrificazione adottati in ogni azienda ed eventuali additivi aggiunti (Lynch et al., 2016).

Le trebbie sono un materiale lignocellulosico, ricche sia di fibre che proteine (Nyhan et al., 2023) che le rendono particolarmente interessanti per svariate applicazioni; le fibre costituiscono circa la metà della composizione totale del BSG, le proteine fino al 30%.

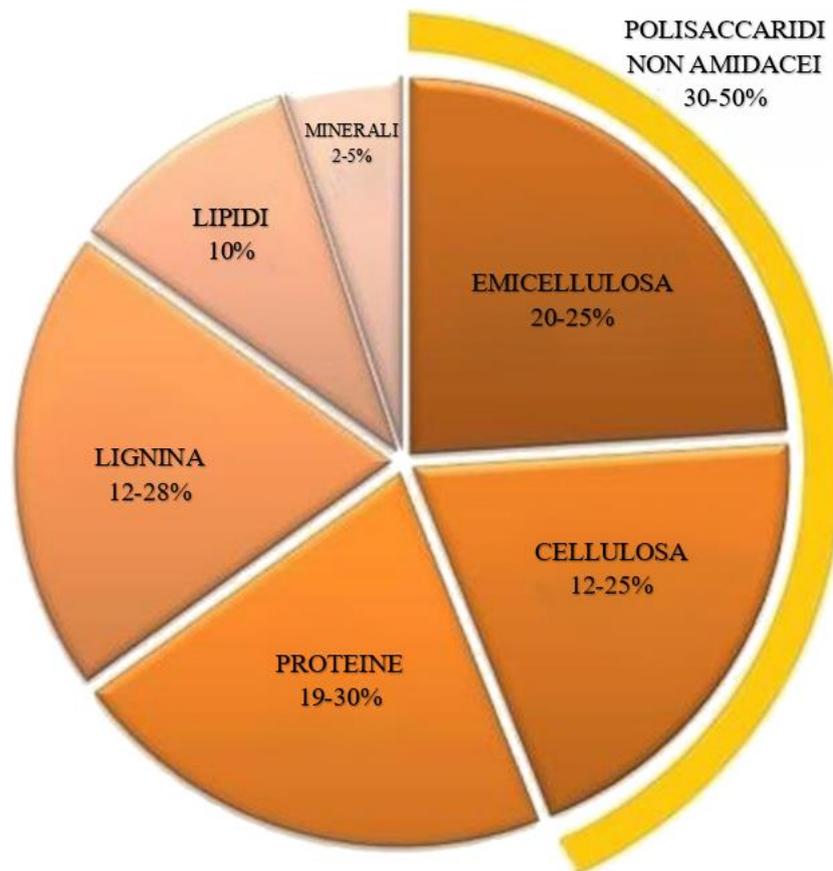
L'emicellulosa, il principale costituente delle fibre, costituisce circa il 20-25% della composizione totale: l'arabinosilano è la frazione emicellulosica più ingente ed è considerata una fibra alimentare con proprietà antiossidante, supporta il controllo glicemico e manifesta attività prebiotica (Nyhan et al., 2023). Un altro 12-25% della composizione di BSG è costituito da cellulosa, un polisaccaride. I monosaccaridi presenti più copiosamente sono xilosio, glucosio e arabinosio (Lynch et al., 2016) che rendono il BSG un substrato interessante come terreno di coltura per la crescita di microrganismi.

La lignina è un altro componente significativo con un contenuto variabile tra il 10 ed il 28 % del peso totale: essa è una macromolecola polifenolica responsabile della rigidità strutturale delle piante. Contiene alcol ferulico, p-cumarico, caffeico e vari composti fenolici che sono considerati antiossidanti naturali (Chetrariu et al., 2023) ed hanno anche una attività anticancerogena e immunomodulatoria (Nyhan et al., 2023).

Il contenuto proteico è elevato e varia tra il 19 ed il 30%: albumine, ordeine e gluteine sono le più abbondanti, tra gli amminoacidi essenziali spicca la lisina che solitamente è presente in minime quantità negli alimenti a base di cereali (Lynch et al., 2016).

Il BSG ha inoltre un contenuto di grassi relativamente elevato rispetto ai cereali di circa il 10%.

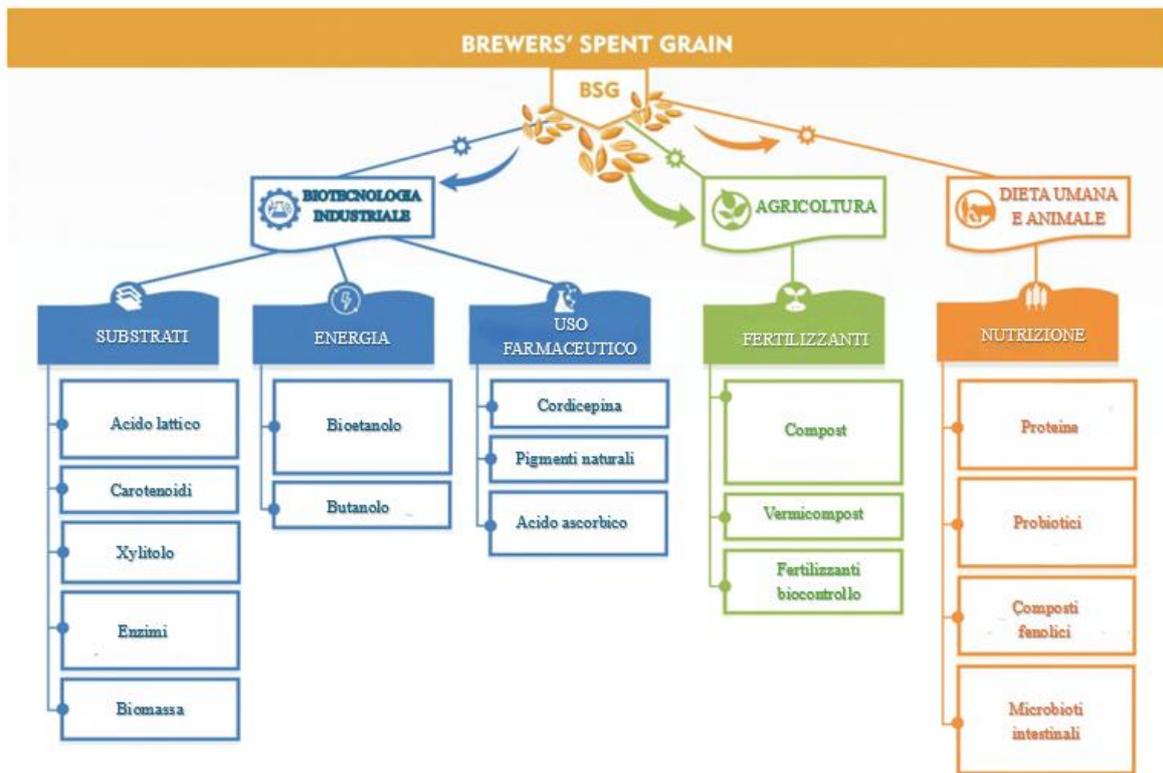
Infine, contiene anche una minima concentrazione di minerali, tra cui magnesio, calcio e fosforo (Lynch et al., 2016).



**Figura 2:** Composizione chimica del BSG derivante dal malto di orzo. Tratta da Lynch et al., (2016) e modificata.

## 1.2.2 Impieghi del BSG

Da un punto di vista nutrizionale, il BSG è un prodotto molto versatile, inoltre essendo disponibile con regolarità e ad un basso prezzo di mercato (Bianco et al., 2020), viene utilizzato in molti settori industriali: nel settore alimentare per la produzione di prodotti da forno, pasta e biscotti; nel settore agricolo come mangime per animali e fertilizzanti, trova applicazione nel settore energetico per la produzione di biogas, nel settore edile per la fabbricazione di mattoni e nel settore biotecnologico come medium di coltura per la coltivazione di microrganismi per la produzione di pigmenti, enzimi e prodotti ad uso farmaceutico (Chetrariu et al., 2023).



**Figura 3:** Possibili applicazioni del BSG nei vari settori industriali. Tratta da Bianco et al., (2020) e modificata.

### 1.2.2.1 Alimentazione animale

Il BSG trova ampio impiego nel settore zootecnico. Si stima che circa il 70% del BSG prodotto è impiegato come alimentazione per gli animali, soprattutto nella dieta dei bovini da latte (Bianco et al., 2020).

Può essere utilizzato tal quale, sia come prodotto umido che come materiale essiccato, ma anche con l'aggiunta di fonti azotate economiche come l'urea per garantire un apporto completo di amminoacidi essenziali agli animali (Mussatto et al., 2006).

I principali vantaggi dell'uso del BSG nella dieta dei bovini sono l'aumento della produzione di latte, con miglioramenti anche nella qualità, e un aumento nella crescita, senza influire sulla fertilità di questi animali (Mussatto et al., 2006).

Il BSG può essere integrato anche nelle diete di suini, pollame e pesci grazie al suo contenuto elevato di fibre e proteine, infatti, vi sono riscontri positivi nella crescita se viene usato come additivo nella dieta di questi (Mussatto, 2014).

### 1.2.2.2 Alimentazione umana

Il BSG può avere applicazioni anche nella nutrizione umana: svariati prodotti da forno, spuntini, biscotti, pasta, pane integrale sono solo alcuni degli esempi che coinvolgono una farina di BSG per la loro produzione (Mussatto et al., 2006). Essendo il BSG granulare vi è la necessità di convertirlo in farina prima di aggiungerlo ai cibi. L'aggiunta di farina di BSG ai cibi migliora il valore nutrizionale dato il suo elevato contenuto proteico e fibroso. L'apporto di cibi contenenti BSG ha effetti benefici sulla salute (Mussatto et al., 2006): il BSG è ricco di  $\beta$ -glucano, una fibra solubile che aiuta a ridurre il colesterolo ed i livelli di glucosio. Studi dimostrano che i cibi con BSG hanno meno calorie rispetto ai cereali tradizionali.

È importante sottolineare che per sfruttare questi scarti agroindustriali, è fondamentale rispettare rigorose normative e cambiare la percezione dei consumatori, che potrebbero vedere questi alimenti derivanti da BSG come cibi di scarso valore (Nyhan et al., 2023): ad esempio la colorazione degli alimenti derivante da BSG è bruna, rendendola poco adatta per la preparazione di alimenti di colore chiaro.

### 1.2.2.3 Applicazioni energetiche

Il BSG è usato per produrre energia attraverso la combustione diretta o fermentazione anaerobica. Per quanto riguarda la fermentazione, in particolare, si produce biogas, una miscela costituita da metano, anidride carbonica, idrogeno e monossido di carbonio (Mussatto et al., 2006). La combustione diretta di BSG presenta delle problematiche: innanzitutto è necessario che vi sia un contenuto di umidità inferiore al 55% e quindi bisogna effettuare un pretrattamento di essiccazione, una questione piuttosto impattante però è da ricercarsi nel fatto che la combustione emette  $\text{NO}_x$  e particolato (Mussatto et al., 2006). La combustione diretta può essere vantaggiosa da un punto di vista energetico per il birrificio; tuttavia, ci sono problematiche ambientali che non possono essere sottovalutate.

### 1.2.2.4 Applicazioni secondarie

La composizione chimica propria del BSG consente di produrre mattoni utilizzati nell'edilizia rendendo il prodotto finale più poroso e con un buon isolamento termico (Chetrariu et al., 2023), è possibile utilizzarlo come precursore della carta considerando che il sottoprodotto agroindustriale ha un elevato contenuto di cellulosa e fibre (Mussatto et al., 2006).

È anche possibile usare le trebbie per produrre prodotti assorbenti in grado di catturare composti organici da fluidi di scarico come le acque reflue (Mussatto et al., 2006).

### 1.2.2.5 Applicazioni biotecnologiche

Le trebbie rappresentano un substrato interessante per la crescita microbica in quanto hanno i nutrienti necessari per la crescita, in più il costo del *feedstock* è relativamente basso con un prezzo di mercato competitivo (Bianco et al., 2020).

L'impiego di BSG in ambito biotecnologico permette di ottenere prodotti simili a quelli realizzati senza l'uso di materiali di scarto riducendo l'inquinamento ed i costi di produzione. In letteratura emerge che batteri, funghi e lieviti sono stati coltivati grazie all'uso di BSG come terreno di coltura al fine di produrre enzimi, metaboliti, pigmenti e prodotti farmaceutici di interesse industriale (Bianco et al., 2020).

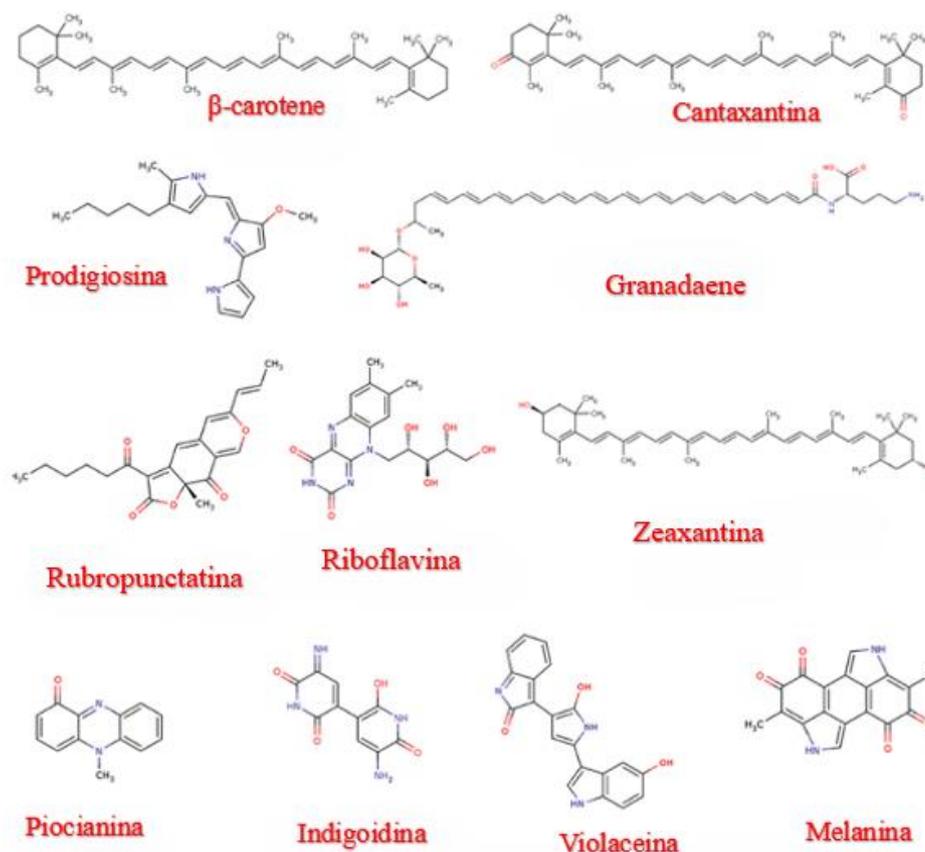
A titolo di esempio, terreno derivante da BSG, e quindi medium di coltura ottenuto da processi che impiegano le trebbie come materia prima per la sua preparazione, può essere utilizzato: per la crescita di ceppi di Lactobacilli per la produzione di acido lattico, per la produzione di enzimi da parte di *Streptomyces*, nella produzione di bioetanolo e butanolo attraverso la fermentazione con batteri del genere *Clostridium* o *Saccharomyces* e acido ascorbico da parte del genere *Aspergillus* (Bianco et al., 2020).

È interessante notare che molti pigmenti naturali possono essere prodotti da microrganismi su terreno derivante da BSG: *Monascus purpureus* (Bianco et al., 2020), *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhodotorula mucilaginosa* (Casas-Godoy et al., 2023) riescono a crescere efficacemente su terreno di BSG producendo carotenoidi.

## 1.3 Biopigmenti

In ambito biotecnologico si inseriscono i pigmenti naturali che possono essere prodotti da microrganismi utilizzando residui agroindustriali come terreno di coltura.

I biopigmenti sono classificati in base alla loro struttura chimica ed i principali sono i carotenoidi ( $\beta$ -carotene, astaxantina, licopene), gli antociani, la clorofilla, la melanina, e molti altri utilizzati nell'industria alimentare (Lopes et al., 2021). Tali molecole sono in grado di assorbire la luce nelle lunghezze d'onda comprese tra 400 e 700 nm.



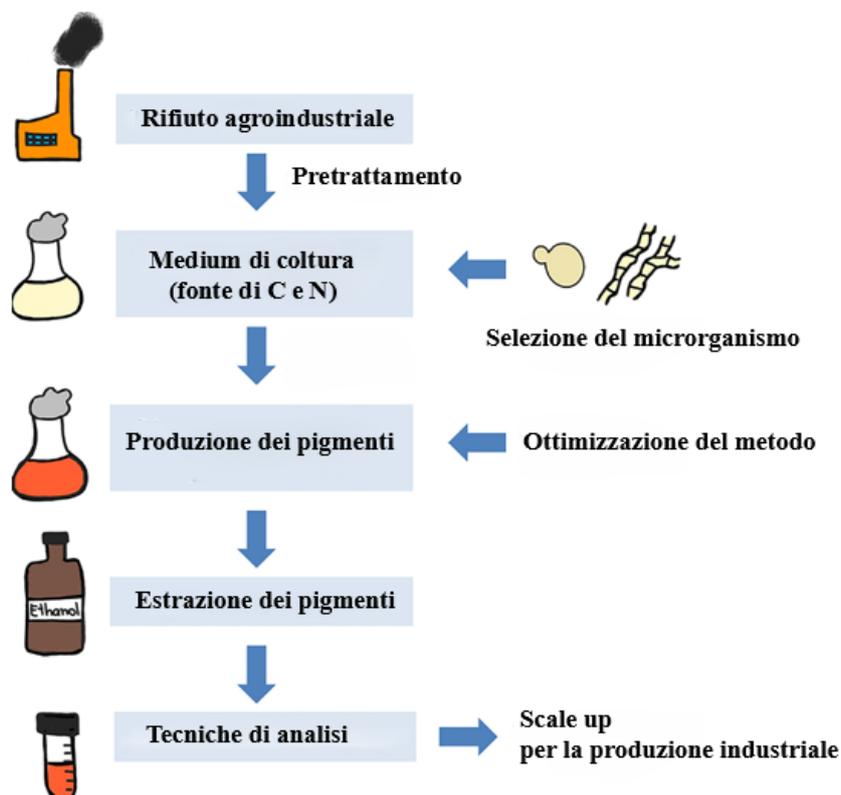
**Figura 4:** Struttura chimica di alcuni pigmenti ottenibili mediante fermentazione. Tratta da Lopes et al., (2021) e modificata.

I pigmenti microbici appaiono molto interessanti: sono ecologici, sicuri e rispetto ai coloranti sintetici non provocano allergie (Lopes et al., 2021). Studi dimostrano che i pigmenti microbici siano più resistenti al calore, all'esposizione della luce e alla variazione di pH.

I pigmenti naturali derivanti da microrganismi suscitano un forte interesse in quanto hanno un'elevata attività antiossidante, anticancerogena e antimicrobica (Lopes et al., 2021).

In generale, il costo dei pigmenti è strettamente correlato al costo dei terreni di coltura; pertanto, utilizzando un terreno di coltura di scarto derivante da rifiuti agroindustriali si andranno a produrre pigmenti ad un prezzo vantaggioso in quanto i costi di produzione sono inferiori (Lopes et al., 2021).

Affinchè i residui agroindustriali possano essere usati dai microrganismi come terreno di coltura, è necessario che essi contengano fonti di azoto e carbonio in quantità sufficienti che questi nutrienti siano biodisponibili, per tale ragione i rifiuti agroindustriali sono, in genere, sottoposti ad un pretrattamento (Lopes et al., 2021). A seguito della produzione di pigmenti bisognerà valutare il protocollo di estrazione più idoneo.



**Figura 5:** Schema generale per la produzione di pigmenti da parte di microrganismi usando residui agroindustriali. Tratta da Lopes et al., (2021) e modificata.

I microrganismi usati per la produzione di biopigmenti devono rispettare vari criteri: devono essere sicuri, ossia non patogeni e non tossici, capaci di sfruttare diverse fonti di carbonio e azoto, avere una buona resa di prodotto che deve essere facile da estrarre nella fase di *downstream* e deve resistere ad elevate concentrazioni di sale, temperatura e pH variabile (Lopes et al., 2021). I lieviti unicellulari, aventi alti tassi di crescita, sono particolarmente idonei nella produzione di biopigmenti. Essi sono considerati più sicuri rispetto ai funghi filamentosi che potrebbero produrre micotossine e per tale ragione si preferisce non usarli in ambito biotecnologico.

## 1.4 Carotenoidi

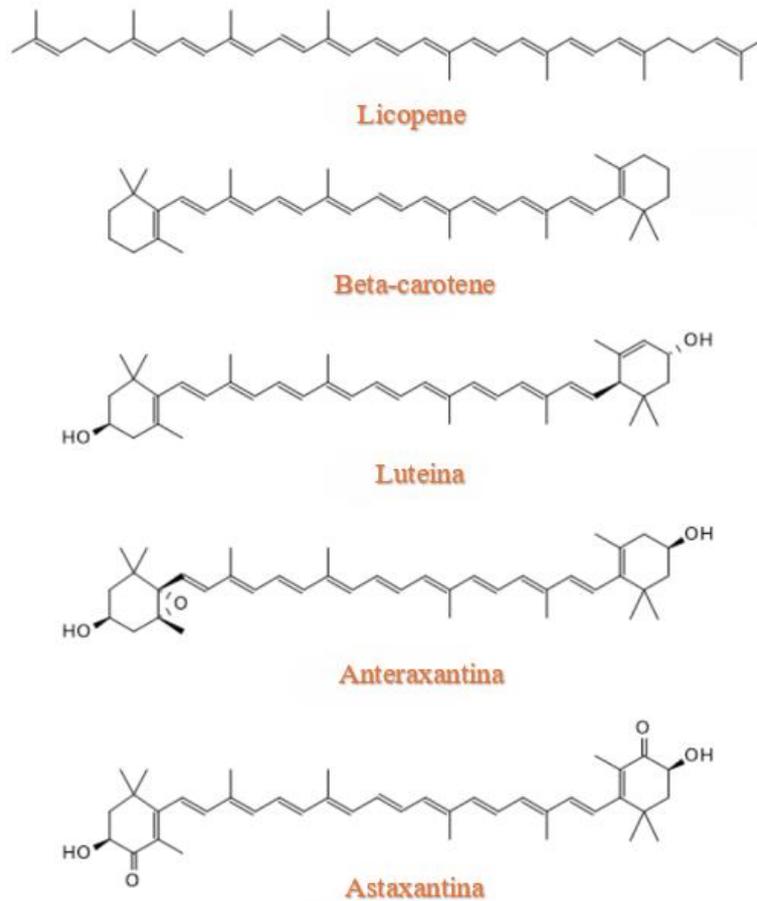
I carotenoidi sono una classe di pigmenti liposolubili e naturali, ne sono state isolate e caratterizzate oltre 600 molecole diverse (Dias Rodrigues et al., 2019), e di queste più di 100 si trovano all'interno delle fonti vegetali e circa 40 sono necessari per la dieta umana (Tazzini, 2013). Da un punto di vista strutturale, sono molecole isopreniche a 40 atomi di carbonio caratterizzati da un'alta solubilità lipidica (Cheng et al., 2016) ossia sono sostanze che si dissolvono bene nei grassi e negli oli e questa proprietà è legata alla struttura chimica di queste molecole; inoltre, il fatto di contenere doppi legami permette di assorbire la luce in un range compreso tra i 400 e 500 nm (Cheng et al., 2016).

In generale, i carotenoidi sono suddivisi principalmente in due gruppi, in base alla presenza o meno di atomi di ossigeno nelle loro strutture: xantofille e caroteni (Cheng et al., 2016). Tra i caroteni, privi di ossigeno e aventi colorazione rosso-arancio, vi è il  $\beta$ -carotene, il

carotenoide più conosciuto e importante, precursore della vitamina A, nonché il primo carotenoide isolato nel 1831 (Tazzini, 2013). Essi sono formati solamente da atomi di carbonio e idrogeno ed hanno formula chimica  $C_{40}H_{56}$ : sono un esempio, l' $\alpha$ -carotene, il  $\beta$ -carotene, il licopene e il fitoene.

Le xantofille contengono anche atomi di ossigeno fino ad un massimo di sei, hanno formula chimica  $C_{40}H_{56}O_n$ : sono un esempio la luteina, l'antexantina e l'astaxantina.

I carotenoidi possono anche essere classificati a seconda che la molecola presenti anelli ciclici alle estremità o meno. A titolo di esempio, come si nota dalla Figura 6, il licopene è un carotenoide aciclico, mentre il  $\beta$ -carotene è ciclico.



**Figura 6:** Alcuni esempi strutturali dei carotenoidi. Tratta da Tazzini, (2013) e modificata.

I carotenoidi, come ci si aspetta dalla lunga catena di carbonio, sono molecole lipofile, insolubili in acqua e per tale ragione si dissolvono bene in solventi organici e quindi nella fase di estrazione e recupero dei carotenoidi si usano solventi come acetone e DMSO (Catzu, 2013).

Sono responsabili delle vivaci colorazioni che vanno dal giallo al rosso in frutta, verdura, fiori, alghe, batteri e funghi.

La loro scoperta è avvenuta all'incirca nel 1800 e sono prodotti da tutti gli organismi fotosintetici come microalghe e piante, ma anche da alcuni microrganismi non fotosintetici come funghi e batteri (Tazzini, 2013).

Essi vengono utilizzati in vari settori industriali, tra cui quello alimentare, dove trovano applicazione come coloranti o come integratori nutraceutici, in cosmetica e in ambito farmaceutico grazie alle loro proprietà antiossidanti e antitumorali, di riduzione del rischio

di malattie degenerative e cardiovascolari (Sharma et al., 2019), inoltre la luteina, facente parte delle xantofille, è importante per la salute degli occhi (Tazzini, 2013).

La richiesta di carotenoidi è sempre in continua espansione ed ogni anno si ha un aumento del 2,9% nel mercato mondiale (Cheng et al., 2016). Il mercato globale dei carotenoidi nel 2017 era pari a 1,5 miliardi di dollari, con una crescita di 2 miliardi di dollari nel 2022. Tra i carotenoidi, il  $\beta$ -carotene è il più importante e commercializzato, con un valore di mercato di circa 334 milioni di dollari (Dias Rodrigues et al., 2019).

### 1.4.1 Produzione di carotenoidi

I carotenoidi sono maggiormente prodotti tramite metodi sintetici, tuttavia, la crescente domanda di prodotti più sani e naturali ha spinto l'industria ad incrementare la produzione di carotenoidi attraverso processi naturali (Dias Rodrigues et al., 2019). Ad oggi la produzione di questi pigmenti rossi può avvenire per estrazione da fonti vegetali, per sintesi chimica o attraverso processi biotecnologici (Catzu, 2013).

#### 1.4.1.1 Estrazione da vegetali

Nel 1831 il farmacista tedesco Wackenroder riuscì a cristallizzare dalla radice della carota un pigmento giallo che chiamò carotene (Tazzini 2013). Fino agli anni '50, i carotenoidi erano estratti esclusivamente dai vegetali. Questo processo prevedeva l'utilizzo di solventi organici polari al fine di ottenere una maggiore purezza. Tuttavia, l'estrazione da fonti vegetali, come le carote, aveva degli svantaggi come la dipendenza dalla disponibilità stagionale delle piante usate e la necessità di avere grandi quantità di fonti non sempre disponibili (Catzu, 2013).

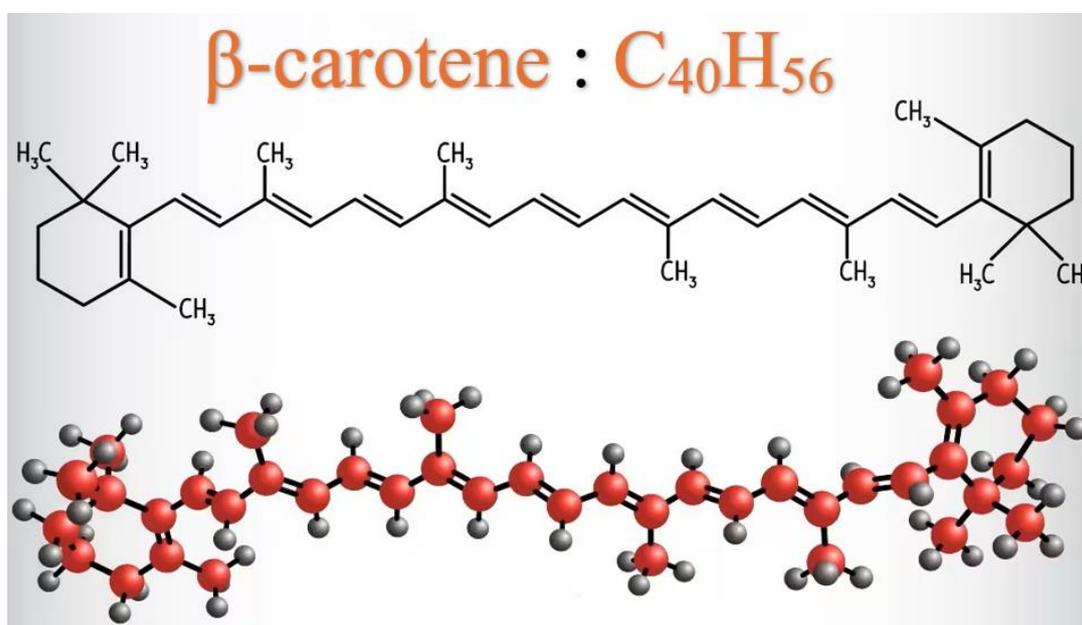


**Figura 7:** Fonti vegetali da cui è possibile estrarre i carotenoidi. Tratta da <https://www.my-personaltrainer.it/integratori/beta-carotene.html>

### 1.4.1.2 Metodi chimici

Il carotenoide ottenuto con sintesi chimica è il  $\beta$ -carotene, e la sua prima produzione industriale, Roche, è avvenuta nel 1954 e successivamente dal 1960 il  $\beta$ -carotene è stato prodotto anche dalla BASF: per ottenere il  $\beta$ -carotene si parte dal suo precursore, il  $\beta$ -ionone, un composto aromatico sintetizzato a partire da acetone o butadiene con una serie di reazioni chimiche complesse (Catzu, 2013).

I processi di produzione delle due aziende sono diversi: la BASF impiega la condensazione di Witting, una reazione che allunga la catena di carbonio creando i doppi legami necessari per ottenere il pigmento desiderato, questo è il metodo più efficiente per la produzione di carotenoidi (Catzu, 2013). I carotenoidi ottenuti chimicamente hanno un costo modico, tuttavia essi vengono classificati come additivi chimici e per tale ragione il loro uso negli alimenti ha destato preoccupazione e c'è sempre di più uno spiccato interesse alla produzione di carotenoidi mediante processi biotecnologici (Igreja et al., 2021).



**Figura 8:** Struttura chimica del  $\beta$ -carotene. Tratta da <https://www.my-personaltrainer.it/integratori/beta-carotene.html> e modificata.

### 1.4.1.3 Metodi microbiologici

La produzione di carotenoidi può avvenire attraverso i bioprocessi che coinvolgono una varietà di microrganismi, tra cui microalghe, batteri, funghi filamentosi e lieviti, i quali li producono naturalmente come prodotto del loro metabolismo. I carotenoidi sono dei metaboliti secondari e la loro produzione da parte dei microrganismi inizia nella fase esponenziale e continua per tutta la durata della fase stazionaria (Catzu, 2013). Tuttavia, uno degli ostacoli principali alla produzione biotecnologica di carotenoidi è il costo elevato dei terreni di coltura ed una soluzione per ridurre i costi è l'utilizzo di sottoprodotti agroindustriali come fonti alternative di nutrienti.

La produzione biotecnologica di carotenoidi è vantaggiosa in quanto si vanno a produrre anche altri pigmenti a bassa concentrazione che comunque apportano un vantaggio al prodotto finale (Catzu, 2013).

Le microalghe sono in generale una fonte di numerosi pigmenti e andando nello specifico, il genere *Dunaliella* è in grado di accumulare nei cloroplasti una enorme quantità di  $\beta$ -carotene. Anche i funghi filamentosi come *Blakeslea trispora* e *Phycomyces blakesleanus* possono produrre carotenoidi, soprattutto in presenza di condizioni di stress come, ad esempio, l'esposizione alla luce blu o l'uso di surfattanti (Catzu, 2013). L'uso di questi funghi richiede un'attenzione particolare a causa della loro produzione di micotossine, come quelle prodotte dal genere *Monascus*, tuttavia con tecniche di ingegneria genetica, è possibile migliorare la produzione di pigmenti in questi funghi filamentosi ed allo stesso tempo ridurre la secrezione di micotossine (Lopes et al., 2021).

Una grande importanza viene data ai lieviti, organismi unicellulari caratterizzati da elevati tassi di crescita (Lopes, 2021) che producono carotenoidi in maniera più vantaggiosa rispetto ad altri microrganismi. I lieviti produttori di carotenoidi, "red yeasts" o lieviti rossi, appartengono a diversi generi: *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus* e *Xantophyllomyces*. Il termine lievito rosso è usato per indicare quelle specie che possono produrre elevate concentrazioni di pigmenti carotenogenici che conferiscono una colorazione rossa/arancione alle colonie (Li et al., 2022). Questi lieviti rossi hanno la capacità di crescere in terreni di coltura economici e per tale ragione hanno un ruolo cruciale per la produzione di carotenoidi (Catzu, 2013). Inoltre, la resa nella produzione di questi pigmenti è strettamente correlata alla composizione del medium di coltura usato (Catzu, 2013).

## 1.4.2 Ruolo dei carotenoidi

I carotenoidi hanno un ruolo fondamentale nelle piante in quanto svolgono molteplici funzioni: hanno una funzione antiossidante, migliorano l'assorbimento della luce solare, sono precursori di fitormoni e collaborano insieme alla clorofilla e agli antociani per la colorazione delle foglie (Tazzini, 2013).

Questi pigmenti contribuiscono alla difesa delle piante contro i patogeni ed hanno anche il compito di proteggere gli organismi fotosintetici dall'eccessiva esposizione alla luce del sole e bloccare i radicali liberi ed alcune specie reattive dell'ossigeno (Tazzini, 2013).

Negli organismi non fotosintetici, i carotenoidi svolgono un'azione antiossidante, neutralizzano le specie reattive dell'ossigeno e sono i precursori della vitamina A (Catzu, 2013).

L'uomo non è in grado di sintetizzare la vitamina A e deve assumerla attraverso l'alimentazione con l'uso di alimenti di origine animale oppure come provitamina, ossia come pigmenti carotenogenici (Catzu 2013). Con la dieta, questi si accumulano nel fegato, reni, cervello e polmoni dove regolano funzioni importanti (Tazzini, 2013). La principale fonte di carotenoidi nella dieta umana è rappresentata da frutta e verdura.

Negli esseri umani, questi pigmenti svolgono molteplici ruoli. La vitamina A ha il compito di controllare l'espressione di circa 700 geni (Tazzini, 2013). Va ricordato comunque che non tutti i carotenoidi sono provitaminici.

Andando nel dettaglio il  $\beta$ -carotene svolge un ruolo antiossidante, infatti, è in grado di alleviare lo stress ossidativo riducendo la comparsa di disturbi neurologici e del diabete (Paul et al., 2023), aiuta a prevenire la cecità, svolge un'azione antibatterica nei confronti di *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli* e *Salmonella enteritidis* (Paul et al., 2023). I carotenoidi sono anche in grado di svolgere un'azione anticancerogena, aiutano il sistema immunitario a rafforzarsi ed hanno proprietà antivirali: durante la pandemia da COVID-19 l'OMS ha raccomandato di assumere frutta e verdura ricche di carotenoidi per alleviare i

sintomi causati dal virus (Paul et al., 2023). I carotenoidi sono in grado di proteggere l'organismo dai raggi ultravioletti e di avere un'attività antimalarica (Paul et al., 2023).

## 1.5 *Rhodotorula mucilaginosa*

*Rhodotorula mucilaginosa* è un lievito rosso aerobico e incapace di effettuare la fermentazione degli zuccheri (Catzu, 2013).

È un lievito ubiquitario infatti è presente nell'aria, nel suolo e negli oceani, sono state rinvenute tracce anche nel pesce, nella carne e nei formaggi (Catzu, 2013). È stato isolato nel formaggio intorno agli anni '30 da Francis Charles Harrison (Li et al., 2022).

Il nome *Rhodotorula* deriva dal greco *rhodos* e dal latino *torula*, e significa letteralmente protuberanza rossa (Mussagy et al., 2022), *mucilaginosa* invece tende a sottolineare che è un lievito viscoso all'interno di un liquido (Li et al., 2022).

Da un punto di vista tassonomico, *Rhodotorula mucilaginosa* fa parte della famiglia delle *Sporidiobolaceae*, ordine delle *Sporidiobolales*, classe dei *Pucciniomycotina* e phylum dei *Basidiomycota* nel regno dei funghi (Li et al., 2022).

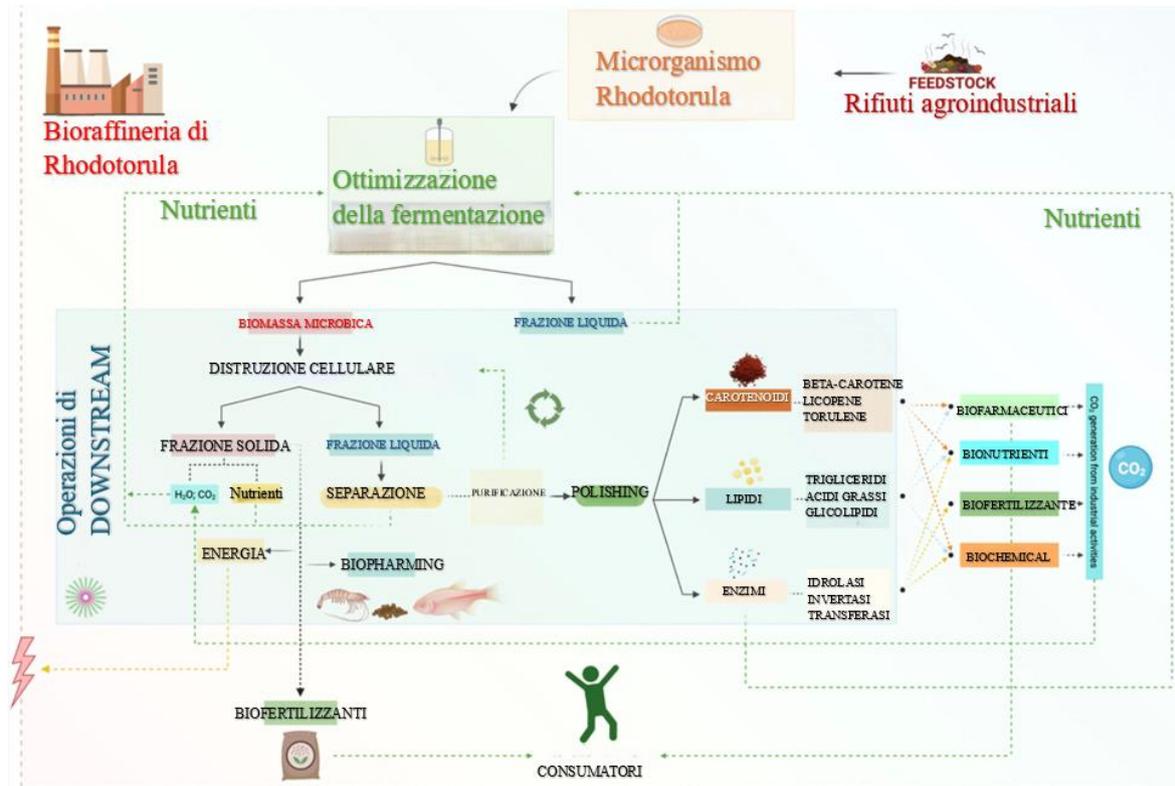
Guardando la fisiologia, il genere *Rhodotorula* comprende una vasta gamma di lieviti eucariotici unicellulari, circa 34, che si differenziano per il tipo di pigmenti prodotti, l'intensità della colorazione, la morfologia che può essere sferoidale, allungata o ovale (Mussagy et al., 2022) e l'assimilazione dei nutrienti. Di questi tra i più importanti in ambito biotecnologico ricordiamo *R. mucilaginosa*, *R. futronensis*, *R. rubra*, *R. glutinis*, *R. pustula* (Catzu, 2013). Si riproduce per via asessuata tramite gemmazione (Mussagy et al., 2022).



**Figura 9:** Colonie di *Rhodotorula mucilaginosa* cresciute su capsula di Petri. Tratta da [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rhodotorula\\_mucilaginosa\\_colonies\\_53.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rhodotorula_mucilaginosa_colonies_53.jpg)

Come ci si aspetta dal fatto che è un lievito usato nell'industria biotecnologica, generalmente non rappresenta una minaccia per la sicurezza e la salute umana (Li et al., 2022), è un microrganismo di classe di biosicurezza 1 e quindi caratterizzato da un rischio biologico molto basso secondo le norme di sicurezza. Ultimamente è stata riscontrata una bassa patogenicità per l'uomo da parte di alcune specie appartenenti al genere *Rhodotorula* e per tale ragione è considerato un patogeno opportunisto per l'uomo con un sistema immunitario compromesso (Mussagy et al., 2022). Nell'ambito biotecnologico il genere *Rhodotorula* è reputato una bioraffineria microbica in quanto è in grado di produrre molte biomolecole ad alto valore aggiunto di interesse industriale e con promettenti potenzialità commerciali: prime fra tutti  $\beta$ -carotene, torulene e licopene (Mussagy et al., 2022), ma anche lipidi, enzimi e biofertilizzanti.

*Rhodotorula* è un lievito con un metabolismo complesso (Torres-Alvarez et al., 2022), caratterizzato da un elevato tasso di crescita se paragonato a batteri o microalghe (Li et al., 2022), è capace di crescere utilizzando substrati a basso costo in quanto può utilizzare diverse fonti di carbonio, è capace di crescere in condizioni difficili come ambienti contaminati o in condizioni estreme come basso pH, elevate concentrazioni di sali e basse temperature (Torres-Alvarez et al., 2022).



**Figura 10:** Rappresentazione schematica di un processo di bioraffinazione utilizzando *Rhodotorula*. Tratta da Mussagy et al., (2022) e modificata.

### 1.5.1 Vie metaboliche per la produzione di carotenoidi

Al fine di comprendere al meglio la produzione di carotenoidi, per migliorarne le rese, si considerano le vie metaboliche alla base della carotenogenesi.

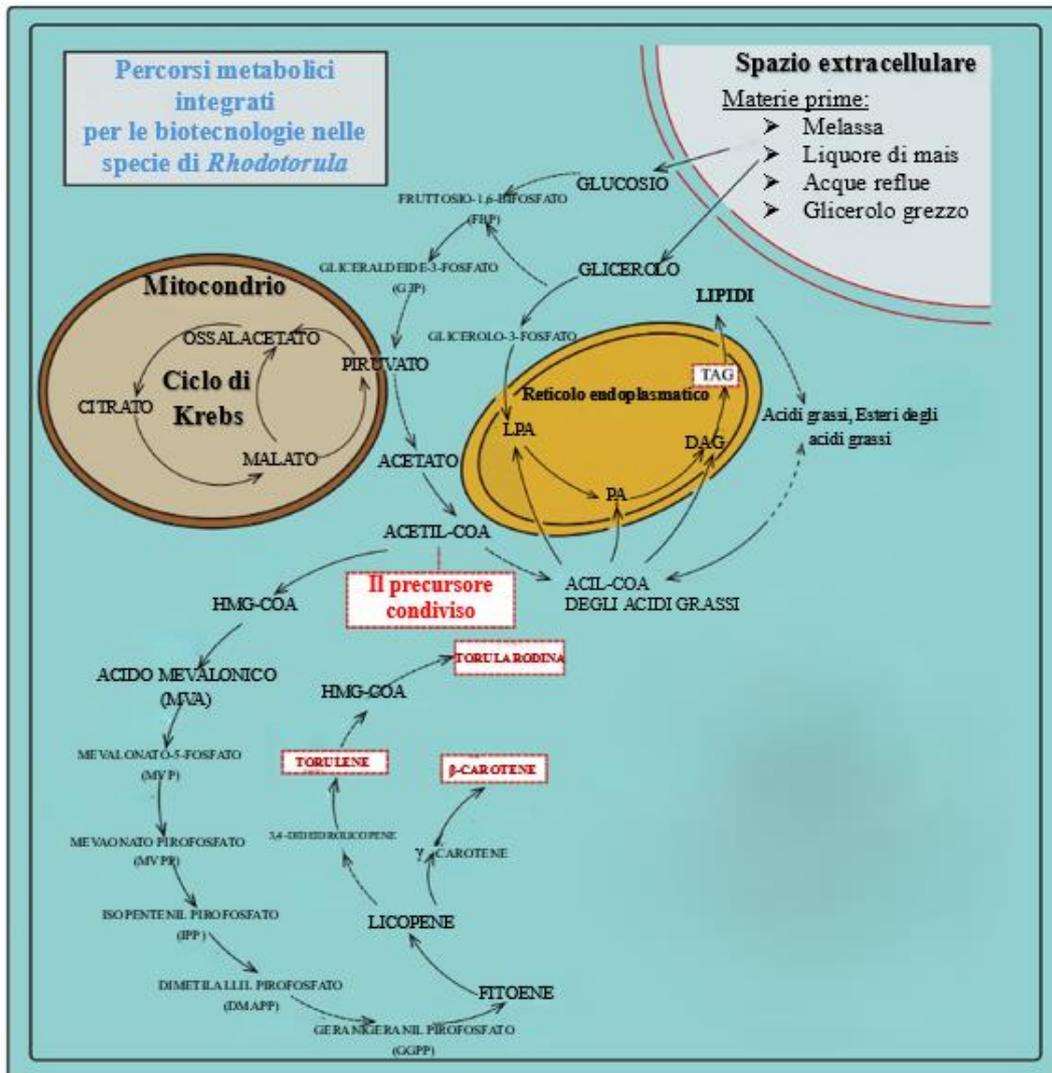
Il glucosio viene metabolizzato dalla cellula attraverso la glicolisi e convertito in fruttosio-1,6-bisfosfato (FBP), che a sua volta si trasforma in gliceraldeide-3-fosfato (G3P). Il G3P viene ulteriormente processato per produrre piruvato (Li et al., 2022).

Il piruvato entra nei mitocondri e viene convertito in acetil-CoA che può essere usato dal lievito:

- Per la sintesi degli acidi grassi attraverso la via metabolica di biosintesi dei lipidi;
- Dare inizio alla sintesi dei carotenoidi.

La sintesi dei carotenoidi comporta una serie di reazioni (Li et al., 2022):

1. Tre molecole di acetil-CoA si uniscono per formare l'acido mevalonico (MVA) con la via metabolica del mevalonato;
2. L'MVA viene convertito attraverso una serie di reazioni enzimatiche in isopentenil pirofosfato (IPP) e poi in dimetilallil pirofosfato (DMAPP), precursore degli isoprenoidi.
3. Attraverso la via di biosintesi isoprenica avvengono delle reazioni enzimatiche formando geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), un composto a venti atomi di carbonio.
4. Due molecole di GGPP si uniscono per formare il fitoene, un carotenoide incolore composto da quaranta atomi di carbonio e tre doppi legami coniugati.
5. Il fitoene è il primo composto della via carotenogenica e subisce a questo punto diverse reazioni di deidrogenazione, trasformandosi in licopene, un carotenoide lineare precursore di diversi carotenoidi ciclici come il  $\beta$ -carotene e torulene di nostro interesse industriale (Igreja et al., 2021).



**Figura 11:** Illustrazione dei principali percorsi metabolici che avvengono all'interno delle cellule di *Rhodotorula*. Tratta da Li et al., (2022) e modificata.

### 1.5.2 Crescita di *Rhodotorula mucilaginosa* su scarti agroindustriali

Dalla letteratura emerge che *Rhodotorula mucilaginosa* è stata ampiamente utilizzata per la produzione di carotenoidi utilizzando come substrato rifiuti agroindustriali come melassa di canna da zucchero e liquore di mais (Dias Rodrigues et al., 2019), buccia di cipolla e fagiolo verde (Sharma et al., 2019), estratto di buccia di banana (Torres-Alvarez et al., 2022), sansa dell'olio d'oliva (Ghilardi et al., 2020), melassa di canna da zucchero (Costa et al., 2020) e ketchup e melassa di canna da zucchero (Cheng et al., 2016). Il metodo di coltura utilizzato nelle prove citate, è in beuta, la prova condotta da Sharma et al., (2019) è invece in bioreattore da 3L. Va sottolineato che in tutti gli articoli vi è stata l'ottimizzazione delle condizioni operative: si nota che la temperatura ottimale è di circa 25°C, il pH oscillante tra 5,5 e 6 e l'agitazione è di circa 150 rpm.

Per aumentare la resa in biomassa e la produzione di carotenoidi, si ottimizza il rapporto C/N del medium di coltura. Dias Rodrigues et al., (2019) hanno valutato il rapporto C/N pari a 6,04 per quanto riguarda medium ottenuto a partire da liquore di mais e pari a 6,2 per quanto concerne il terreno di coltura ottenuto a partire da melassa di canna da zucchero. Sharma et al., (2019) hanno valutato il rapporto C/N nello scarto agroindustriale utilizzato: hanno avuto la massima produzione di carotenoidi con un rapporto negli scarti di buccia di cipolla pari a 23,19, mentre la buccia di fagiolo verde ha un rapporto di 31,6.

Casas-Godoy et al., (2023) riporta che la miglior condizione per la produzione di biomassa di *R. mucilaginosa*, cresciuta in sciroppo di BSG, si ottiene quando questo viene arricchito di fonti di azoto sia organico che inorganico modificando il C/N del terreno.

Catzu, (2013) afferma che l'aggiunta di glicerolo rappresenta un'alternativa valida al glucosio per modificare il rapporto C/N, migliorando la produzione di biomassa e carotenoidi.

Cheng et al., (2016) hanno notato che l'aggiunta di ioni metallici  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  promuovono la produzione di carotenoidi da parte di *Rhodotorula mucilaginosa*, Allahkarami et al., (2021) ha constatato che cellule di lievito coltivate con l'uso di luce bianca a LED (lunghezza d'onda compresa tra 395 nm e 530 nm) producono più carotenoidi. Paul et al., (2023) hanno notato che la velocità di aerazione influenza positivamente la crescita cellulare e di conseguenza la produzione di carotenoidi.

Analizzando la quantità di carotenoidi totali estratti nei lavori citati precedentemente, Dias Rodrigues et al., (2019) dopo un tempo di fermentazione pari a 216 ore hanno recuperato 121,3  $\mu\text{g/g}_{\text{lievito}}$  corrispondente ad una concentrazione compresa tra 1248,5  $\mu\text{g/L}$  e 3726  $\mu\text{g/L}$ ; Sharma et al., (2019) dopo 84 ore di fermentazione hanno ottenuto un quantitativo di carotenoidi totali massimo pari a 819,23  $\mu\text{g/g}_{\text{lievito}}$ ; Torres-Alvarez et al., (2022) e Ghilardi et al., (2020) dopo un tempo di fermentazione pari a 144 ore hanno estratto un quantitativo di carotenoidi pari rispettivamente a 317  $\mu\text{g/g}_{\text{lievito}}$  e 7,30  $\mu\text{g/g}_{\text{lievito}}$ . Costa et al., (2020) dopo 120 ore di fermentazione hanno recuperato un quantitativo di carotenoidi totali pari a 53  $\mu\text{g/g}_{\text{lievito}}$ , infine la prova di Cheng et al., (2016) ha avuto una durata di 216 ore con un quantitativo di carotenoidi totali estratti pari a 268,6  $\mu\text{g/g}_{\text{lievito}}$ .

Si sottolinea che, per le prove sopra citate, la produzione totale massima di carotenoidi non sempre coincide con la durata complessiva della sperimentazione; infatti, è indicato per quanto tempo è avvenuta la fermentazione e non a quale tempo si ha la massima produzione di carotenoidi: questo dato è riportato ad esempio per Allahkarami et al., (2021) che hanno ottenuto una massima produzione di 223,5  $\mu\text{g/g}_{\text{lievito}}$  a 72 ore o Catzu, (2013), che utilizza *R. glutinis*, che ha riscontrato una massima produzione di carotenoidi a 48 ore con un valore di 0,585  $\text{mg/g}_{\text{lievito}}$ .

In Tabella 1, si riportano le condizioni operative ed i dati relativi alla produzione di carotenoidi con *R. mucilaginosa* su scarti agroindustriali.

**Tabella 1:** Riepilogo dei parametri chiave dei vari riferimenti bibliografici per la produzione di carotenoidi.

Riferimento bibliografico	Scarto agroindustriale o materia prima usati	Microrganismo usato	Metodo di coltivazione	Condizioni operative	Durata della prova	Produzione totale di carotenoidi
Dias Rodrigues et al., (2019)	Melassa di canna da zucchero e liquore di mais	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Batch e Fed-Batch. Beuta.	T=25 °C. Agitazione=180 rpm. pH=6,0. Liquore di mais:C/N=6,04. Melassa di canna da zucchero: C/N=6,2	216 [h]	Batch:1248,5µg/L Fed-Batch:3726 µg/L
Sharma et al., (2019)	Buccia di cipolla e buccia di fagiolo verde	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Bioreattore da 3L	T=25,8 °C. Agitazione=119,6 rpm. pH=6,1. Buccia di cipolla: C/N=23,19. Buccia di fagiolo verde: C/N=31,6	84 [h]	Buccia di cipolla: 710,33µg/g <sub>lievito</sub> . Buccia di fagiolo verde:819,23µg/g <sub>lievito</sub>
Ghilardi et al., (2020)	Sansa di olive	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Beute	T=30 °C. Agitazione=150 rpm. pH=5,15.	144 [h]	7,3 µg/g <sub>lievito</sub>
Costa et al., (2020)	Melassa di canna da zucchero	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Non riportato.	T=30 °C. Agitazione=150 rpm. pH=6,49.	120 [h]	53 µg/g <sub>lievito</sub>
Torres-Alvarez et al., (2022)	Estratto di buccia di banana	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Beute	Non riportato.	144 [h]	317 µg/g <sub>lievito</sub>
Cheng et al., (2016)	Ketchup di scarto e melassa di canna da zucchero	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Beute	T=25 °C. Agitazione=120 rpm. pH=5. Aggiunta di ioni metallici: Fe <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup>	216 [h]	268,6 µg/g <sub>lievito</sub>
Catzu, (2013)	Tereno YEPGLY	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Beute	T=30 °C. Agitazione=180 rpm. pH=7,0. C/N =11,3	120 [h]. Massima produzione di carotenoidi a 50 [h]	790 µg/g <sub>lievito</sub>
Allahkarami et al., (2021)	Terreno YPG, YMA, SDA e PDA	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Beute	T=28 °C. Agitazione=150 rpm. pH=6. Luce a LED bianca (lunghezza d'onda 395nm-530nm)	120 [h]. Massima produzione di carotenoidi a 72 [h]	YPG:1130µg/L . Non riportato per altri terreni usati.

## 1.6 Obiettivi della tesi

Il lavoro di tesi si propone di valorizzare le trebbie esauste (BSG), un materiale di scarto agroalimentare, per utilizzarle come medium di coltura per la coltivazione di *Rhodotorula mucilaginosa* CBS316, al fine di produrre carotenoidi. Il lievito rosso utilizzato è stato isolato presso il laboratorio biotecnologico del Politecnico di Torino.

Nel corso di questo studio sono stati condotti diversi passaggi fondamentali per l'analisi e l'ottimizzazione del processo di fermentazione utilizzando BSG. In particolare:

- Come analisi preliminare, è stata effettuata una caratterizzazione chimico-fisica delle trebbie esauste per comprenderne le proprietà e valutarne il loro potenziale utilizzo. Queste trebbie, denominate BSG Forna, derivano dal processo di produzione della birra di un impianto semiprofessionale (Forna, 2022) e gentilmente concesse per questo lavoro di tesi.
- Successivamente, si produce uno sciroppo di BSG mediante un processo di estrazione in autoclave ( $T=121^{\circ}\text{C}$  per 20 minuti) per utilizzarlo come medium di coltura.
- Il processo fermentativo è stato condotto inizialmente in piastre multipozzetto per valutare l'effetto dell'aggiunta di vari componenti sul rapporto carbonio/azoto. Questo approccio permette di determinare se tali aggiunte possano aumentare la produzione della biomassa e, di conseguenza, la produzione di carotenoidi. L'attenzione è quindi rivolta a identificare il rapporto C/N ottimale per ottenere migliori risultati.
- Lo scale-up è stato effettuato in beute Erlenmeyer da 500 mL per consentire una fermentazione su scala più ampia, su sciroppo di BSG.
- A differenti tempi di fermentazione, si quantificano i carotenoidi totali estratti.
- Infine, è stato valutato il protocollo più efficiente per l'estrazione dei carotenoidi tra quelli trovati nei riferimenti bibliografici.

## 2. Materiali e Metodi

### 2.1 Caratterizzazione di BSG

Il BSG usato, denominato Forna, ha una ricetta che comprende il 50% di malto Pilsner, 20% malto Cara Ruby, 15% malto Pale Ale e 15% fiocchi d'avena.

Le trebbie esauste, una volta recuperate dall'impianto di produzione, sono state conservate in laboratorio ad una temperatura di  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  fino al momento del loro utilizzo.

Il BSG Forna è stato inizialmente caratterizzato in termini di contenuto di umidità e pH.



**Figura 12:** BSG mantenuto alla temperatura di  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.1.1 Contenuto di umidità

Un quantitativo di BSG pari a circa 20 g, scongelato e portato a temperatura ambiente, è stato pesato utilizzando una bilancia di precisione SCALTEC SBC 31 e successivamente essiccato in stufa (ISCO 9000) a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  per un minimo di 24 ore e fino al raggiungimento del peso costante.



**Figura 13:** Campione di BSG poste in stufa.

Il peso delle trebbie essiccate è stato valutato al termine dell'essiccamento al fine di calcolare la percentuale di umidità. Si ricorda che sono stati effettuati cinque campionamenti di vari lotti di BSG al fine di determinare un valor medio.



**Figura 14:** Bilancia SCALTEC SBC 31.

Per il calcolo dell'umidità ci si è serviti della seguente formula:

$$\% \text{ di umidità} = \frac{\text{massa BSG umida [g]} - \text{massa BSG secca [g]}}{\text{massa BSG umida [g]}} \cdot 100$$

Per determinare il contenuto di umidità delle trebbie, è stata utilizzata anche la termobilancia (Ohaus MB120), uno strumento che permette di eseguire un'analisi più rapida e precisa rispetto al metodo gravimetrico con essiccazione in stufa. Con l'uso della termobilancia la misurazione dell'umidità è di tipo automatico. In particolare, si è utilizzato un peso di BSG di circa 10 g e sono stati effettuati anche in questo caso cinque misure ripetute per determinare un valor medio. Il riscaldamento è stato fatto alla stessa temperatura di 80°C e al termine la bilancia restituisce automaticamente i valori di umidità.



**Figura 15:** Termobilancia Ohaus MB120.

### 2.1.2 Valutazione del pH

Vengono eseguite tre repliche del pH con tre diversi solventi, acqua distillata, KCl 1 M e CaCl<sub>2</sub> 0,01 M, su un campione prelevato da diversi contenitori di BSG umido (scongelato e portato a temperatura ambiente), utilizzando 20 g per ciascun campione.

Il BSG umido è quindi posto in tre becher distinti, ognuno contenente 50 mL di una delle tre diverse soluzioni al fine di avere un rapporto peso:volume pari a 1:2.5. Successivamente si crea una sospensione che viene agitata su un agitatore magnetico IKA C-Mag HS a 150 rpm per 120 min. Trascorso questo tempo, la sospensione viene lasciata sedimentare per un'ora.

Il surnatante ottenuto viene sottoposto a misurazione del pH usando il pH-metro inoLab pH 730, dotato di elettrodo manuale SenTix 81. Si effettua, inoltre, la misurazione del pH dei tre solventi puri.



**Figura 16:** pH-metro, inoLab pH 730.

## 2.2 Sciropo di BSG

La produzione di carotenoidi da parte di *Rhodotorula mucilaginosa* è stata realizzata tramite fermentazione in terreno liquido utilizzando uno sciropo prodotto a partire da BSG.

### 2.2.1 Preparazione dello sciropo di BSG mediante estrazione in autoclave

Dopo aver scongelato a temperatura ambiente un quantitativo di BSG, la matrice viene sottoposta ad un processo di essiccazione ponendolo in stufa a 80 °C per un periodo di 24h.



**Figura 17:** BSG dopo il processo di essiccazione in stufa.

Si prelevano 12,9 grammi di BSG secco che vengono posti in una beuta dalla capacità di 1000 mL e si aggiungono 75 mL di acqua deionizzata, mantenendo un rapporto 1:5,81 (peso/volume).

Prima di effettuare il ciclo in autoclave si chiude l'apertura della beuta con foglio di alluminio e lo si sigilla utilizzando nastro adesivo in carta.



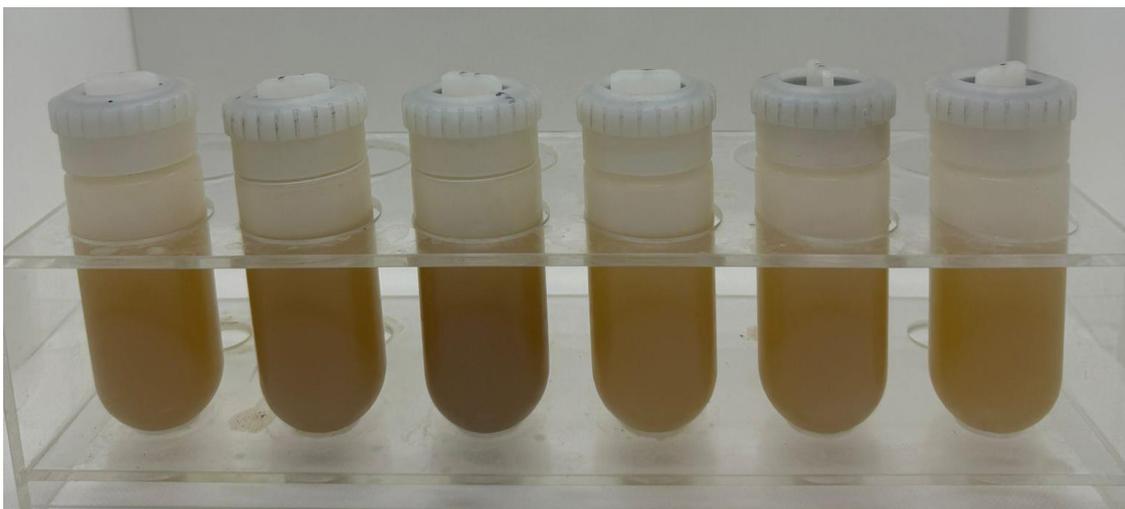
**Figura 18:** Miscela di BSG secca e acqua deionizzata in rapporto 1:5,81 (peso/volume) all'interno di una beuta prima dell'estrazione in autoclave.

La miscela all'interno della beuta viene quindi sottoposta ad un'estrazione in autoclave. Questo processo avviene ad una temperatura di 121 °C, pressione di 2 atm per 20 minuti. Terminata l'estrazione, il contenuto della beuta viene grossolanamente separato utilizzando uno strato di garza, al fine di dividere la fase solida e la fase liquida.



**Figura 19:** Surnatante ottenuto a valle dell'estrazione in autoclave a seguito della prima filtrazione con garza.

La fase liquida risultante viene poi trasferita in provettoni da centrifuga e sottoposta ad una centrifugazione ad una velocità di 15000 rpm, per una durata di 10 minuti ed alla temperatura di 24 °C.



**Figura 20:** Fase liquida, post filtrazione con uno strato di garza, prima di essere sottoposta a centrifugazione.

Dopo la centrifugazione, si procede con una seconda fase di filtrazione mediante doppia garza. Si misura accuratamente il volume di estratto ottenuto e questo viene opportunamente caratterizzato.



**Figura 21:** Sciropo di BSG tq.

## 2.2.2 Caratterizzazione dello sciropo di BSG

Lo sciropo di BSG, ottenuto mediante estrazione in autoclave, come indicato nel paragrafo 2.2.1, è stato caratterizzato in termini di: pH, contenuto di proteine totali e concentrazione del D(+)-Glucosio. Si effettuano le misurazioni di contenuto di proteine totali anche a seguito della prima e seconda filtrazione con garza.

Dal Dipartimento DIATI è stata anche valutata la concentrazione di carbonio e azoto nello sciropo ottenuto da BSG, come sarà successivamente precisato nella sezione dei risultati.

### 2.2.2.1 Valutazione del pH

Si valuta il pH dello sciropo di BSG, tramite il pH-metro inoLab pH 730. Sono state effettuate cinque misurazioni su vari lotti di sciropo di BSG prodotto.

### 2.2.2.2 Valutazione delle proteine totali

Per determinare il contenuto delle proteine totali nello sciroppo di BSG si utilizza un metodo spettrofotometrico diretto tramite la valutazione alla lunghezza d'onda di 280 nm ( $OD_{280}$ ), cui assorbono gli amminoacidi aromatici.

Le misure di assorbanza vengono effettuate grazie all'uso di cuvette con capacità di 4mL nello spettrofotometro LAMBDA 465 UV/Vis PerkinElmer.

Si legge l'assorbanza del bianco, rappresentato da acqua distillata. I campioni sono stati opportunamente diluiti al fine di garantire che l'assorbanza misurata rientri nel campo di linearità della legge di Lambert-Beer, che correla l'assorbanza alla concentrazione.

Si rende necessario costruire una retta di taratura utilizzando soluzioni preparate con le proteine del siero di latte, Milei 90, a concentrazione nota (0,15, 0,25, 0,5, 1 g/L). Una volta ottenuta la retta di taratura e l'equazione corrispondente, dove Y rappresenta l'assorbanza e X la concentrazione proteica, si legge l'assorbanza del campione dello sciroppo di BSG allo spettrofotometro e si ricava la concentrazione delle proteine del campione utilizzando la retta di taratura. Se il campione è stato diluito prima della misurazione, è necessario tenere conto del fattore di diluizione.

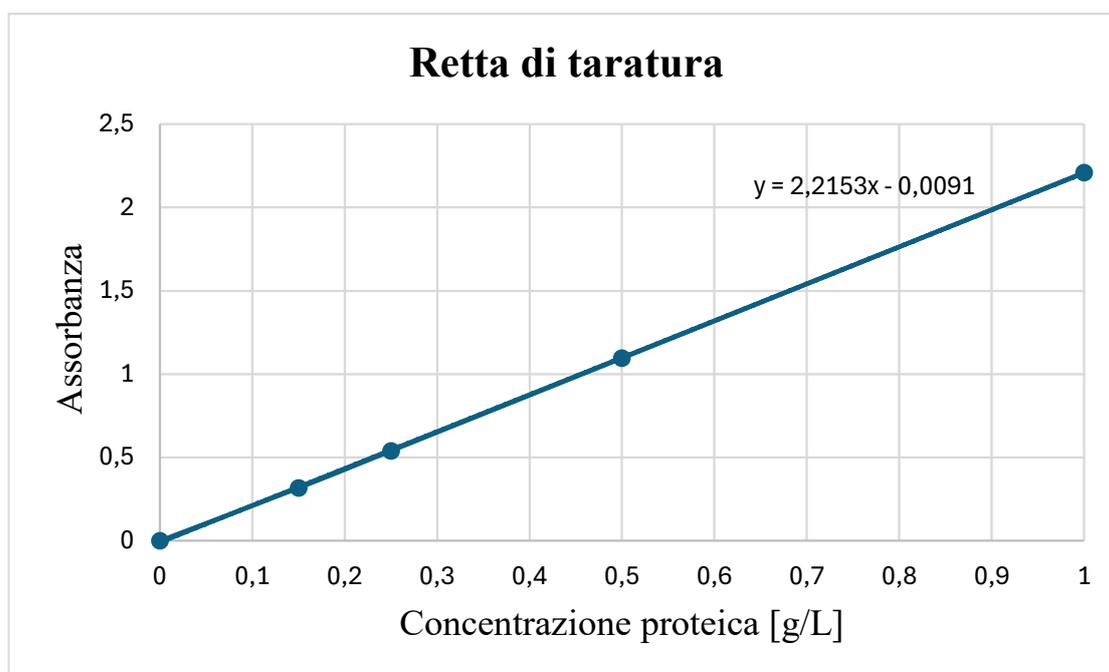


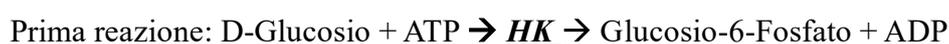
Figura 22: Retta di taratura.

### 2.2.2.3 Determinazione della concentrazione di D(+)glucosio

La concentrazione di D-glucosio nello sciroppo di BSG è stata determinata utilizzando un test enzimatico che si basa sulla determinazione della quantità di NADH, prodotto per riduzione a partire dal NAD e proporzionale alla concentrazione di D-glucosio all'interno del campione, misurata spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 340 nm (kit Enzytec Liquid D-Glucose, (Cod. E8140), prodotto da R-Biopharm AG).

Il kit è dotato di due reagenti: uno contenente Esochinasi HK e l'altro contenente Glucosio-6-Fosfato Deidrogenasi G-6-P DH.

Il protocollo di misura prevede due reazioni enzimatiche consecutive.



L'enzima HK catalizza la conversione del D-Glucosio in Glucosio-6-Fosfato, utilizzando ATP e producendo ADP.



L'enzima G-6-P DH catalizza la conversione del Glucosio-6-Fosfato in Gluconato-6-Fosfato producendo NADH e H<sup>+</sup>.

La concentrazione di D-Glucosio è data dalla seguente formula:

$$C_{D-Glucosio} = \frac{V \cdot MV \cdot \Delta A}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} = 0,744 \cdot \Delta A$$

Dove:

V = volume totale del test, 2600 [mL];

MV = peso molecolare del D-Glucosio, 180,16 [g/mol];

d = cammino ottico, 1 [cm];

v = volume del campione da analizzare, 0,1 [mL];

ε = coefficiente di assorbanza del NADH a 340 nm, 6,3;

ΔA = differenza di assorbanza misurata tra la prima e la seconda reazione.

## 2.3 Coltura di *R. mucilaginosa* su terreno solido

Le fermentazioni condotte nel presente lavoro di Tesi hanno previsto l'utilizzo del lievito carotenogenico *R. mucilaginosa* CBS316.

Il lievito è stato mantenuto su terreno Yeast Malt Agar, YMA, in capsule di Petri aventi diametro di 90 mm.

Si prepara il terreno di coltura solido e circa 20 mL di medium sono versati in ciascuna piastra. La composizione del terreno YMA è la seguente:

- 10 g/L di glucosio
- 5 g/L di peptone
- 3 g/L di estratto di lievito
- 3 g/L di estratto di malto
- 20 g/L di agar

Per preparare il terreno, si inizia miscelando i componenti polverulenti con acqua deionizzata utilizzando un agitatore magnetico modello IKA C-Mag HS. Questa soluzione viene successivamente sterilizzata in autoclave a 121 °C per una durata di 20 minuti.

Dopo la sterilizzazione, il terreno ancora liquido viene trasferito nelle capsule in condizioni di sterilità operando sotto cappa BioHazard, aspirante a flusso laminare, modello Labogene SCANLAF MARS.

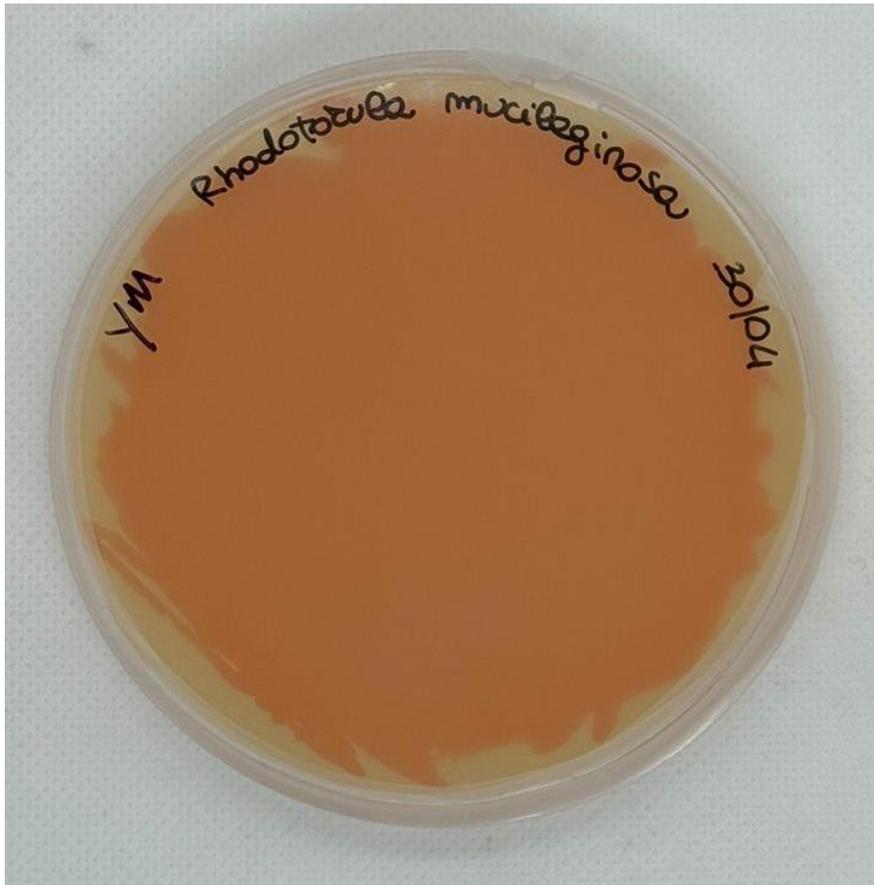
L'agar presente nel terreno permette al composto di gelificare, il microrganismo in questo modo potrà crescere sulla superficie del terreno solidificato.



**Figura 23:** Capsule di Petri durante la preparazione del terreno YMA.

Partendo da una coltura precedente di *R. mucilaginosa* in una piastra di Petri, si aggiungono circa 2mL di acqua sterile sulla superficie della piastra. Successivamente si raschia delicatamente la superficie con un'ansa sterile per sospendere le cellule di lievito. Con una pipetta Pasteur sterile si preleva un'aliquota della sospensione cellulare e la si deposita sul terreno fresco di una nuova capsula di Petri. Utilizzando l'ansa sterile, la sospensione viene distribuita uniformemente su tutta la superficie del terreno.

Infine, le capsule di Petri vengono incubate capovolte in termostato alla temperatura di 25 °C per 48 ore.



**Figura 24:** *Rhodotorula mucilaginosa* cresciuta su terreno YMA in capsula di Petri dopo 24 h dall'inoculo.

## 2.4 Colture di *R. mucilaginosa* in piastre multiwell

Le piastre multiwell sono uno strumento versatile usato in laboratorio per testare o monitorare simultaneamente diversi parametri. Queste piastre presentano un numero variabile di pozzetti organizzati in una griglia rettangolare, ognuno dei quali può contenere una coltura microbica distinta, permettendo così l'esecuzione di numerosi test in parallelo.

Le piastre multiwell hanno un numero di pozzetti che può variare in base alle esigenze specifiche e nella seguente prova si sono utilizzate piastre con 96 pozzetti, costituite da 12 colonne numerate e 8 righe rappresentate dalle prime otto lettere dell'alfabeto.

### 2.4.1 Allestimento della prova multiwell

In questa prova sperimentale *R. mucilaginosa* è stata cresciuta in terreno YM (avente composizione analoga a quella del terreno YMA, fatta eccezione per l'agar che in questo caso è assente), in sciroppo di BSG tal quale (tq) o in sciroppo di BSG, il cui rapporto C/N è stato modificato aggiungendo glucosio o glicerolo, come fonte di carbonio, e cloruro di ammonio, come fonte di azoto.

In particolare, si ha che:

Colonna 1: terreno YM, C/N=8,28;

Colonna 2: sciroppo di BSG, addizionato di 6 g/L di cloruro di ammonio e 2 g/L di glucosio, C/N=9,09;

Colonna 3: sciroppo di BSG addizionato di 6 g/L di cloruro di ammonio e 4 g/L di glucosio, C/N=9,49;

Colonna 4: sciroppo di BSG addizionato di 6 g/L di cloruro di ammonio e 6 g/L di glucosio, C/N=9,9;

Colonna 5: sciroppo di BSG addizionato di 6 g/L di cloruro di ammonio e 8 g/L di glucosio, C/N=10,31;

Colonna 6: sciroppo di BSG addizionato di 6 g/L di cloruro di ammonio e 8 g/L di glicerolo, C/N=10,27;

Colonna 7: sciroppo di BSG tq, C/N=43,35 (SYR);

Colonna 8: sciroppo di BSG addizionato di 8 g/L di cloruro di ammonio e 2 g/L di glucosio, C/N=7,16;

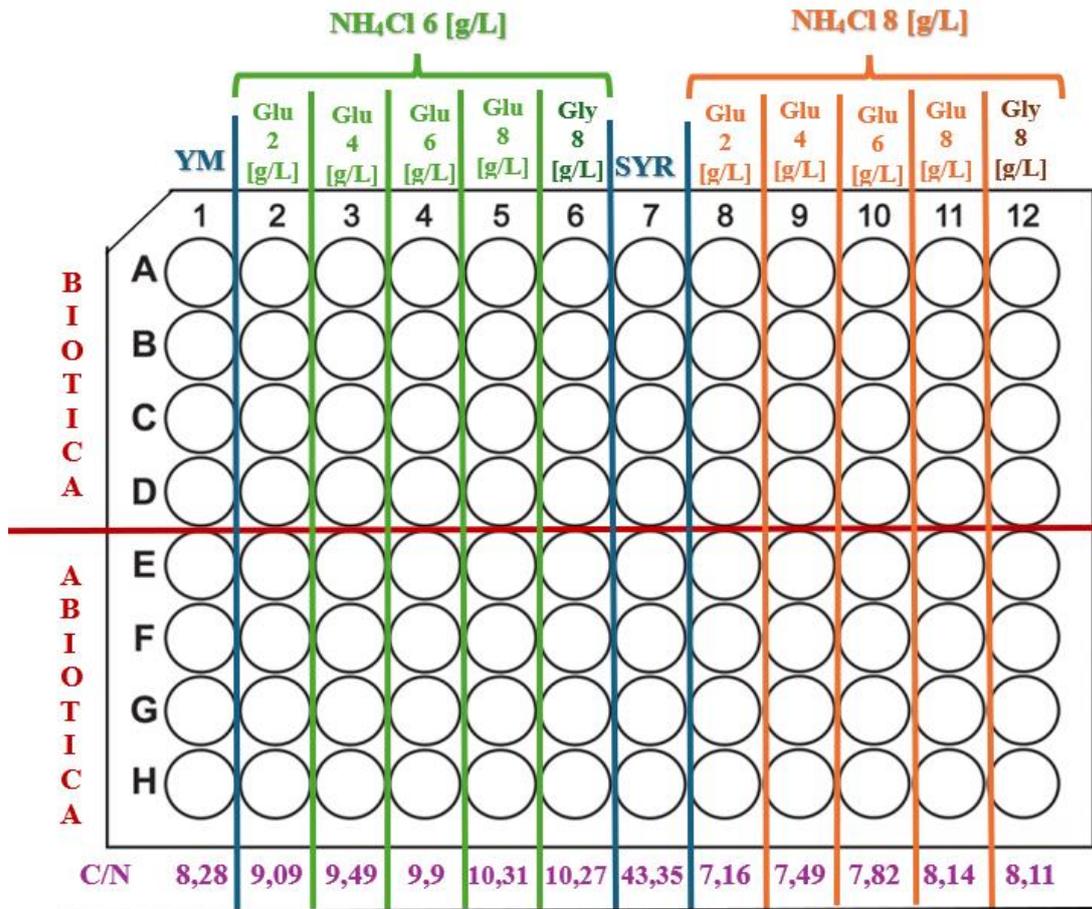
Colonna 9: sciroppo di BSG addizionato di 8 g/L di cloruro di ammonio e 4 g/L di glucosio, C/N=7,49;

Colonna 10: sciroppo di BSG addizionato di 8 g/L di cloruro di ammonio e 6 g/L di glucosio, C/N=7,82;

Colonna 11: sciroppo di BSG addizionato di 8 g/L di cloruro di ammonio e 8 g/L di glucosio, C/N=8,14;

Colonna 12: sciroppo di BSG addizionato di 8 g/L di cloruro di ammonio e 8 g/L di glicerolo, C/N=8,11.

La composizione dei pozzetti della piastra multiwell è schematizzata nella Figura 25. La prova sperimentale è stata realizzata in duplicato.



**Figura 25:** Schema dell'allestimento multipozzetto contenente la fase biotica e abiotica.

Si nota, in Figura 25, come le righe A, B, C e D sono inoculate e costituiscono la fase biotica, mentre le righe E, F, G e H sono costituite da solo terreno di coltura e costituiscono la fase abiotica.

Al fine di condurre la prova, si prepara il terreno YM e lo sciroppo di BSG e si sterilizzano in autoclave a 121 °C per 20 minuti.

Le soluzioni acquose a concentrazioni diverse di glicerolo, glucosio e cloruro di ammonio, utilizzate per modificare il rapporto C/N dello sciroppo, sono state sterilizzate mediante filtrazione utilizzando un filtro sterile da 0,2 µm, modello Sartorius Stedim ministart filter.

Per quanto riguarda l'inoculo, si parte da una piastra di Petri precedentemente allestita con *R. mucilaginosa* cresciuta su YMA per 48 ore. Tramite un'ansa sterile, si raschia delicatamente la superficie della capsula di Petri per raccogliere le cellule. Per standardizzare l'inoculo, sono state effettuate delle diluizioni con terreno YM per i pozzetti contenenti YM, e con sciroppo di BSG per quelli contenenti sciroppo. Queste diluizioni sono state fatte in modo da ottenere un valore di assorbanza a 600 nm (OD<sub>600</sub>) compreso tra 0,8 e 1. In ogni pozzetto sono stati inoculati 30 µL, in un volume culturale totale di 300 µL. Nei pozzetti in cui lo sciroppo di BSG presenta un rapporto C/N modificato, si inseriscono 246 µL di sciroppo e 24 µL della soluzione acquosa concentrata contenente le fonti di C ed N.

Nei pozzetti abiotici l'inoculo è stato sostituito con 30 µL di terreno YM, sciroppo di BSG o con C/N modificato.

Una volta riempiti tutti i pozzetti, le piastre sono state poste in un termostato con agitazione a 150 rpm e temperatura di 25 °C.

Durante la fermentazione si eseguono valutazioni spettrofotometriche con il lettore Thermo Scientific MULTISKAN Sky High per monitorare l'OD<sub>600</sub> e l'OD<sub>490</sub>. Si determina la concentrazione di D(+)-glucosio mediante la procedura descritta nel Paragrafo 2.2.2.3.

Inoltre, nel corso della fermentazione, è stato valutato anche il pH utilizzando il pH-metro Hanna Instruments con elettrodo HALO HI10832.



**Figura 26:** pH-metro Hanna Instruments con elettrodo HALO HI10832.

## 2.5 Coltura di *R. mucilaginosa* in beuta

A seguito dei risultati ottenuti nelle prove in piastre multipozzetto, si è passati alle colture in beuta utilizzando sciroppo di BSG tal quale ed il terreno YM come controllo.

In entrambe sono state utilizzate beute Erlenmeyer da 500 mL dotate di frangiflutti, chiuse con tappo di cotone idrofilo. Ogni beuta è costituita da un volume di medium colturale pari a 200 mL e l'incolo standardizzato è stato addizionato al terreno di coltura. Nel paragrafo 2.5.1 e 2.5.2 si riporteranno le differenze nella coltura a seconda del terreno utilizzato.

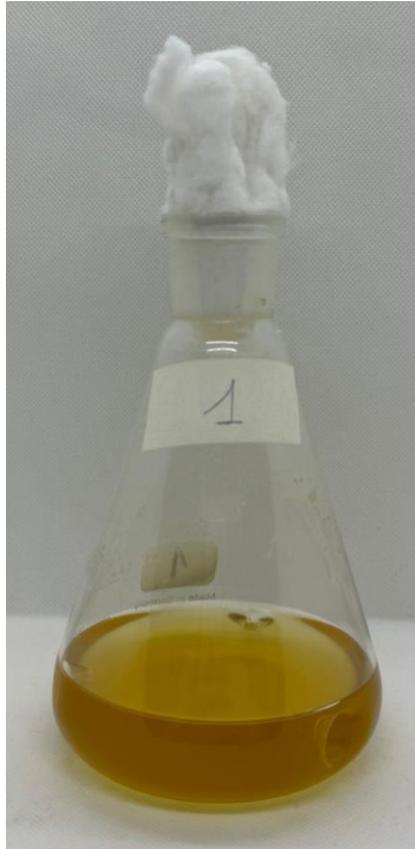
Le colture, successivamente, sono state mantenute in condizioni di agitazione a 150 rpm e ad una temperatura di 25 °C.

Periodicamente dall'inizio delle fermentazioni sono stati prelevati campioni operando in condizioni di sterilità. Su ciascun campione sono stati misurati alcuni parametri: OD<sub>600</sub> proporzionale alla concentrazione di cellule in sospensione, OD<sub>490</sub> misurata per monitorare la produzione di carotenoidi totali, pH, concentrazione di D-Glucosio e concentrazione della biomassa, secondo i tempi specificati nel capitolo dei risultati.

Infine, a tempi prestabiliti di fermentazione è stata recuperata la biomassa contenuta in una o più beute, da utilizzarsi per l'estrazione dei carotenoidi come riportato nella sezione dei risultati nel Paragrafo 3.5 (Prova 2).

### 2.5.1 Coltura su terreno YM

Per condurre la coltura, si è preparato preliminarmente il terreno YM.

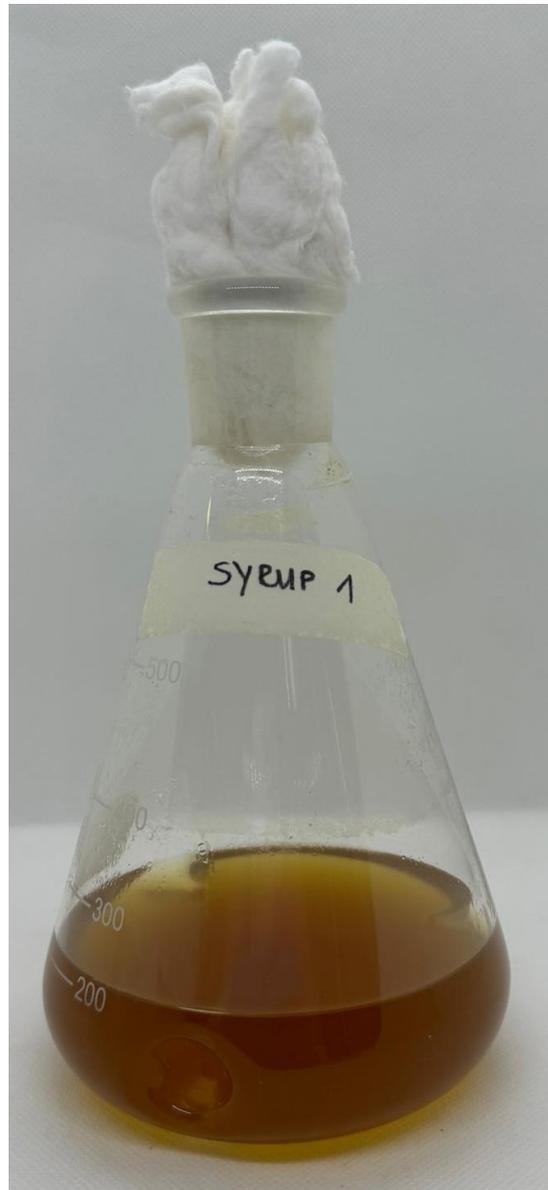


**Figura 27:** Beuta con terreno YM subito dopo la sterilizzazione.

Una volta ottenuto l'inoculo standardizzato, preparato a partire da *R. mucilaginosa* cresciuta su terreno solido YMA a 25°C per 48 ore, esso è trasferito nelle beute Erlenmeyer, precedentemente preparate con 180 mL di medium colturale YM.

### 2.5.2 Coltura su sciroppo di BSG

Si prepara lo sciroppo di BSG e lo si sterilizza in autoclave. Si sottolinea il fatto che lo sciroppo di BSG utilizzato per tutte le prove di fermentazione in beuta e in piastre multiwell apparteneva allo stesso lotto di produzione.



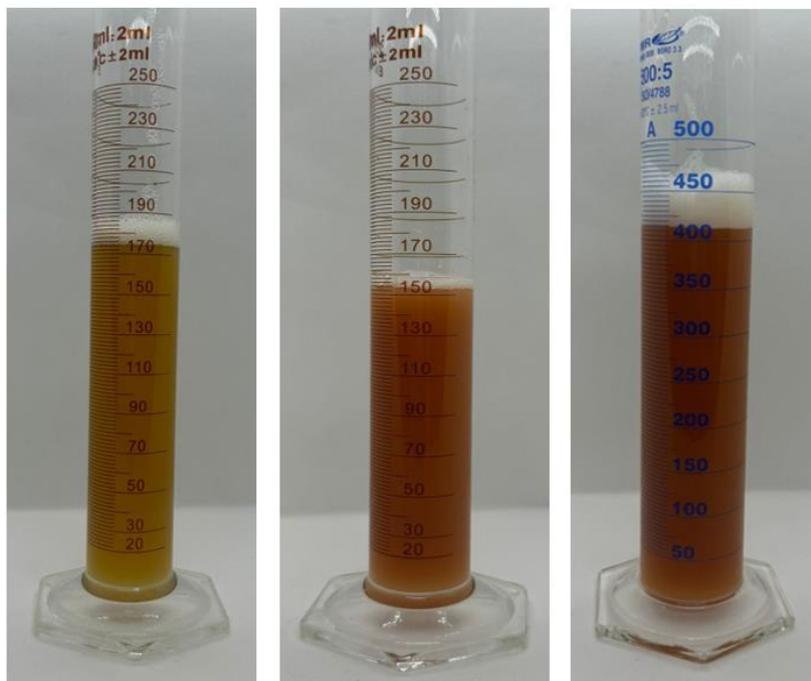
**Figura 28:** Beuta con sciroppo di BSG tq subito dopo la sterilizzazione.

Per condurre la prova sperimentale, si effettua una precoltura in terreno YM inoculato con il lievito precedentemente cresciuto su terreno solido YMA per 48 ore a 25°C. La precoltura è stata incubata per 15 ore fino al raggiungimento della piena fase esponenziale di crescita e successivamente utilizzata per inoculare, tramite inoculo standardizzato, beute contenenti sciroppo di BSG tq.

## 2.6 Recupero della biomassa

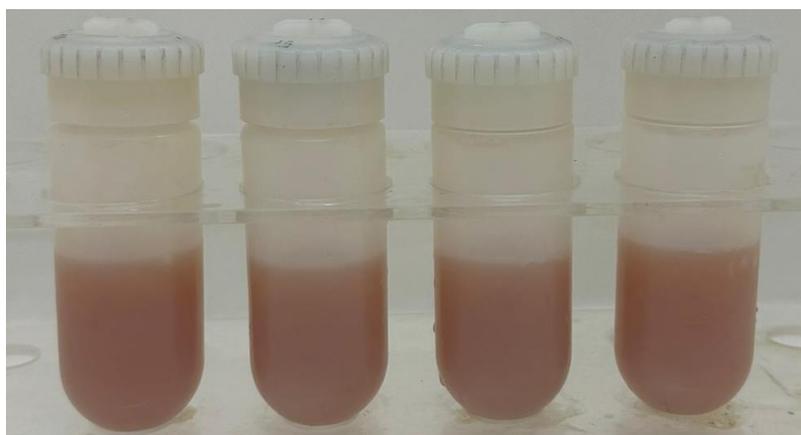
Periodicamente è stata recuperata la biomassa di *R. mucilaginosa* cresciuta in terreno liquido, YM o sciroppo di BSG, in beuta.

Inizialmente la coltura presente nella beuta è versata in un cilindro graduato al fine di misurarne il volume.



**Figura 29:** Coltura di *Rhodotorula mucilaginosa* in beuta cresciuta su sciroppo di BSG.

Successivamente si versa la sospensione cellulare all'interno di provette da centrifuga, ognuno dalla capacità di 80 mL e si procede con una centrifugazione eseguita con una centrifuga Centrikon T-42 K, impostata ad una velocità di 8000 rpm per un periodo di 10 minuti e ad una temperatura di + 4 °C.



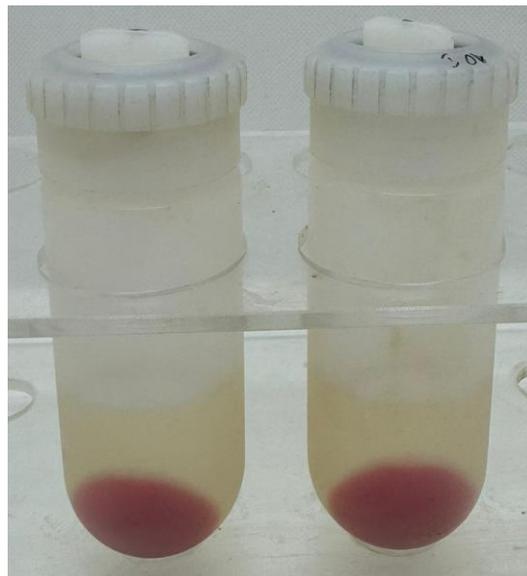
**Figura 30:** Sospensione cellulare versata all'interno di provettoni da centrifuga.

Dopo il ciclo di centrifugazione, il surnatante è stato rimosso ed il pellet è stato lavato con acqua al fine di rimuovere i residui cellulare e del terreno di coltura che potrebbero interferire con la determinazione del peso secco della biomassa.



**Figura 31:** Pellet e surnatante risultante dopo il primo ciclo di centrifugazione.

Il lavaggio è stato effettuato per un totale di tre volte. Man mano che si sono effettuati i lavaggi la biomassa, inizialmente divisa nei vari provettoni, è stata unita. Al termine dell'ultimo ciclo, il surnatante è stato definitivamente rimosso, lasciando solo il pellet di biomassa. Un'aliquota di biomassa, presente in un volume colturale noto, è stata essiccata per determinarne la concentrazione. Come sarà successivamente specificato, inoltre, la biomassa è servita per l'estrazione dei carotenoidi; in questo caso è stata congelata a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 32:** Pellet e surnatante finale ottenuto a seguito dei cicli alternati di centrifuga e lavaggio.

### 2.6.1 Determinazione della concentrazione della biomassa

Dopo aver completato il protocollo di recupero, si determina la concentrazione della biomassa cresciuta su terreno YM e su sciroppo di BSG.

La biomassa umida è stata posta all'interno della termobilancia (OHAUS MB120) a 105 °C. Il peso secco ottenuto è stato utilizzato per quantificare la concentrazione di biomassa prodotta, tenendo conto del volume di terreno di coltura corrispondente.



**Figura 33:** La foto a sinistra mostra la biomassa umida (biomassa ricavata da una fermentazione in sciroppo di BSG tq), la foto a destra è relativa alla biomassa essiccata.

## 2.7 Estrazione dei carotenoidi

Dalla biomassa umida, recuperata dalle fermentazioni condotte in beuta, in terreno YM o sciroppo di BSG tq, è stata effettuata l'estrazione dei carotenoidi applicando la metodologia di Cheng et al. (2016). Successivamente, si è ottimizzato il protocollo di estrazione dei carotenoidi determinando quale metodologia fosse la più efficace per migliorare la resa di estrazione.

### 2.7.1 Valutazione dei carotenoidi totali estratti da biomassa umida

L'estrazione dei carotenoidi basata sul protocollo di Cheng et al. (2016), Metodo 1, prevede di prelevare una quantità di biomassa umida equivalente a 0,1 grammi di biomassa secca e porla in provette Falcon, con capacità di 50 mL ed in materiale plastico. Si aggiungono 5 mL di acetone e 2 mL di dimetilsoffossido (DMSO) all'interno della provetta sotto cappa chimica modello TALASSI MA 95. Per uniformare la sospensione, si vortizza la provetta per 1 minuto e successivamente la si pone in un bagno ad ultrasuoni Elmasonic S 60 H, con frequenza di 60 kHz per 10 minuti. Per separare le fasi, la provetta è stata centrifugata per 10 minuti a 4100 rpm utilizzando una centrifuga Thermo Scientific IEC CL30. Dopo la centrifugazione, per valutare il quantitativo di carotenoidi si è effettuata una determinazione spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 490 nm del surnatante. Il pellet rimanente invece è stato risospeso in una nuova miscela costituita dai due solventi ed il protocollo di estrazione

è stato ripetuto per tre volte, effettuando la valutazione spettrofotometrica del surnatante dopo ogni ciclo di estrazione.

Va ricordato che per le misurazioni spettrofotometriche, è stato usato come bianco una miscela di acetone e DMSO nelle stesse proporzioni che contengono il campione. Le analisi spettrofotometriche sono state eseguite usando cuvette di vetro, adatte al contatto con i solventi impiegati.

Per valutare i carotenoidi totali estratti si utilizza la formula riportata da Cheng et al. (2016):

$$\text{Carotenoidi totali estratti} \left[ \frac{\mu\text{g}}{\text{g}_{\text{lievito}}} \right] = \frac{A_{490} \cdot D \cdot V}{E \cdot W}$$

Dove:

$A_{490}$  = assorbanza alla lunghezza d'onda di 490 nm;

D = fattore di diluizione;

V = volume in mL di solvente usato;

E = coefficiente di estinzione molare dei carotenoidi (0,16);

W = peso secco in grammi del lievito.

Tale Metodo 1 è stato utilizzato per l'estrazione dei carotenoidi come riportato nei capitoli dei risultati 3.5 a differenti tempi di fermentazione (riferimento Prova 2).

## 2.7.2 Ottimizzazione del protocollo di estrazione dei carotenoidi

Vista la possibilità di estrarre i carotenoidi dalla biomassa di *R. mucilaginosa* cresciuta in scioppo di BSG tq, oltre che in YM, si è cercato di migliorare la resa di estrazione apportando delle modifiche alla metodica di estrazione precedentemente utilizzata. A tal proposito, utilizzando sempre biomassa umida equivalente a 0,1 grammi di biomassa secca, il metodo basato sul protocollo di Cheng et al. (2016), metodo 1, descritto nel Paragrafo 2.7.1, è stato confrontato con altri due metodi, 2 e 3, basati sul protocollo proposto da Lopes et al. (2017). Per effettuare questo confronto si crea un unico pool di biomassa ottenuta a tempi di fermentazione differenti, come mostrato nel capitolo dei risultati 3.5.7.

In base a quanto previsto dal metodo 2, si preleva biomassa umida e la si pone in una provetta Falcon dalla capacità di 50 mL. Successivamente nella stessa provetta si aggiungono 2 mL di DMSO e tramite vortex si agita la provetta per 1 minuto e poi la si pone in un bagno termostatico a 55 °C per 15 minuti; l'operazione vortex-bagno viene ripetuta per 4 volte.

Successivamente si effettua la centrifugazione per 10 min a velocità di 4100 rpm. Si preleva il surnatante per analizzarlo allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 490 nm (il bianco, in questo caso, si effettua utilizzando il solo DMSO). Successivamente, si aggiungono al pellet 5 mL di acetone e tramite vortex si agita la provetta per 1 minuto per uniformarla.

Si alternano 4 cicli di bagno ad ultrasuoni con frequenza a 60 kHz per 10 min e vortex. Infine, si effettua la centrifugazione per 10 min a 4100 rpm. Si preleva il surnatante per analizzarlo allo spettrofotometro nuovamente a 490 nm (il bianco si effettua utilizzando acetone).

Il metodo 3 differisce dal metodo 2 in quanto si cambia ogni volta il DMSO nei 4 cicli effettuati nel bagno termostatico a 55 °C per 15 minuti. Di conseguenza si preleva il surnatante di DMSO ogni volta per analizzarlo allo spettrofotometro a 490 nm.

Per determinare il quantitativo di carotenoidi totali estratti in tutti i metodi si utilizza la formula riportata nel Paragrafo 2.7.1.

Le principali fasi dei tre metodi di estrazione utilizzati sono riassunte nella Tabella 2 riportata di seguito che mette in evidenza, in particolare, le differenze e le similitudini.

**Tabella 2:** Metodi di estrazione valutati sottolineando differenze e analogie.

METODO 1	METODO 2	METODO 3
Basato su Cheng et al., 2016	Basato su Lopes et al., 2017	
Biomassa umida corrispondente a 0,1 g di biomassa secca.		
2 mL DMSO + 5 mL acetone 	2 mL DMSO	2 mL DMSO 
	<b>Vortex + Bagno termostatico 55 °C per 15 min.</b> Ripetuto per 4 volte	<b>Vortex + Bagno termostatico 55 °C per 15 min</b>
	Valutazione spettrofotometrica del surnatante a 490 nm.	
		Ripetuto per 4 cicli da: 
	5 mL acetone	
Vortex		
Bagno ad ultrasuoni 60 kHz per 10 min.		
Centrifugazione 4100 rpm per 10 min.		
Valutazione spettrofotometrica del surnatante a 490 nm.		
Ripetuto per 3 cicli da: 		

Nella Tabella 2 le diverse fasi sono evidenziate con colori per distinguerne le caratteristiche principali dei tre metodi descritti.

Le operazioni comuni a tutti i metodi di estrazione sono evidenziate in azzurro. In arancione, si evidenzia che il Metodo 2 e il Metodo 3 si basano sullo stesso riferimento di letteratura.

Le condizioni operative comuni e presenti solo al Metodo 2 e al Metodo 3 sono evidenziate in rosso. Infine, in verde, viene messo in risalto che, nel Metodo 2 e nel Metodo 3, l'acetone viene utilizzato separatamente, a differenza del Metodo 1, che prevede la miscelazione dei due solventi.

## 3. Risultati e discussione

### 3.1 Caratterizzazione di BSG

La caratterizzazione del BSG è stata effettuata in termini di percentuale di umidità, percentuale di solidi totali e pH.

#### 3.1.1 Contenuto di umidità e solidi totali

Si riporta la quantità di umidità del BSG Forna, espressa in percentuale di umidità, insieme al contenuto di solidi totali, anch'esso espresso in percentuale e calcolato come il complemento a cento della percentuale di umidità. I dati vengono mostrati nella Tabella 3 ed i valori sono indicati come media con relativa deviazione standard in quanto le misurazioni sono state effettuate per più campionamenti al fine di ottenere un valore rappresentativo e congruente per l'intero lotto di BSG disponibile.

**Tabella 3:** Percentuale di umidità e solidi totali nel lotto di BSG Forna.

% di umidità	70,41±0,47
% di solidi totali	29,59 ± 0,47

#### 3.1.2 Misurazione del pH

Nella Tabella 4 si riporta il valore di pH dei tre solventi puri utilizzati per la caratterizzazione ed il pH del surnatante ottenuto dalla miscelazione dei solventi con il BSG.

**Tabella 4:** pH dei solventi puri usati e surnatante derivato dalla miscelazione dei solventi con BSG Forna.

Solvente	pH solvente puro	pH surnatante da BSG
H <sub>2</sub> O	6,113 ± 0,10	6,058 ± 0,09
KCl 1M	6,389 ± 0,21	5,893 ± 0,14
CaCl <sub>2</sub> 0,01M	5,524 ± 0,07	5,445 ± 0,05

Dalla Tabella 4 è possibile osservare che il pH misurato nel surnatante, ottenuto dalla miscelazione di solvente puro con BSG, è inferiore in tutti e tre i casi rispetto al pH dei solventi puri. Questo indica che il BSG possiede una moderata acidità.

## 3.2 Sciroppo di BSG

Dopo la caratterizzazione del BSG si è andato a caratterizzare lo sciroppo di BSG ottenuto con estrazione in autoclave (121 °C per 20 minuti). Si analizza il pH, il contenuto proteico, la concentrazione di D-glucosio e la concentrazione di carbonio e azoto.

### 3.2.1 Parametri valutati

Per quanto concerne la concentrazione proteica, valutata con l'uso dello spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 280 nm, si effettua un'analisi anche sul surnatante ottenuto a seguito della prima filtrazione con garza. Successivamente, il surnatante è sottoposto ad un processo di centrifugazione e seconda filtrazione con doppia garza al fine di ottenere lo sciroppo di BSG. Lo sciroppo ottenuto a seguito dell'intero processo si chiamerà sciroppo di BSG tal quale.

**Tabella 5:** Concentrazione proteica e proteine estratte dopo la prima e la seconda filtrazione.

	Concentrazione proteica [g/L]	Proteine estratte [mg <sub>proteine</sub> /g <sub>BSGsecca</sub> ]
Surnatante post prima filtrazione	19,501 ± 4,648	67,246 ± 15,118
Sciroppo di BSG tal quale	18,461 ± 3,765	64,731 ± 13,508

Si osserva che lo sciroppo di BSG tq presenta una concentrazione di proteine pari a 18,461 ± 3,765 g/L. La concentrazione proteica nello sciroppo di BSG tq risulta essere correlata alla composizione del BSG utilizzato (Lynch et al., 2016) e al processo di estrazione utilizzato. Ci si può soffermare sul fatto che dopo l'intera operazione per l'ottenimento di sciroppo di BSG tq, i valori di concentrazione proteica (18,461 ± 3,765 g/L) e la quantità di proteine estratte (64,731 ± 13,508 mg/g), sono diminuiti rispetto ai valori di concentrazione proteica (19,501 ± 4,648 g/L) e proteine estratte (67,246 ± 15,118 mg/g) del surnatante ottenuti a seguito della prima filtrazione con garza. Poiché i risultati sono confrontabili, si è deciso di utilizzare il protocollo di estrazione completo descritto.

In Tabella 6 si riportano i valori degli altri parametri valutati per la caratterizzazione dello sciroppo di BSG tq.

**Tabella 6:** Valori di pH, concentrazione di D-glucosio, concentrazione di carbonio e di azoto, rapporto C/N nello sciroppo di BSG tq.

pH	5,437 ± 0,0764
Concentrazione di D-glucosio [g/L]	5,975 ± 0,025
Concentrazione di Carbonio [g/L]	16,908
Concentrazione di Azoto [g/L]	0,39
Rapporto C/N	43,35

Il valore di pH dello sciroppo di BSG tq mostra una leggera acidità ( $5,437 \pm 0,0764$ ): il valore di pH ha un ruolo centrale nei processi di fermentazione in quanto un pH non ottimale ha un'azione inibente verso i microrganismi utilizzati.

Il D-glucosio all'interno dello sciroppo di BSG tq, pari a  $5,975 \pm 0,025$  g/L, influenza il metabolismo dei microrganismi, in quanto questi usano il nutriente come principale fonte di carbonio.

Infine, le concentrazioni di carbonio (16,908 g/L) e di azoto (0,39 g/L) all'interno dello sciroppo di BSG tq, valutate dal Dipartimento DIATI del Politecnico di Torino, sono parametri importanti da considerare al fine di migliorare l'efficienza del processo biotecnologico. Il rapporto C/N, pari nel nostro studio a 43,35, infatti, come riportato dai vari studi riportati nel Paragrafo 1.5.2, è cruciale per l'ottimizzazione dei processi biotecnologici, in quanto un rapporto adeguato tra carbonio e azoto influenza la crescita della biomassa e la produzione di carotenoidi. In particolare, Catzu (2013) riporta che, con un rapporto C/N pari a 11,3 si ha un incremento della produzione di biomassa e carotenoidi, con l'aumento del C/N a 20, si assiste invece ad una diminuzione della produzione di carotenoidi.

Il terreno YM, usato come controllo, è caratterizzato da un rapporto C/N pari a 8,28 che permette una buona produzione di biomassa e carotenoidi (Dias Rodrigues et al., 2019).

### 3.3 Coltura in piastre multiwell

L'obiettivo principale di questa prova sperimentale è valutare quale sia la migliore formulazione del terreno di coltura per la crescita cellulare di *R. mucilaginosa* e la produzione di carotenoidi. A tal fine è stato variato il rapporto C/N nello sciroppo di BSG tq presente nei singoli pozzetti della piastra multiwell.

#### 3.3.1 Variazione del rapporto C/N

Al fine di variare il rapporto C/N si aggiungono diversi quantitativi di glucosio a due diverse concentrazioni di cloruro di ammonio. Di seguito, nella Tabella 7, si riporta come cambia il rapporto carbonio/azoto andando ad aggiungere allo sciroppo di BSG tq diverse concentrazioni dei due composti.

**Tabella 7:** Rapporti C/N nello sciroppo di BSG.

Concentrazione di glucosio addizionato [g/L]	Rapporto C/N ottenuto con 6 [g/L] di NH <sub>4</sub> Cl	Rapporto C/N ottenuto con 8 [g/L] di NH <sub>4</sub> Cl
2	9,09	7,16
4	9,49	7,49
6	9,9	7,82
8	10,31	8,14

Si riporta in Tabella 8 il rapporto C/N addizionando glicerolo e cloruro di ammonio, quest'ultimo a due differenti concentrazioni, allo sciroppo di BSG tq. In particolare, Catzu, (2013), riporta che il glicerolo rappresenta un'alternativa valida al glucosio e pertanto nella prova si aggiunge glicerolo per verificare se la sua efficacia sia confrontabile con il glucosio.

**Tabella 8:** Rapporti C/N nello sciroppo di BSG.

Concentrazione di glicerolo addizionato [g/L]	Rapporto C/N ottenuto con 6 [g/L] di NH <sub>4</sub> Cl	Rapporto C/N ottenuto con 8 [g/L] di NH <sub>4</sub> Cl
8	10,27	8,11

### 3.3.2 Parametri determinati

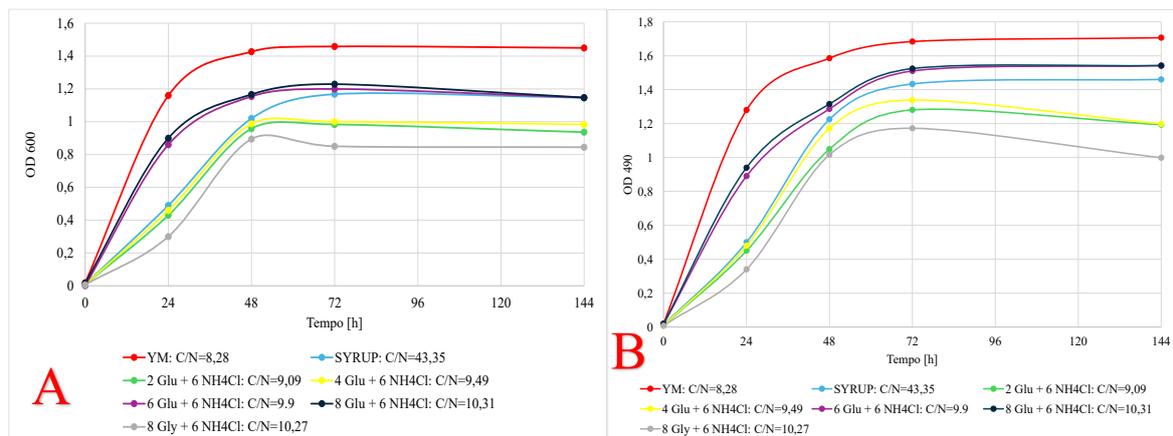
Nel corso della prova sperimentale si monitorano i valori di OD<sub>600</sub>, OD<sub>490</sub> ed il valore di pH in corrispondenza del tempo t<sub>0</sub>, ovvero circa 1 ora dall'inizio della fermentazione, e dopo 24, 48, 72 e 144 ore di fermentazione.

La concentrazione di D-glucosio è valutata a tempi di fermentazione crescenti solo nello sciroppo di BSG tq, nel terreno YM e nei terreni con C/N modificato che hanno mostrato valori di OD<sub>600</sub> e OD<sub>490</sub> superiori a quelli ottenuti con lo sciroppo di BSG tal quale. Nonostante l'aggiunta di 8 g/L di cloruro di ammonio abbia dato valori di OD<sub>600</sub> e OD<sub>490</sub> inferiori rispetto allo sciroppo di BSG tq è stato valutato il consumo di D-glucosio anche nei terreni con il più basso valore del rapporto C/N.

#### 3.3.2.1 OD<sub>600</sub> e di OD<sub>490</sub>

Al fine di facilitare l'interpretazione visiva delle diverse misurazioni di OD<sub>600</sub> e di OD<sub>490</sub> e semplificare il confronto, si è deciso di riportare i risultati relativi al terreno di coltura con l'aggiunta di 6 g/L e 8 g/L di cloruro di ammonio in due grafici distinti.

Di seguito, nella Figura 34 si riportano i dati dello sciroppo di BSG addizionato con 6 g/L di cloruro di ammonio. Si includono anche i risultati relativi allo sciroppo di BSG tal quale e coltura con YM, utilizzato come controllo.



**Figura 34:** Valori di OD<sub>600</sub> (A) e OD<sub>490</sub> (B) al tempo t<sub>0</sub>, t<sub>24</sub>, t<sub>48</sub>, t<sub>72</sub> e t<sub>144</sub> in terreno YM, sciroppo di BSG tq e addizionato con glucosio o glicerolo e cloruro di ammonio 6 [g/L].

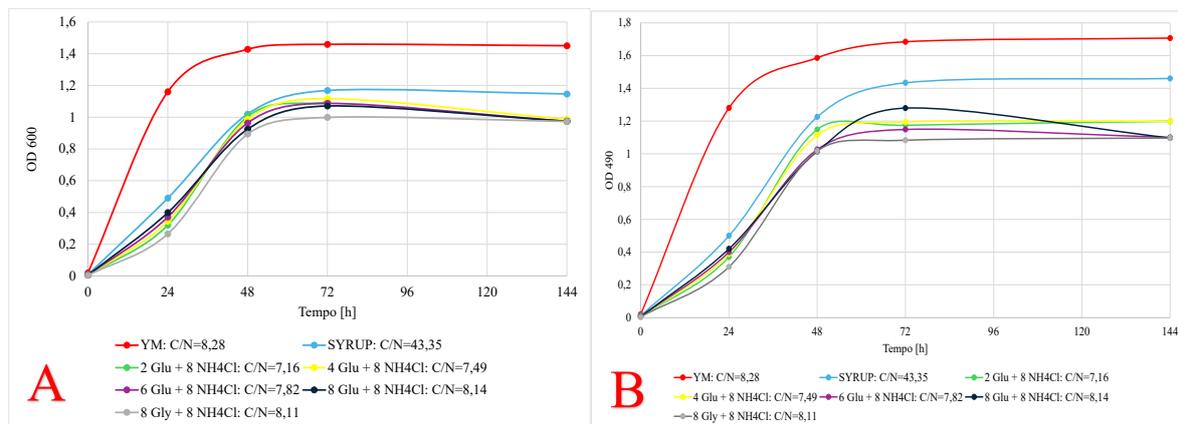
Analizzando i valori di OD<sub>600</sub>, in Figura 34 A, emerge che il terreno YM (curva rossa), rapporto C/N 8,28, usato come controllo, ha favorito una crescita significativamente superiore rispetto agli altri terreni di coltura. Si nota infatti come il valore di OD<sub>600</sub> in YM, da 24 ore di fermentazione (1,1604 ± 0,0021) e fino alle 144 ore (1,4503 ± 0,0030) sia superiore a tutti gli altri casi.

La curva gialla (C/N=9,49) e la curva verde (C/N=9,09) non mostrano un incremento dei valori di OD<sub>600</sub> rispetto allo sciroppo di BSG tal quale. Se andiamo a considerare la curva grigia con C/N=10,27, i valori di OD<sub>600</sub> sono ancora meno elevati rispetto allo sciroppo di BSG tal quale: a 48 ore di fermentazione si ha il massimo valore di OD<sub>600</sub> pari a 0,8945 ± 0,0015, mentre nello sciroppo di BSG tq a 48 ore di fermentazione si ha un valore di OD<sub>600</sub> pari a 1,0196 ± 0,0008.

Dati di maggiore interesse emergono, invece, dall'analisi della curva viola con C/N pari a 9,9 e ancor di più se consideriamo la curva blu con C/N pari a 10,31: in queste due formulazioni, si osserva un incremento nei valori di OD<sub>600</sub> rispetto allo sciroppo di BSG tal quale fino alle 48 ore. A 48 ore di fermentazione, C/N pari a 9,9 ha valore di OD<sub>600</sub> pari a  $1,1538 \pm 0,0005$ , C/N=10,31 ha valore di OD<sub>600</sub> pari a  $1,1663 \pm 0,0017$ , mentre lo sciroppo di BSG tq ha OD<sub>600</sub> di  $1,0196 \pm 0,0008$ . Successivamente i valori di OD<sub>600</sub> sono molto simili a quelli dello sciroppo di BSG tq (ad esempio a circa 144 ore C/N=9,9 e 10,31 hanno un OD<sub>600</sub> di  $1,1465 \pm 0,0014$  e  $1,1470 \pm 0,0021$  rispettivamente, mentre lo sciroppo di BSG tal quale ha OD<sub>600</sub> di  $1,1461 \pm 0,0023$ ).

Dall'analisi dei valori di OD<sub>490</sub>, in Figura 34 B, si osserva che con C/N pari a 9,9 (curva viola) e con C/N pari a 10,31 (curva blu) si osserva un incremento dei valori di OD<sub>490</sub> rispetto allo sciroppo di BSG tq, come si era già visto con i valori di OD<sub>600</sub>. Il miglioramento si ha fino alla fine della prova, infatti i valori di OD<sub>490</sub> a 144 ore di fermentazione sono  $1,5416 \pm 0,0025$  per C/N=9,9 e  $1,5421 \pm 0,0012$  per C/N=10,31, lo sciroppo di BSG tq ha un valore di OD<sub>490</sub> a 144 ore di fermentazione pari a  $1,4605 \pm 0,0007$ . Tuttavia, questa differenza è minima, di conseguenza non c'è un significativo miglioramento apportato dalla modifica del rapporto C/N nella produzione di carotenoidi. Le altre curve mostrano tutti risultati peggiori rispetto allo sciroppo di BSG tq.

Dai risultati riportati si nota che l'andamento dei valori di OD<sub>600</sub> e OD<sub>490</sub> per C/N= 9,9 e C/N=10,31 sono simili, leggermente superiori per quest'ultimo.



**Figura 35:** Valori di OD<sub>600</sub> (A) e OD<sub>490</sub> (B) al tempo t<sub>0</sub>, t<sub>24</sub>, t<sub>48</sub>, t<sub>72</sub> e t<sub>144</sub> in terreno YM, sciroppo di BSG tq e addizionato con glucosio o glicerolo e cloruro di ammonio 8 [g/L].

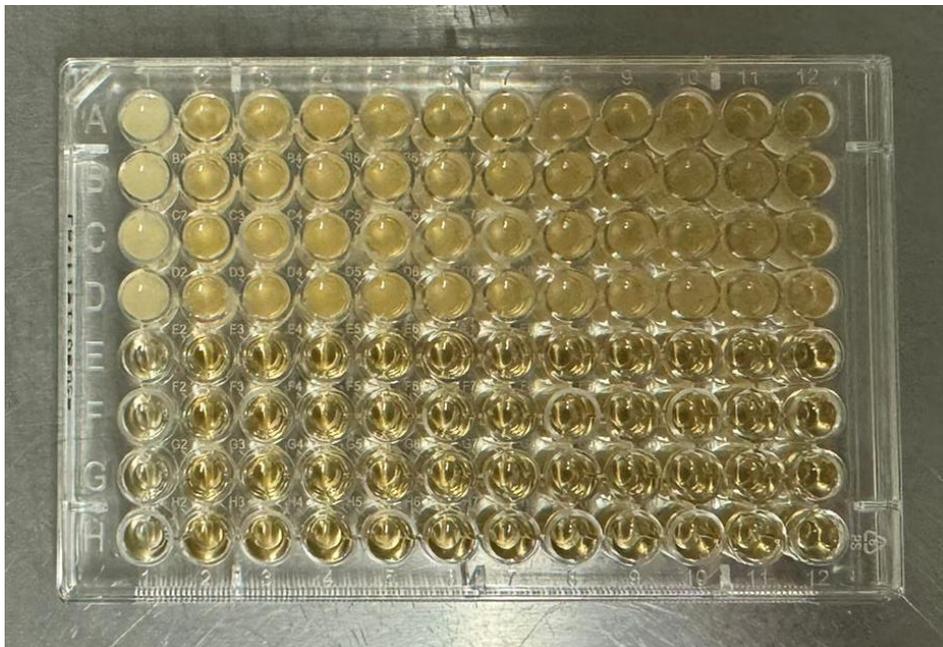
Analizzando sia i valori di OD<sub>600</sub>, in Figura 35 A, che i valori di OD<sub>490</sub>, in Figura 35 B, emerge che l'aggiunta di 8 g/L di cloruro di ammonio e diverse concentrazioni di glucosio o glicerolo, corrispondenti ad un rapporto C/N compreso tra 7,16 e 8,14, non porta ad un miglioramento rispetto all'utilizzo dello sciroppo di BSG tq.

In particolare, dalla Figura 35 A, si nota che a 72 ore di fermentazione, lo sciroppo di BSG tq con C/N pari a 43,35 (curva celeste) ha un valore di OD<sub>600</sub> pari a  $1,1679 \pm 0,0039$ , C/N=7,16 (curva verde) ha un valore di OD<sub>600</sub> pari a  $1,0966 \pm 0,0006$ , in C/N=7,49 (curva gialla) si ha il valore più alto dei terreni con C/N modificato con l'aggiunta di 8 g/L di cloruro di ammonio pari a  $1,1164 \pm 0,0022$ , in C/N=7,82 (curva viola) il valore di OD<sub>600</sub> è pari a  $1,0870 \pm 0,0001$ , in C/N=8,14 (curva blu) si ha  $1,0709 \pm 0,0019$ , in C/N=8,11 (curva grigia)  $0,9988 \pm 0,0042$ .

Dalla Figura 35 B, emerge che i valori di OD<sub>490</sub> a 72 ore di fermentazione per lo sciroppo di BSG tq con C/N pari a 43,35 (curva celeste) è pari a  $1,4338 \pm 0,0064$ , in C/N=7,16 (curva verde) è pari a  $1,1743 \pm 0,0033$ , in C/N=7,49 (curva gialla) si ha un valore di  $1,1945 \pm 0,0002$ , in C/N=7,82 (curva viola) si ha  $1,1490 \pm 0,0018$ , in C/N=8,14 (curva blu) si ha il valore più alto pari a  $1,2797 \pm 0,0037$ , in C/N=8,11 (curva grigia) si ha  $1,0832 \pm 0,0004$ .

Se si considerano le curve del glicerolo (curve grigie) con un rapporto C/N di 10,27 in Figura 34 e con C/N pari a 8,11 in Figura 35, si nota come i valori di OD<sub>600</sub> e OD<sub>490</sub> siano i più bassi di qualsiasi altro caso testato nel corso di tutta la prova. Nonostante il glicerolo possa essere utilizzato dai lieviti come fonte di carbonio (Catzu 2013), nelle condizioni testate non risulta essere efficace per promuovere la crescita e la produzione di carotenoidi.

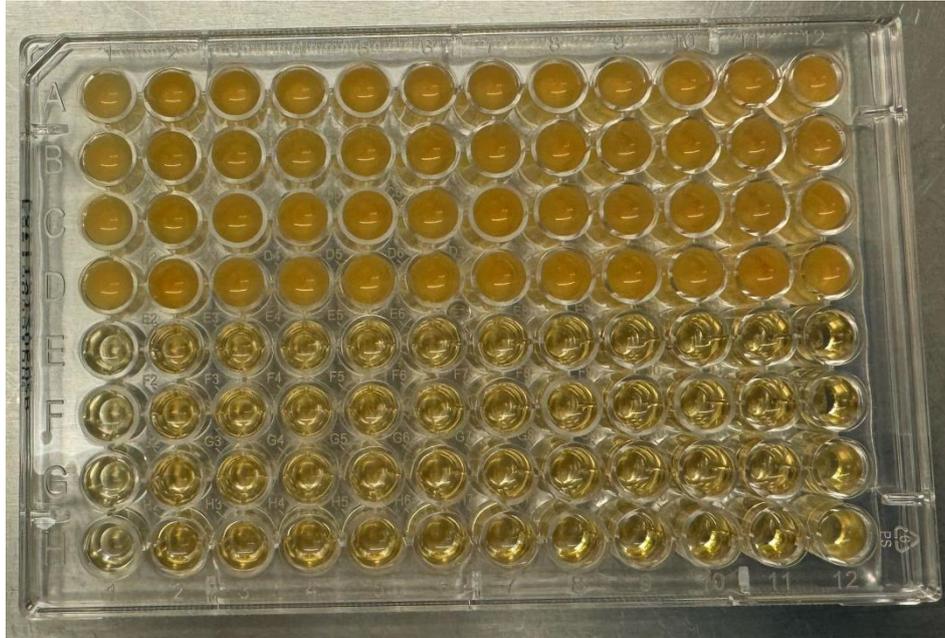
Si riporta la variazione cromatica a 24 e 72 ore di fermentazione nelle piastre multiwell.



**Figura 36:** Differente colorazione nei vari pozzetti appartenenti alla fase biotica e abiotica dopo 24 ore di fermentazione.

Come si nota dalla Figura 36, già a partire dalle prime 24 ore di fermentazione, è possibile osservare una differente colorazione nei vari pozzetti. In particolare, i pozzetti in alto, rappresentativi della fase biotica, mostrano una torbidità significativamente maggiore rispetto a quelli della fase abiotica dovuta alla proliferazione microbica e alla produzione dei carotenoidi; tuttavia, la loro presenza è ancora minima e per tale ragione non si ha ancora una colorazione aranciata.

Si può fare un'ulteriore considerazione per quanto riguarda la prima colonna costituita da terreno YM che ha una colorazione più ambrata rispetto alle altre colonne contenenti sciroppo di BSG tal quale o addizionato in quanto lo sciroppo è caratterizzato da una colorazione più scura.

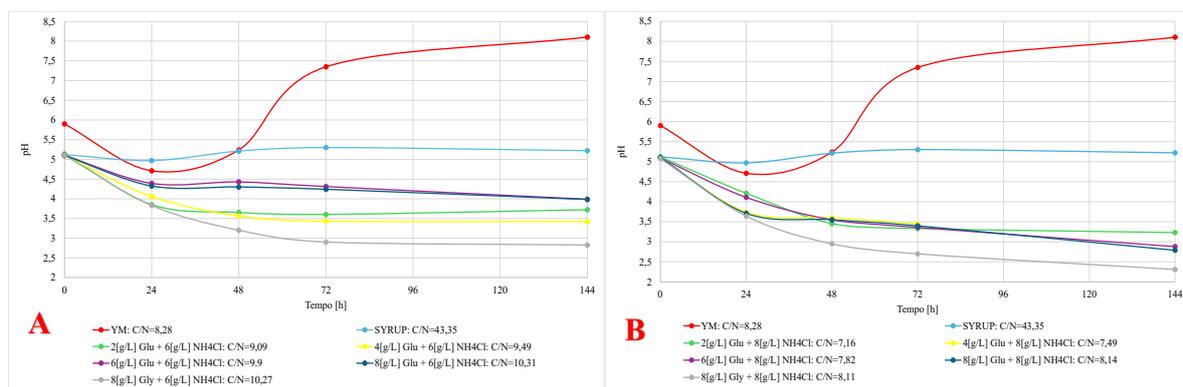


**Figura 37:** Differente colorazione nei pozzetti appartenenti alla fase biotica e abiotica dopo 72 ore di fermentazione.

Nella Figura 37 si nota che *R. mucilaginosa* è cresciuto in tutti i pozzetti biotici. A differenza delle 24 ore, nei pozzetti biotici si ha una colorazione arancione più intensa correlata al quantitativo di carotenoidi prodotti.

### 3.3.2.2 pH

A questo punto vengono presentati i valori di pH relativi alle diverse combinazioni C/N.



**Figura 38:** Valori di pH al tempo  $t_0$ ,  $t_{24}$ ,  $t_{48}$ ,  $t_{72}$  e  $t_{144}$  in: (A) terreno YM, sciroppo di BSG tq e addizionato con cloruro di ammonio 6 [g/L] e (B) terreno YM, sciroppo di BSG tq e addizionato con cloruro di ammonio 8 [g/L].

Il pH dei terreni con C/N modificato mostrano valori di pH significativamente più bassi rispetto al terreno YM e sciroppo di BSG tq.

Dalla Figura 38 A, si nota che per le combinazioni con C/N di 9,9 e 10,31 (curva viola e curva blu rispettivamente) i valori di pH risultano intermedi rispetto a quelli dello sciroppo di BSG tq (curva celeste) che parte da un valore di pH iniziale medio di 5,124 e finendo a 144 ore con un valor medio di pH pari a 5,22, e degli altri terreni addizionati che invece hanno valori più bassi infatti si nota come per questi terreni, seppur si parta da un valore iniziale di circa 5, a 144 ore di fermentazione il pH arriva a un valor medio di 3,721 per C/N=9,09 (curva verde), 3,42 per C/N= 9,49 (curva gialla) e 2,822 per C/N=10,27 (curva grigia). Per quanto riguarda il pH delle colture con C/N di 9,9 e 10,31 (curva viola e blu rispettivamente), si parte da un valore di circa 5,1 in entrambi i casi, e si arriva a fine fermentazione con un valore di pH di circa 3,99.

Dai dati riportati in Figura 38 B, si nota che con C/N compreso tra 7,16 e 8,14 si ha un abbassamento significativo del pH. A 144 ore di fermentazione infatti, tutte le combinazioni, seppur partendo da un pH iniziale di circa 5,1, hanno un valore medio di pH di 3,231 (curva verde con C/N=7,16), 2,92 (curva gialla C/N=7,49), 2,899 (curva viola C/N=7,82), 2,786 (curva blu C/N=8,14) e 2,31 (curva grigia C/N=8,11).

Per una maggiore precisione si riportano i valori di pH, espressi come medie e relative deviazioni standard, per le combinazioni di C/N ottenute con l'aggiunta di 6 o 8 g/L di cloruro di ammonio.

**Tabella 9:** Valori di pH al tempo  $t_0$ ,  $t_{24}$ ,  $t_{48}$ ,  $t_{72}$  e  $t_{144}$  in terreno YM, sciroppo di BSG tq e addizionato con cloruro di ammonio 6 [g/L].

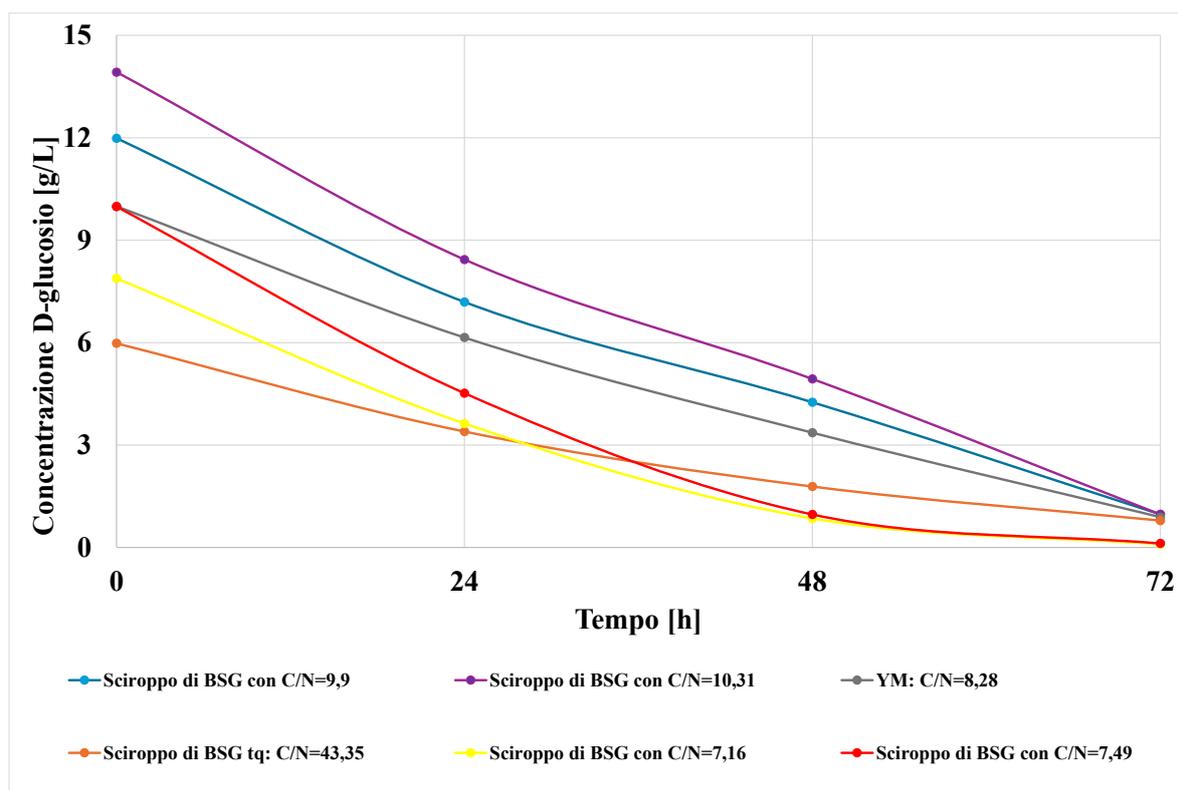
Tempo [h]	YM: C/N=8,28	SYRUP: C/N=43,35	2[g/L] Glu + 6[g/L] NH <sub>4</sub> Cl: C/N=9,09	4[g/L] Glu + 6[g/L] NH <sub>4</sub> Cl: C/N=9,49	6[g/L] Glu + 6[g/L] NH <sub>4</sub> Cl: C/N=9,9	8[g/L] Glu + 6[g/L] NH <sub>4</sub> Cl: C/N=10,31	8[g/L] Gly + 6[g/L] NH <sub>4</sub> Cl: C/N=10,27
0	5,901 ± 0,001	5,124 ± 0,03	5,145 ± 0,005	5,097 ± 0,023	5,10 ± 0,01	5,09 ± 0,01	5,0 ± 0,02
24	4,713 ± 0,013	4,977 ± 0,02	3,856 ± 0,04	4,059 ± 0,001	4,394 ± 0,006	4,328 ± 0,002	3,837 ± 0,003
48	5,248 ± 0,008	5,210 ± 0,01	3,647 ± 0,03	3,564 ± 0,006	4,425 ± 0,025	4,291 ± 0,009	3,29 ± 0,001
72	7,354 ± 0,004	5,305 ± 0,025	3,580 ± 0,02	3,430 ± 0,01	4,317 ± 0,013	4,234 ± 0,026	2,90 ± 0,01
144	8,115 ± 0,005	5,220 ± 0,02	3,721 ± 0,001	3,420 ± 0,02	3,998 ± 0,002	3,987 ± 0,003	2,822 ± 0,008

**Tabella 10:** Valori di pH al tempo  $t_0$ ,  $t_{24}$ ,  $t_{48}$ ,  $t_{72}$  e  $t_{144}$  in terreno YM, sciroppo di BSG tq e addizionato con cloruro di ammonio 8 [g/L].

Tempo [h]	YM: C/N=8,28	SYRUP: C/N=43,35	2[g/L] Glu + 8[g/L] NH <sub>4</sub> Cl: C/N=7,16	4[g/L] Glu + 8[g/L] NH <sub>4</sub> Cl: C/N=7,49	6[g/L] Glu + 8[g/L] NH <sub>4</sub> Cl: C/N=7,82	8[g/L] Glu + 8[g/L] NH <sub>4</sub> Cl: C/N=8,14	8[g/L] Gly + 8[g/L] NH <sub>4</sub> Cl: C/N=8,11
0	5,901 ± 0,001	5,124 ± 0,03	5,12 ± 0,01	5,09 ± 0,02	5,09 ± 0,03	5,10 ± 0,01	5,088 ± 0,012
24	4,713 ± 0,013	4,977 ± 0,02	4,215 ± 0,005	3,742 ± 0,008	4,11 ± 0,009	3,716 ± 0,024	3,643 ± 0,007
48	5,248 ± 0,008	5,210 ± 0,01	3,458 ± 0,012	3,60 ± 0,01	3,554 ± 0,006	3,559 ± 0,011	2,959 ± 0,031
72	7,354 ± 0,004	5,305 ± 0,025	3,343 ± 0,007	3,45 ± 0,02	3,365 ± 0,015	3,431 ± 0,009	2,708 ± 0,042
144	8,115 ± 0,005	5,220 ± 0,02	3,231 ± 0,009	2,92 ± 0,04	2,899 ± 0,018	2,786 ± 0,004	2,31 ± 0,009

### 3.3.2.3 D-glucosio

Successivamente è stata analizzata la concentrazione di D-Glucosio durante il corso della fermentazione a 24, 48 e 72 ore, per il terreno YM, per lo sciroppo di BSG tq e per le combinazioni con C/N pari a 9,9 e 10,31 (terreni addizionati che hanno mostrato valori di OD<sub>600</sub> e OD<sub>490</sub> superiori a quelli ottenuti con lo sciroppo di BSG tal quale) e per le combinazioni C/N pari a 7,16 e 7,49 (ossia quei terreni addizionati con 8 g/L di cloruro di ammonio che, pur non mostrando valori di OD<sub>600</sub> e OD<sub>490</sub> superiori a quelli ottenuti con lo sciroppo di BSG tal quale, sono le combinazioni migliori delle altre addizionate con questa concentrazione di cloruro di ammonio).



**Figura 39:** Andamento del D-Glucosio nel terreno YM, nello sciroppo di BSG tq e per i terreni aventi C/N pari a 9.9, 10.31, 7.16 e 7.49.

Si riportano i valori di D-glucosio in Tabella 11, espressi come media e relativa deviazione standard.

**Tabella 11:** Valori di concentrazione del D-glucosio in YM, in sciroppo di BSG tq, e per i terreni avente C/N pari a 9,9, 10,31, 7,16, 7,49.

TEMPO [h]	YM: C/N=8,28	Sciroppo di BSG tq: C/N=43,35	Sciroppo di BSG con C/N=9,9	Sciroppo di BSG con C/N=10,31	Sciroppo di BSG con C/N=7,16	Sciroppo di BSG con C/N=7,49
0	9,991 ± 0,009	5,978 ± 0,022	11,983 ± 0,0371	13,928 ± 0,07166	7,881 ± 0,0423	9,983 ± 0,0821
24	6,147 ± 0,0582	3,396 ± 0,0323	7,188 ± 0,0954	8,433 ± 0,019	3,634 ± 0,0128	4,523 ± 0,0321
48	3,364 ± 0,0315	1,785 ± 0,0657	4,251 ± 0,0114	4,936 ± 0,0441	0,852 ± 0,037	0,970 ± 0,004
72	0,895 ± 0,0497	0,789 ± 0,0274	0,978 ± 0,0678	0,971 ± 0,0852	0,093 ± 0,0031	0,127 ± 0,0967

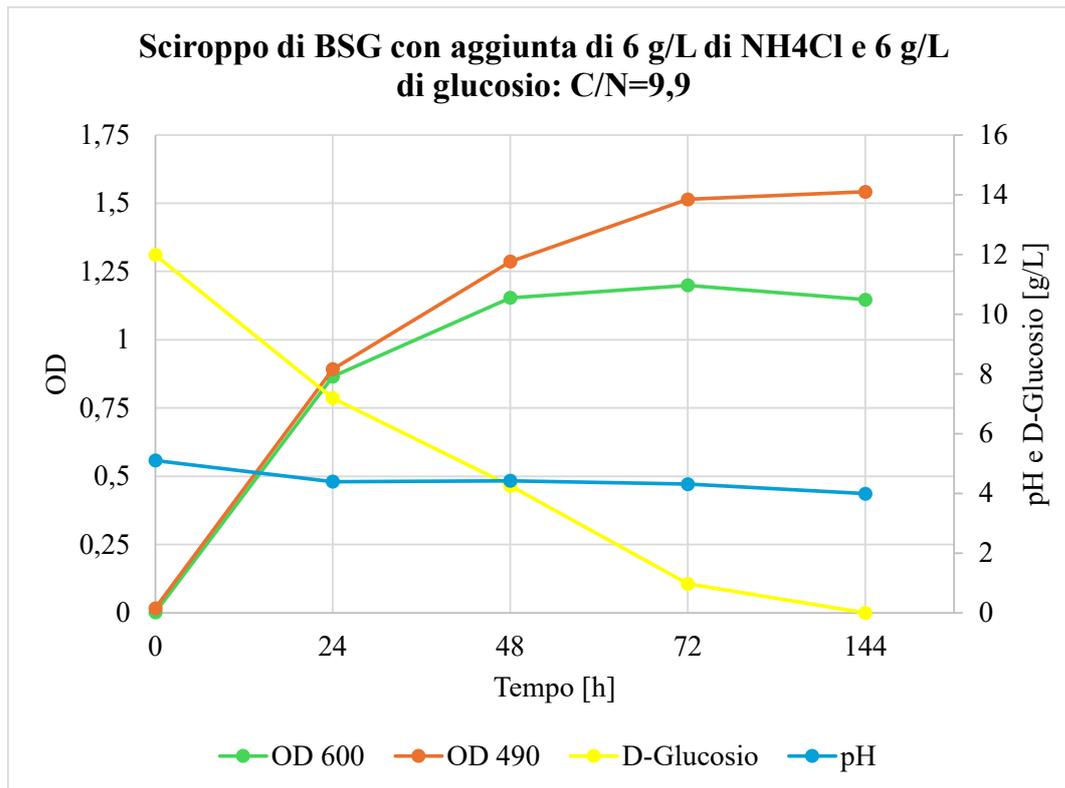
Si nota che la concentrazione del D-glucosio nel corso della fermentazione diminuisce progressivamente in tutti i casi considerati.

Nel caso di C/N=9,9 (curva blu) e C/N=10,31 (curva viola) si nota un andamento che rispecchia quello del terreno YM (curva grigia). A 48 ore di incubazione, ad esempio, la concentrazione di D-glucosio è pari a 3,364 ± 0,0315 g/L per YM (curva grigia), 4,251 ± 0,0114 g/L per C/N=9,9 (curva blu) e 4,936 ± 0,0441 g/L per CN=10,31 (curva viola).

Per quanto concerne C/N=7,16 (curva gialla) e C/N=7,49 (curva rossa), si nota che già dopo 48 ore di fermentazione il livello di glucosio è molto basso (0,852 ± 0,037 g/L per C/N=7,16 e 0,970 ± 0,004 g/L per C/N=7,49).

### 3.3.2.4 Approfondimento nei casi con C/N=9,9 e C/N=10,31

Nella Figura 40 e nella Figura 41 si riportano i parametri monitorati per le due combinazioni che mostrano un incremento dei valori di OD<sub>600</sub> e OD<sub>490</sub> (C/N pari a 9,9 e 10,31) rispetto allo sciroppo di BSG tq.

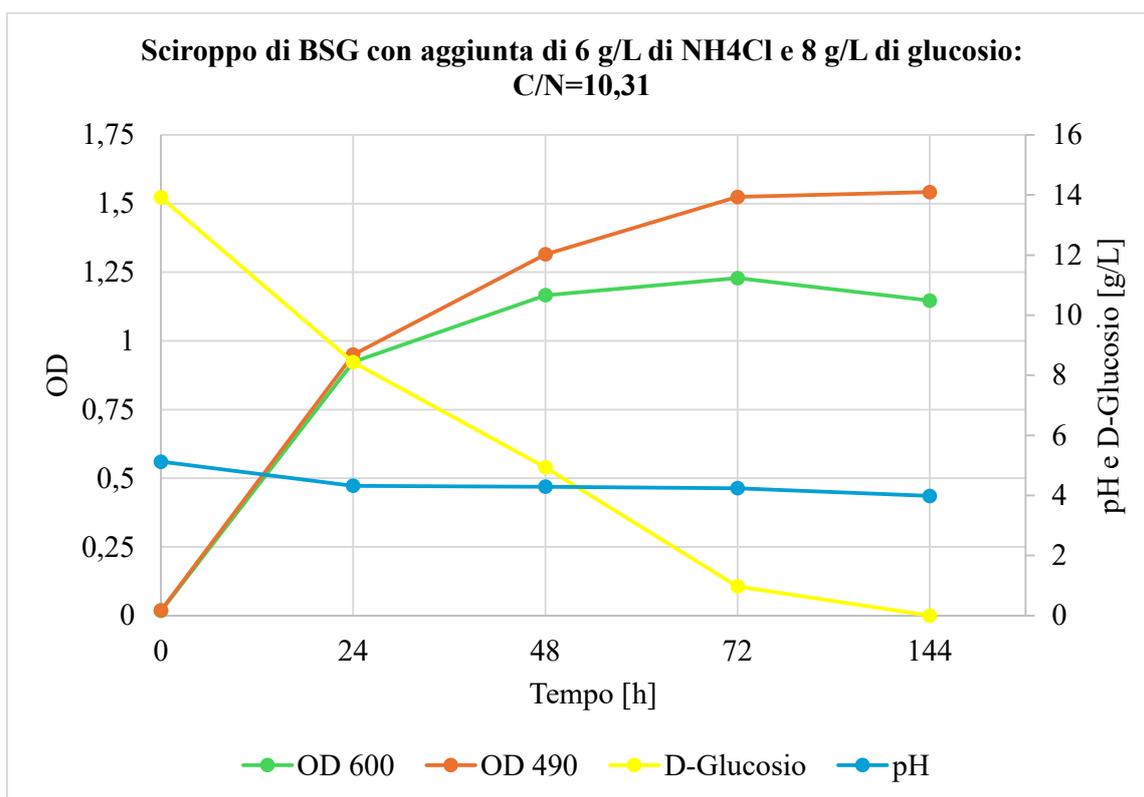


**Figura 40:** Andamento dei parametri di OD<sub>600</sub>, OD<sub>490</sub>, pH e D-glucosio nello sciropo di BSG aggiunto di 6 [g/L] di cloruro di ammonio e 6 [g/L] di glucosio. C/N= 9,9.

Si osserva che il valore di OD<sub>600</sub> aumenta nelle prime 24 ore passando da un valore di  $0,0014 \pm 0,001$  a  $0,8654 \pm 0,0054$ , per poi crescere ulteriormente fino ad un massimo di  $1,1992 \pm 0,0031$  dopo 72 ore di fermentazione. Successivamente, il valore di OD<sub>600</sub> si abbassa leggermente a 144 ore con un valore di  $1,1465 \pm 0,0014$ . Per quanto concerne OD<sub>490</sub>, raggiunge i massimi valori in corrispondenza delle 144 ore ( $1,5416 \pm 0,0025$ ).

Per quanto riguarda il D-glucosio, si nota una diminuzione della sua concentrazione nelle prime 48 ore, passando da un valore medio iniziale di  $11,983 \pm 0,0371$  g/L a  $4,251 \pm 0,0114$  g/L. Dopo 72 ore, il D-glucosio è praticamente esaurito ( $0,978 \pm 0,0678$  g/L).

Il pH parte da un valore medio iniziale di  $5,10 \pm 0,01$  e successivamente diminuisce fino ad arrivare ad un valore di circa  $3,998 \pm 0,002$  dopo 144 ore di fermentazione.



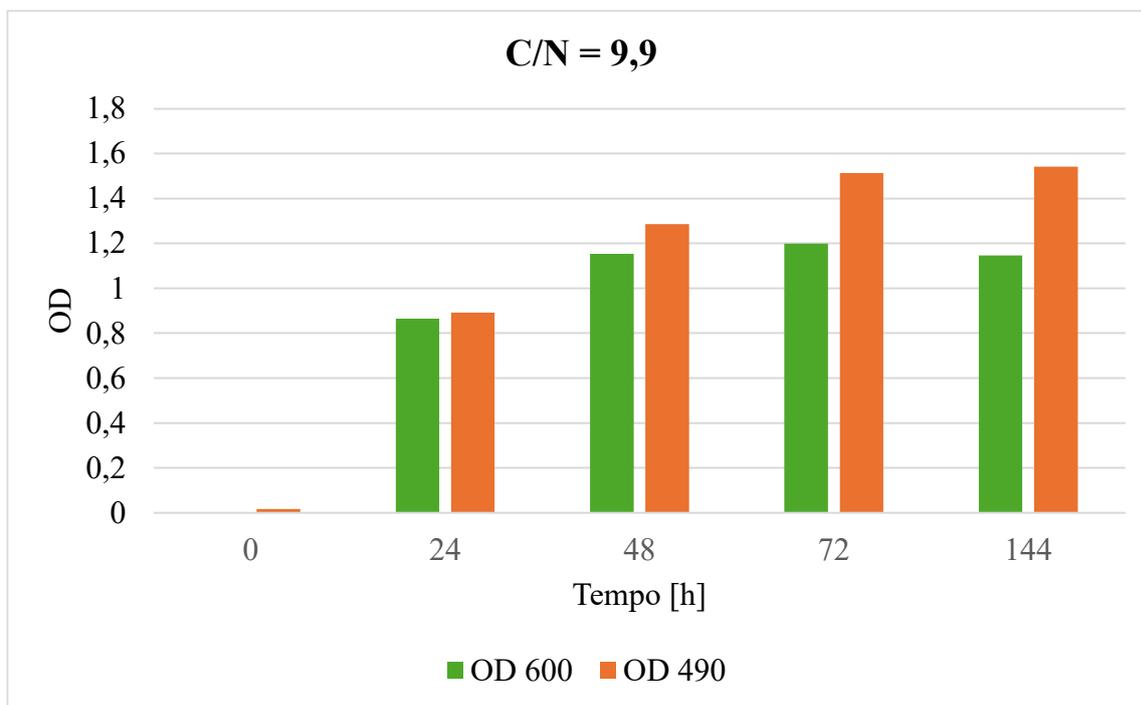
**Figura 41:** Andamento dei parametri di OD<sub>600</sub>, OD<sub>490</sub>, pH e D-glucosio nello sciropo di BSG aggiunto di 6 [g/L] di cloruro di ammonio e 8 [g/L] di glucosio. C/N= 10,31.

Nella Figura 41, dove si riportano gli andamenti dei parametri nel caso di C/N=10,31, è possibile osservare che i valori di OD<sub>600</sub> e OD<sub>490</sub> aumentano più rapidamente nelle prime 24 ore, rispetto al caso C/N=9,9, raggiungendo valori di  $0,9236 \pm 0,003$  e  $0,9499 \pm 0,0021$ , rispettivamente. Anche qui, la crescita di OD<sub>600</sub> continua fino ad un massimo a 72 ore, con valori di OD<sub>600</sub> pari a  $1,2288 \pm 0,0036$ , mentre i valori massimi di OD<sub>490</sub> si hanno a 144 ore con un valore di  $1,5421 \pm 0,0047$ .

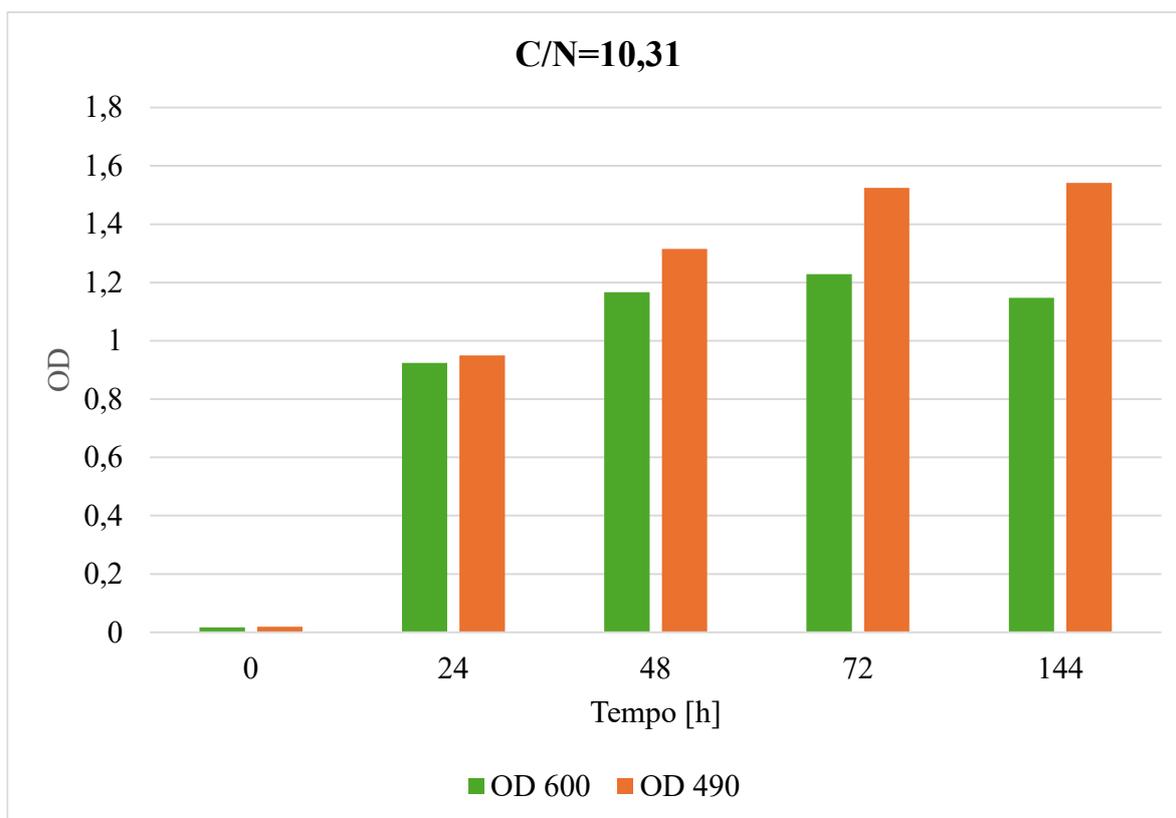
Per quanto riguarda la concentrazione di D-glucosio, si parte da un valore iniziale di  $13,928 \pm 0,07166$  g/L, superiore rispetto al medium con rapporto C/N pari a 9,9 (circa 12 g/L). La concentrazione di glucosio diminuisce all'aumentare del tempo, fino ad un valore pari a  $0,971 \pm 0,0852$  g/L dopo 72 ore. A tal proposito si può notare che sia nel caso precedente con C/N pari a 9,9, che in questo caso con un rapporto C/N pari a 10,31, la concentrazione di glucosio residua è circa la stessa dopo 72 ore di fermentazione (valor medio di circa 0,97 g/L).

Il pH parte da un valore iniziale di  $5,09 \pm 0,01$  e si assiste ad una progressiva acidificazione del terreno di coltura, arrivando a 144 ore di fermentazione con un valore di  $3,987 \pm 0,003$ .

I valori di OD<sub>600</sub> e OD<sub>490</sub> ottenuti nei due casi vengono riportati nella Figura 42 e Figura 43.



**Figura 42:** Valori di OD<sub>600</sub> e OD<sub>490</sub> registrati nel corso della fermentazione nel medium di coltura con un rapporto C/N pari a 9,9.



**Figura 43:** Valori di OD<sub>600</sub> e OD<sub>490</sub> registrati nel corso della fermentazione nel medium di coltura con un rapporto C/N pari a 10,31.

Si può effettuare una ulteriore considerazione per quanto concerne l'andamento dei valori di OD<sub>600</sub> e OD<sub>490</sub> in Figura 42 e Figura 43. Tra le 72 ore e le 144 ore di fermentazione, si evince

che OD<sub>600</sub> diminuisce, mentre OD<sub>490</sub>, continua ad aumentare, nonostante il valore di pH continui a diminuire e la disponibilità di D-glucosio nel medium di coltura sia molto bassa (circa 0,97 g/L in entrambi i casi). Questo comportamento potrebbe essere dovuto al fatto che i carotenoidi sono pigmenti che vengono prodotti anche in risposta a particolari stress (Marova et al., 2004). Nel caso specifico, considerando che la concentrazione di glucosio è circa 0,97, è opportuno pensare che il glucosio è limitante.

A 24 ore di fermentazione, i valori di OD<sub>600</sub> e OD<sub>490</sub> sono relativamente gli stessi in entrambi i casi ( $0,8654 \pm 0,0054$  in C/N=9,9 e  $0,9236 \pm 0,003$  in C/N=10,31). A partire dalle 48 ore e fino alla fine della fermentazione la differenza tra i due valori di OD<sub>600</sub> e OD<sub>490</sub> diventa più evidente. Infatti, a 72 ore di fermentazione in C/N=9,9 OD<sub>600</sub> è pari a  $1,1992 \pm 0,0031$  e OD<sub>490</sub> è pari a  $1,5202 \pm 0,0006$ , in C/N=10,31 OD<sub>600</sub> è pari a  $1,2288 \pm 0,0036$  e OD<sub>490</sub> è pari a  $1,5243 \pm 0,0004$ . A 144 ore di fermentazione in C/N=9,9 OD<sub>600</sub> è pari a  $1,1465 \pm 0,0014$  e OD<sub>490</sub> è pari a  $1,5417 \pm 0,0014$ , in C/N=10,31 OD<sub>600</sub> è pari a  $1,1470 \pm 0,0021$  e OD<sub>490</sub> è pari a  $1,5421 \pm 0,0012$ .

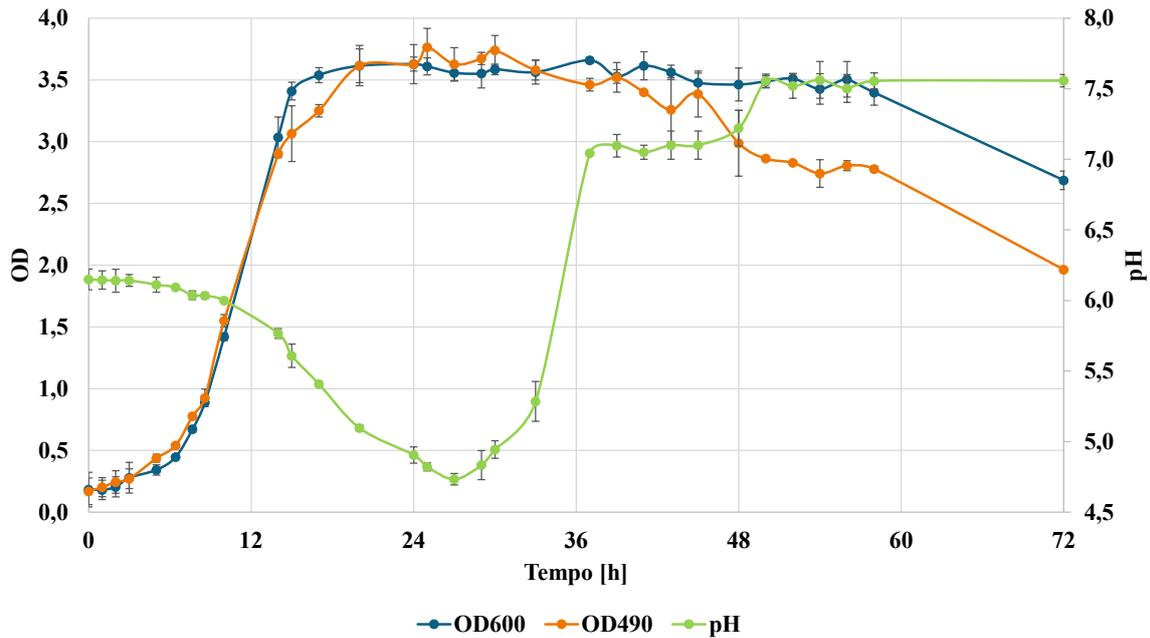
Considerando che variando il rapporto C/N non si sono ottenuti valori significativamente maggiori rispetto allo sciroppo di BSG tq per quanto concerne OD<sub>600</sub> e OD<sub>490</sub>, lo scale-up in beuta verrà effettuato sullo sciroppo di BSG tq.

## 3.4 Prova 1

Lo scale-up delle fermentazioni in presenza di *R. mucilaginosa* in terreno YM ed in sciroppo di BSG tq è stato effettuato in beute Erlenmeyer da 500 mL (volume colturale pari a 200 mL). In questa prova si valutano i valori di OD<sub>600</sub>, OD<sub>490</sub>, pH e si determina la concentrazione della biomassa a diversi tempi di fermentazione.

### 3.4.1 Coltura su terreno YM

Per costruire la curva di crescita di *R. mucilaginosa* si misura il valore di OD<sub>600</sub> dei campioni ottenuti dal brodo di coltura. Si effettua il bianco con il terreno YM. Parallelamente si è monitorato anche il pH del brodo di coltura durante la fermentazione ed il valore di OD<sub>490</sub>.



**Figura 44:** Andamento dei valori di OD<sub>600</sub>, OD<sub>490</sub> e pH relativi alla coltura di *Rhodotorula mucilaginosa* in beuta su terreno YM.

Soffermandoci in prima analisi sull'andamento della curva di crescita del lievito, si osservano diverse fasi che caratterizzano il ciclo di crescita di *R. mucilaginosa* durante il processo di fermentazione. In particolare, si nota che la fase lag, conosciuta anche come fase di latenza, dura circa cinque ore, in questa fase il lievito si adatta al terreno di coltura senza mostrare un aumento significativo dei valori di OD<sub>600</sub>.

Dopo la fase di latenza, si entra nella fase di crescita esponenziale, caratterizzata dall'aumento dei valori di OD<sub>600</sub>.

Successivamente, dopo circa 15 ore di fermentazione si raggiunge la fase stazionaria ed il valore di OD<sub>600</sub> rimane intorno al valore di 3,5 fino a circa 58 ore di fermentazione.

Dopo questo lasso di tempo, il microorganismo entra nella fase di declino cellulare ed il valore di OD<sub>600</sub> inizia a diminuire segnando una riduzione nella popolazione cellulare. Nella fase di morte, il numero di cellule che muoiono è superiore al numero di cellule che si duplicano.

Parallelamente è stato monitorato il pH del brodo di coltura. Si osserva che il pH partendo da un valore iniziale di circa 6,2 ha un graduale decremento nel corso della fermentazione sino a raggiungere un minimo di 4,7. Successivamente si ha un'inversione di tendenza ed il pH comincia a risalire arrivando a 50 ore di fermentazione (siamo ancora in fase stazionaria) ad un valore di circa 7,5, che rimane tale fino alla fine della fermentazione: questo potrebbe rappresentare un fattore inibente in quanto dalla letteratura si estrapola che un ambiente alcalino è dannoso per *R. mucilaginosa* (Cheng et al., 2016).

Nelle prime ore di coltura si assiste ad un aumento del valore di OD<sub>490</sub> e ciò suggerisce che il lievito inizia a produrre i carotenoidi durante la fase di crescita esponenziale. I valori di OD<sub>490</sub> raggiungono il massimo valore (circa 3,8) dopo 24 ore. In seguito, il valore di OD<sub>490</sub> si stabilizza e rimane relativamente costante con lievi fluttuazioni. Oltre le 48 ore, si osserva una diminuzione progressiva dell'OD<sub>490</sub> arrivando ad un valore di circa 2 a 72 ore di fermentazione.

Macroscopicamente, si osserva la variazione della colorazione del brodo di coltura, valutato al tempo 0, 24, 48 e 72 ore di fermentazione, come riportato nella Figura 45.



**Figura 45:** Variazione di colorazione del brodo di coltura di *Rhodotorula mucilaginosa* in terreno YM. Da sinistra a destra: 0, 24, 48 e 72 ore di fermentazione.

Si nota che dopo ogni 24 ore di fermentazione, il brodo di coltura è caratterizzato da una colorazione che diventa sempre più intensa.

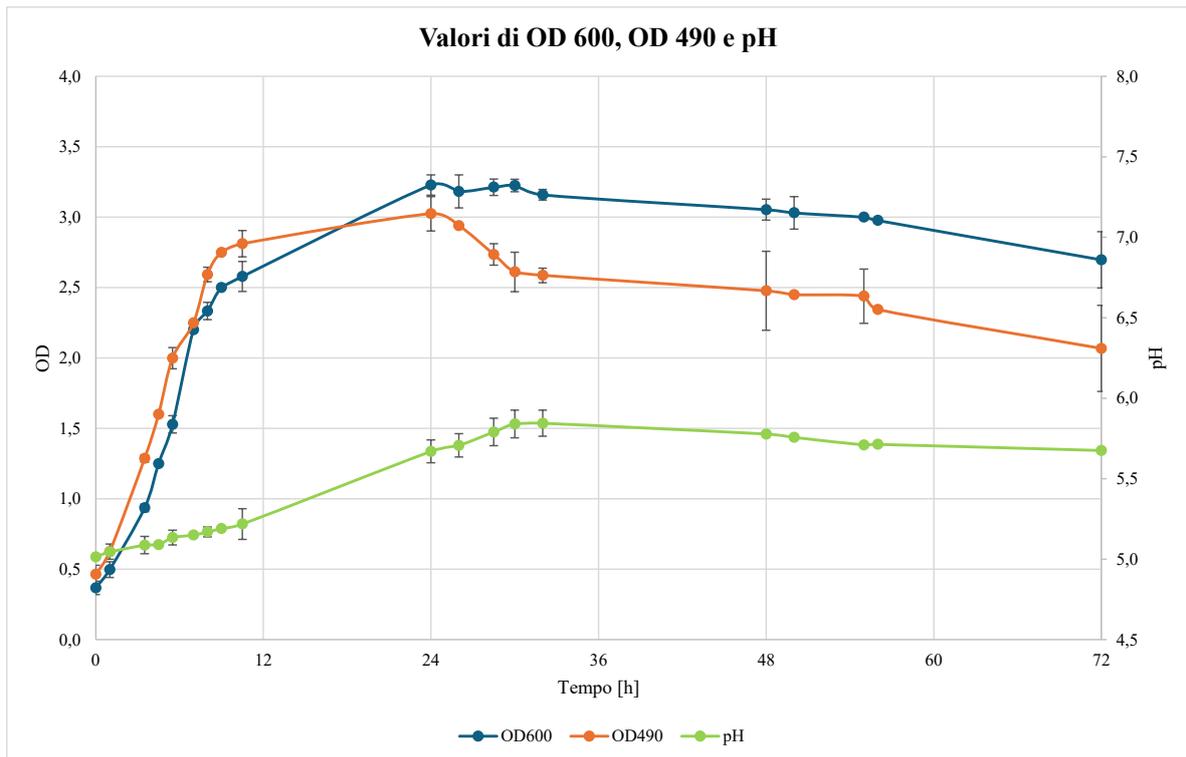
Nella prova, infine, si recupera la biomassa all'interno delle beute a 72 ore di fermentazione, al fine di determinarne la concentrazione pari a 5,212 g/L.

### 3.4.2 Coltura su sciroppo di BSG

Si realizza la coltura in beuta di *R. mucilaginosa* su sciroppo di BSG tq. Anche in questo caso si monitorano  $OD_{600}$ ,  $OD_{490}$  e pH avendo cura di effettuare campionamenti dal brodo di coltura a tempi costanti e crescenti sotto cappa BioHazard per garantire il mantenimento delle condizioni di sterilità.

Si leggono allo spettrofotometro i valori di assorbanza avendo cura di effettuare il bianco con lo sciroppo di BSG tq sterile e non inoculato.

I valori dei tre parametri monitorati si riportano nella Figura 46.



**Figura 46:** Andamento dei valori di OD<sub>600</sub>, OD<sub>490</sub> e pH relativi alla coltura di *R. mucilaginosa* in beuta su sciroppo di BSG.

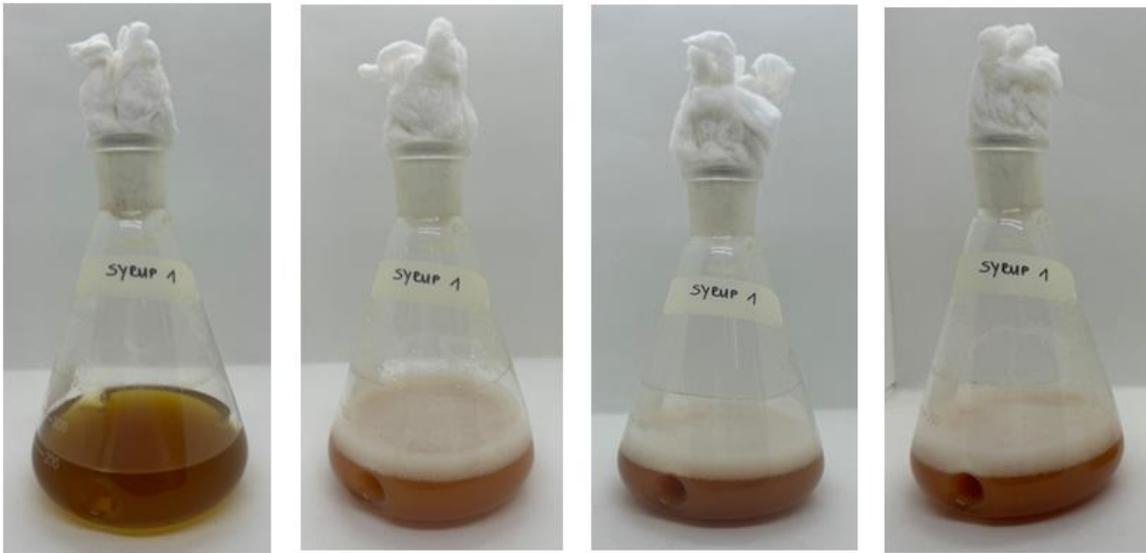
Osservando l'andamento di OD<sub>600</sub> si osserva una breve durata della fase lag (circa 2 ore), con una variazione di OD<sub>600</sub> minima in quanto le cellule si stanno adattando al nuovo terreno. Successivamente segue la fase di crescita esponenziale, durante la quale i valori di OD<sub>600</sub> aumentano raggiungendo valori di circa 3,3. Dopo circa 20 ore di fermentazione si osserva una decelerazione, raggiungendo la fase stazionaria dove i valori di OD<sub>600</sub> oscillano intorno al valore di 3,3. Infine, dopo circa 55 ore, si osserva una diminuzione progressiva dell'OD<sub>600</sub> arrivando a 72 ore di fermentazione con un valore di OD<sub>600</sub> pari a circa 2,7.

Parallelamente, si valuta l'OD<sub>490</sub> riferita alla produzione di carotenoidi. Il picco di assorbanza a 490 nm (OD<sub>490</sub>), pari a circa 3, viene raggiunto dopo 20 ore di fermentazione. Alla fine della fermentazione, dopo 72 ore, l'OD<sub>490</sub> si attesta ad un valore medio di circa 2,16.

Analizzando la curva del pH, emerge un comportamento molto differente rispetto a quanto osservato nella coltura in beuta su terreno YM.

Nella coltura su sciroppo di BSG, il pH iniziale è di circa 5. Successivamente si osserva un graduale aumento del valore che si stabilizza intorno a 5,8 dopo all'incirca 30 ore di fermentazione, mantenendosi a questo valore costante fino alla fine della fermentazione; infatti, alle 72 ore il valore di pH è di 5,68. Dalla letteratura emerge che la produzione di carotenoidi è ottimale con un pH pari a circa 5,5 (Cheng et al., 2016): considerando che il pH durante l'intera fermentazione di *R. mucilaginosa* utilizzando sciroppo di BSG tal quale come terreno di coltura è leggermente acido, si può affermare che lo sciroppo di BSG fornisce un ambiente favorevole per la crescita del lievito. Pertanto, si può ipotizzare che il pH fino alla fine della fermentazione non è inibente anche se la coltura non cresce più.

Infine, si riporta l'aspetto del brodo di coltura al tempo 0, 24, 48 e 72 ore di fermentazione. La differente colorazione nelle beute, che si fa sempre più intensa, è dovuta alla produzione dei carotenoidi.



**Figura 47:** Variazione di colorazione del brodo di coltura di *Rhodotorula mucilaginosa* in sciroppo di BSG. Da sinistra a destra: 0, 24, 48 e 72 ore di fermentazione.

Infine, si recupera la biomassa per determinare la sua concentrazione: la concentrazione della biomassa su sciroppo di BSG tq a 48 ore di fermentazione è pari a 4,037 g/L, mentre a 72 ore di fermentazione è pari a 3,5 g/L.

## 3.5 Prova 2

Si allestiscono prove in beuta su terreno YM e su sciroppo di BSG tq. A seguito delle misurazioni di assorbanza allo spettrofotometro ( $OD_{600}$  e  $OD_{490}$ ) e pH (sia su terreno YM che su sciroppo di BSG tq), risultati perfettamente confrontabili con le prove discusse in Prova 1 per questi parametri, si recupera la biomassa all'interno delle beute a tempi di fermentazione crescenti, al fine di determinare la concentrazione della stessa e dei carotenoidi prodotti. Inoltre, si valuta come varia la concentrazione di D-glucosio nel corso della fermentazione.

### 3.5.1 Determinazione della concentrazione della biomassa su terreno YM

Durante il processo di fermentazione, sono stati effettuati sacrifici a 24, 48 e 72 ore di fermentazione al fine di determinare la concentrazione di biomassa secca. I risultati ottenuti, riportati in Tabella 12, sono espressi come valori medi e relativa deviazione standard in quanto per ogni tempo sono state sacrificate più beute.

**Tabella 12:** Valori di concentrazione di biomassa secca separata dal terreno YM a 24, 48 e 72 ore di fermentazione.

Durata coltura [h]	Concentrazione biomassa secca [g/L]
24	5,445 ± 0,005
48	13,352 ± 0,462
72	5,204 ± 0,196

La concentrazione della biomassa recuperata dal terreno YM e poi valutata raggiunge il massimo valore a 48 ore di fermentazione (13,352 ± 0,462 g/L), mentre a 72 ore si osserva il valore più basso (5,204 ± 0,196 g/L).

### 3.5.2 Determinazione della concentrazione della biomassa su sciroppo di BSG

Analogamente a quanto riportato per la biomassa separata dal terreno YM, anche per determinare la concentrazione di biomassa secca nello sciroppo di BSG si effettuano sacrifici a 24, 48 e 72 ore di fermentazione. I dati ottenuti sono presentati come medie accompagnate dalla deviazione standard corrispondente in quanto per ciascun tempo colturale sono state eseguite più misurazioni da diverse beute sacrificate.

**Tabella 13:** Valori di concentrazione di biomassa secca separata dallo sciroppo di BSG tq a 24, 48 e 72 ore di fermentazione.

Durata coltura [h]	Concentrazione biomassa secca [g/L]
24	2,125 ± 0,135
48	4,107 ± 0,031
72	3,433 ± 0,108

La concentrazione della biomassa secca, come nel caso di YM, ha il massimo valore a 48 ore di fermentazione (4,107 ± 0,031 g/L), mentre il valore più basso si ha a 24 ore di durata colturale (2,125 ± 0,135 g/L).

Andando a fare un confronto tra i dati della concentrazione di biomassa ottenuti in YM e sciroppo di BSG tq, si nota come in entrambi i casi si abbia il massimo valore di concentrazione a 48 ore di fermentazione. Tuttavia, a 48 ore di fermentazione, la concentrazione ottenuta con il terreno YM (13,352 ± 0,462 g/L), è molto superiore a quella ottenuta con lo sciroppo di BSG tq (4,107 ± 0,031 g/L). Questo potrebbe essere dovuto alla

diversa concentrazione iniziale di glucosio (circa 6 g/L in sciroppo di BSG e circa 10 g/L in terreno YM), ma anche dal diverso rapporto C/N nei due terreni (lo sciroppo di BSG tq ha un rapporto C/N pari a 43,35, mentre il terreno YM ha C/N pari a 8,28).

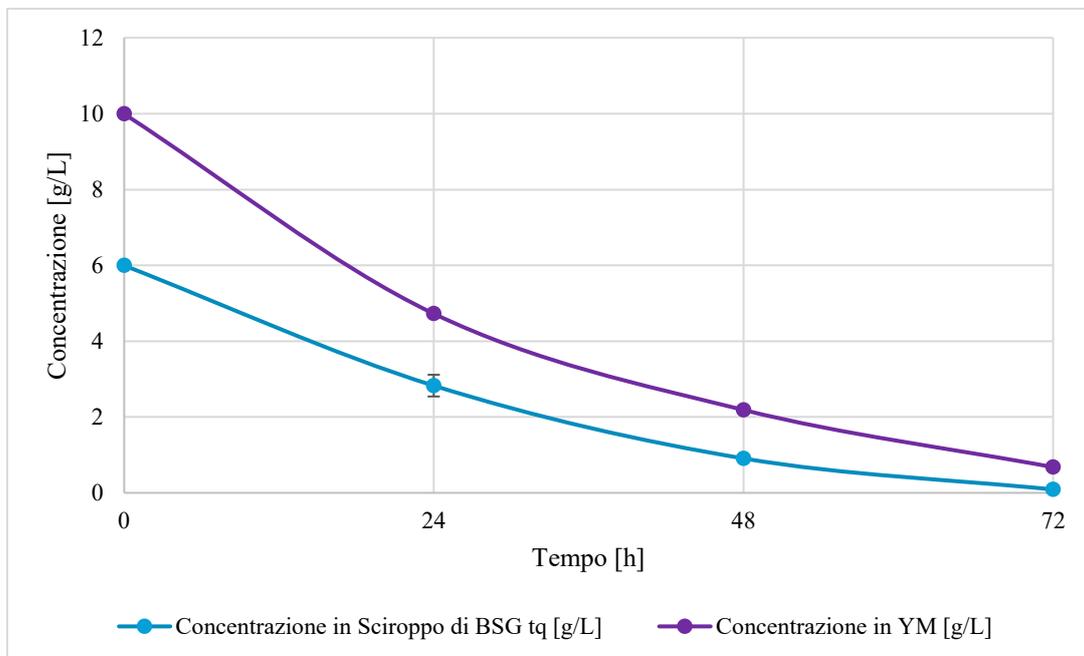
### 3.5.3 Determinazione del D-Glucosio

Nella stessa Prova 2, mediante il metodo descritto nel paragrafo 2.2.2.3, è stato possibile determinare la concentrazione del D-Glucosio nel corso della fermentazione a 0, 24, 48 e 72 ore di fermentazione sia nel terreno YM che in sciroppo di BSG tq.

Si riportano sia i valori nella Tabella 14, espressi come valor medio e deviazione standard, sia l'andamento della concentrazione di D-Glucosio in Figura 48.

**Tabella 14:** Valori della concentrazione di D-Glucosio in sciroppo di BSG tq e in YM.

TEMPO [h]	Concentrazione in Sciroppo di BSG tq [g/L]	Concentrazione in YM [g/L]
0	5,967 ± 0,0471	10 ± 0,0023
24	2,691 ± 0,287	4,73 ± 0,0412
48	0,865 ± 0,0374	2,19 ± 0,0181
72	0,107 ± 0,0124	0,68 ± 0,0271



**Figura 48:** Andamento della concentrazione di D-Glucosio nel tempo in sciroppo di BSG tq e YM.

Dal grafico riportato in Figura 48, si nota che la concentrazione di D-glucosio inizialmente è più alta in YM (circa  $10 \pm 0,0023$  g/L) rispetto al caso di sciroppo di BSG (circa  $5,967 \pm 0,0471$  g/L). Nel tempo, la concentrazione di D-glucosio diminuisce in entrambi i casi.

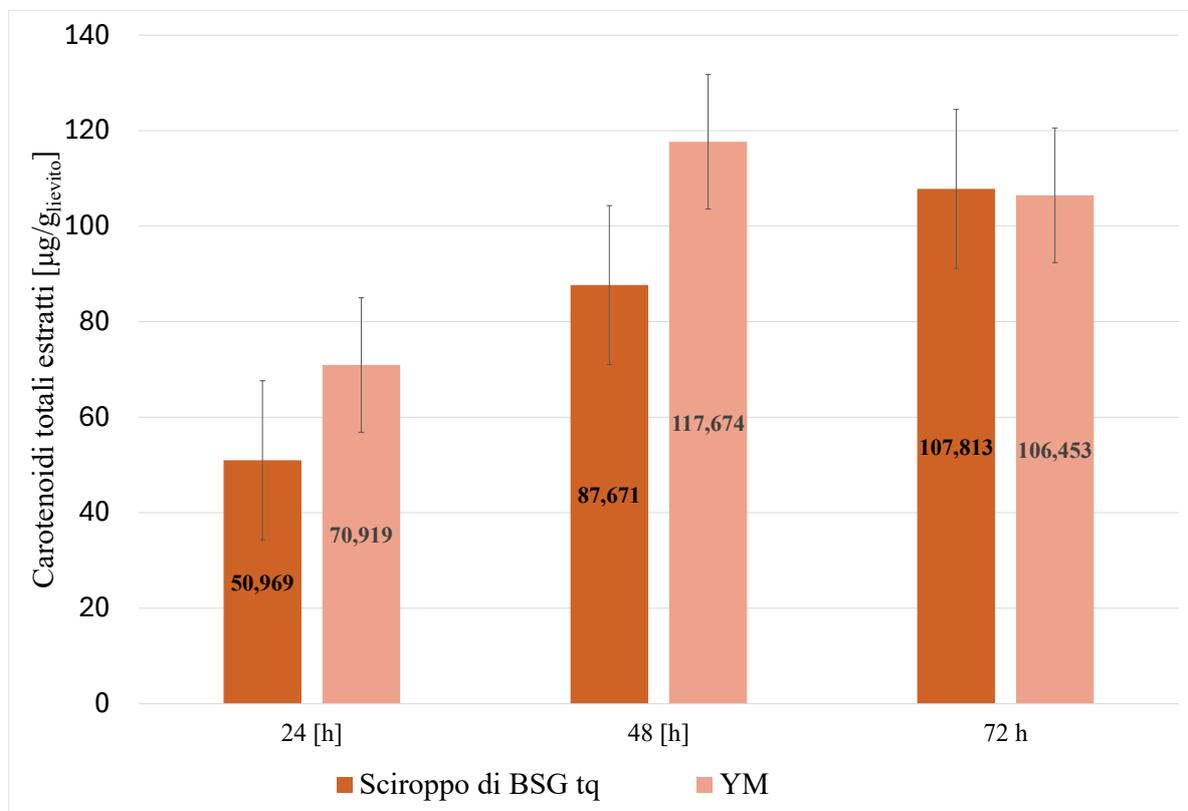
Un dato interessante è notare come a 24 ore di fermentazione la concentrazione di D-glucosio in sciroppo di BSG tq ( $2,691 \pm 0,287$  g/L) sia simile al valore di concentrazione di D-glucosio in terreno YM a 48 ore di fermentazione ( $2,19 \pm 0,0181$  g/L).

Al termine delle 72 ore, si nota che nel terreno YM a 72 ore di fermentazione si ha un valore di  $0,68 \pm 0,0271$  g/L, mentre in sciroppo di BSG si ha un valore di  $0,107 \pm 0,0124$  g/L. In entrambi i casi il D-glucosio è consumato ma più rapidamente in terreno YM.

### 3.5.4 Estrazione dei carotenoidi

Un aspetto cruciale dello studio è la quantificazione dei carotenoidi estratti, nella Prova 2, a 24, 48 e 72 ore di fermentazione seguendo il protocollo di Cheng et al., (2016), riportato nel dettaglio nel paragrafo 2.7.1, utilizzando DMSO e acetone contemporaneamente per tre cicli consecutivi e applicando la formula proposta da Cheng et al. (2016). Per la valutazione dei carotenoidi totali si allestiscono prove in beuta su terreno YM e su sciroppo di BSG monitorando i valori di OD<sub>600</sub>, OD<sub>490</sub> e pH ed effettuando sacrifici a tempi di fermentazione crescenti, recuperando la biomassa umida dal terreno YM e dallo sciroppo di BSG tq.

Di seguito vengono riportati i carotenoidi totali estratti, ottenuti sommando i carotenoidi estratti in ciascun ciclo.



**Figura 49:** Carotenoidi totali estratti a 24, 48 e 72 ore di fermentazione.

Dalla Figura 49 emerge che, analizzando il valor medio, per il terreno YM, il quantitativo maggiore di carotenoidi estratti si ottiene a 48 ore di fermentazione, con un valore medio di 117,674 µg/g di lievito. Seguono le 72 ore (106,453 µg/g) ed infine le 24 ore (70,919 µg/g). Al contrario, per lo sciroppo di BSG tq, il massimo quantitativo di carotenoidi viene estratto a 72 ore (107,813 µg/g), seguito dalle 48 ore (87,671 µg/g) e infine dalle 24 ore (50,969 µg/g). Inoltre, a 72 ore di fermentazione il quantitativo di carotenoidi estratti in YM (pari a 106,453 µg/g) ed in sciroppo di BSG (pari a 107,813 µg/g) hanno valori molto confrontabili. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che nel terreno YM si ha un'azione inibente del pH che impedisce di accrescere ulteriormente la biomassa ed estrarre di conseguenza un quantitativo di carotenoidi a 72 ore maggiore di quelli estratti a 48 ore.

In Tabella 15 si riportano per una maggiore completezza i carotenoidi totali estratti in sciroppo di BSG tq e in YM, espressi come valor medio e relativa deviazione standard.

**Tabella 15:** Valori dei carotenoidi totali estratti in sciroppo di BSG tq e in YM a 24, 48 e 72 [h] di fermentazione.

Tempo [h]	Carotenoidi totali estratti [µg/g] in sciroppo di BSG tq	Carotenoidi totali estratti [µg/g] in YM
24	50,969 ± 13,275	70,919 ± 15,362
48	87,671 ± 17,981	117,674 ± 34,147
72	107,813 ± 21,843	106,453 ± 28,964

Si può notare che il quantitativo di carotenoidi accumulati non è così diverso nei due terreni se si considerano le deviazioni standard.

### 3.5.5 Concentrazione di carotenoidi estratti

I carotenoidi sono pigmenti che si trovano all'interno delle cellule e per tale ragione è opportuno valutarli in relazione alla biomassa che li contiene. Questo implica che la quantità totale di carotenoidi che si riesce ad estrarre da una coltura non dipende solo dall'efficienza del protocollo di estrazione, ma anche dalla quantità di biomassa presente nella coltura stessa: più biomassa viene prodotta, maggiore sarà il quantitativo di carotenoidi che si potrà ottenere. Si valuta quindi la concentrazione di carotenoidi estratti, espressa in microgrammi per litro [µg/L].

Per calcolare la concentrazione di carotenoidi estratti, è necessario moltiplicare il quantitativo totale dei carotenoidi estratti (µg/g<sub>lievito</sub>) e riportato in Tabella 15, per la concentrazione di biomassa presente nella coltura (g/L) in YM e sciroppo di BSG tq e valutata nella seguente Prova 2 a 24, 48 e 72 ore di fermentazione. I dati della concentrazione della biomassa nella Prova 2 sono riportati nel Paragrafo 3.5.1 in terreno YM e 3.5.2 nello sciroppo di BSG tq.

**Tabella 16:** Valori della concentrazione di carotenoidi in sciroppo di BSG tq e in YM a 24, 48 e 72 [h] di fermentazione.

Tempo [h]	Concentrazione di carotenoidi [ $\mu\text{g/L}$ ] sciroppo di BSG tq	Concentrazione di carotenoidi [ $\mu\text{g/L}$ ] YM
24	$108,309 \pm 1,792$	$386,154 \pm 0,0768$
48	$360,064 \pm 0,557$	$1571,18 \pm 15,776$
72	$370,122 \pm 2,359$	$553,981 \pm 5,677$

Dalla Tabella 16 si nota che per il terreno YM, la concentrazione di carotenoidi è maggiore a 48 ore di fermentazione, con un valore di  $1571,18 \pm 15,776 \mu\text{g/L}$ . Seguono le 72 ore ( $553,981 \pm 5,677 \mu\text{g/L}$ ) ed infine le 24 ore ( $386,154 \pm 0,0768 \mu\text{g/L}$ ). Nello sciroppo di BSG tq si ha invece la massima concentrazione di carotenoidi a 72 ore ( $370,122 \pm 2,359 \mu\text{g/L}$ ), seguito dalle 48 ore ( $360,064 \pm 0,557 \mu\text{g/L}$ ) e infine dalle 24 ore ( $108,309 \pm 1,792 \mu\text{g/L}$ ).

### 3.5.6 Andamento dei parametri in funzione del tempo

Per comprendere a fondo le dinamiche di fermentazione di *R. mucilaginosa* sia nel contesto dello sciroppo di BSG tq che nel terreno YM, è fondamentale analizzare l'evoluzione nel tempo di diversi parametri chiave, già precedentemente discussi, in quanto permette di osservare come variazioni di queste misure possano influenzare il processo fermentativo in diversi ambienti di coltura.

In particolare, risulta utile rappresentare graficamente:

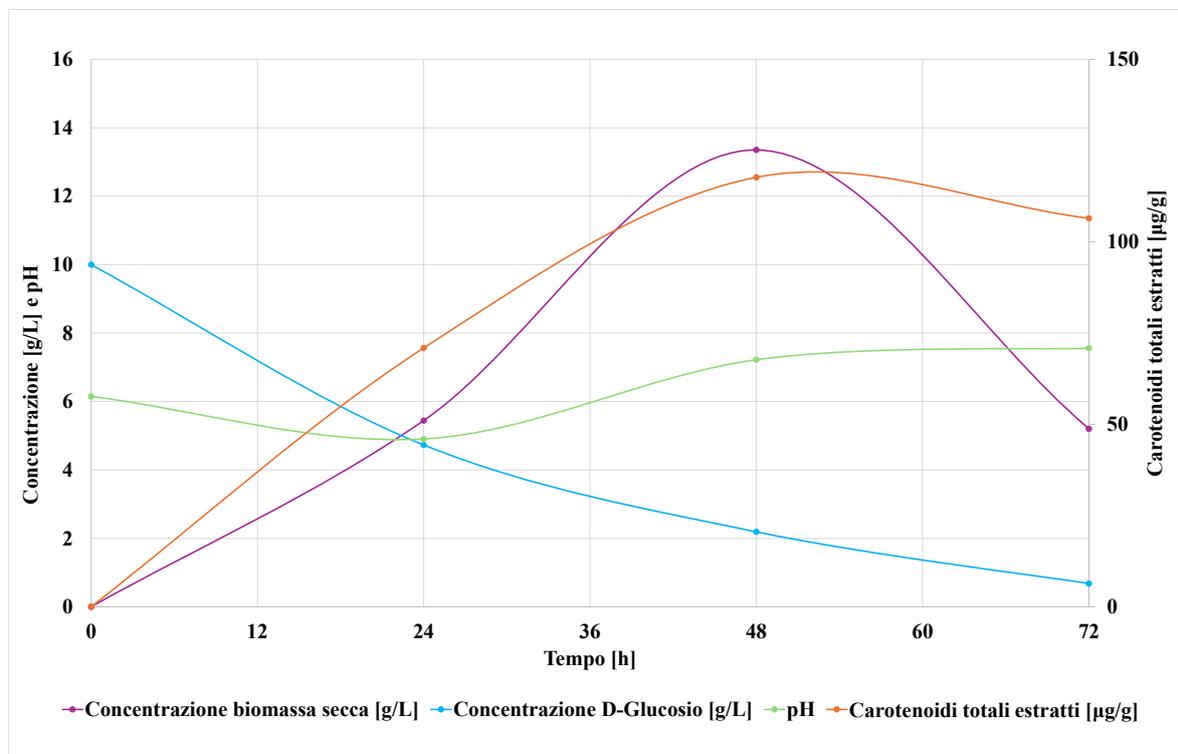
1. L'andamento della concentrazione della biomassa secca per comprendere il tasso di crescita di *R. mucilaginosa* nelle diverse condizioni di coltura.
2. L'andamento della concentrazione del D-Glucosio per avere informazioni su come il lievito utilizza il nutriente durante il processo fermentativo e su quanto velocemente lo metabolizza.
3. L'evoluzione del pH della coltura poiché influisce direttamente sulla crescita del lievito e sul suo metabolismo.
4. Il quantitativo dei carotenoidi totali estratti da 0,1 grammi di lievito (in quanto per il quantitativo di carotenoidi estratti, seguendo il protocollo di estrazione di Cheng et al., (2016), bisogna utilizzare questa quantità fissa).

Analizzare questi parametri contemporaneamente ci offre un'idea di quale siano i fattori limitanti o inibenti del processo in modo da poter ottimizzare le condizioni operative di coltura e massimizzare di conseguenza la produzione dei carotenoidi.

Si analizzeranno dapprima le misurazioni in YM e successivamente le stesse in sciroppo di BSG tq.

### 3.5.6.1 Evoluzione nel corso della fermentazione in terreno YM

L'andamento dei parametri discussi, vengono illustrati e raggruppati per mettere in risalto i risultati ottenuti e trarre conclusioni significative.



**Figura 50:** Andamento della concentrazione della biomassa secca, della concentrazione di D-Glucosio, del pH e dei carotenoidi totali estratti in terreno YM nel corso della fermentazione.

La concentrazione di biomassa secca di *R. mucilaginosa* segue un andamento caratteristico durante il processo fermentativo: si ha una crescita rapida raggiungendo un picco significativo intorno alle 48 ore di fermentazione ( $13,352 \pm 0,462$  g/L): questo picco rappresenta il momento in cui il lievito ha raggiunto la massima densità cellulare.

Successivamente la concentrazione di biomassa diminuisce arrivando a 72 ore di fermentazione ad un valore di  $5,204 \pm 0,196$  g/L. All'inizio del processo fermentativo, la concentrazione di D-glucosio è pari a  $10 \pm 0,0023$  g/L e viene consumato rapidamente man mano che la biomassa cresce. A 72 ore dall'inizio della fermentazione, la concentrazione di D-glucosio è molto bassa ( $0,68 \pm 0,0271$  g/L). Quando la concentrazione di D-glucosio raggiunge valori bassi già intorno alle 48 ore ( $2,19 \pm 0,0181$  g/L), la crescita della biomassa non può più essere sostenuta adeguatamente in quanto la concentrazione di glucosio diventa limitante e di conseguenza il rapporto C/N non è più adeguato, e si assiste difatti anche ad una riduzione della concentrazione dei carotenoidi a 72 ore di fermentazione ( $553,981 \pm 5,677$  µg/L) rispetto alle 48 ore ( $1571,18 \pm 15,776$  µg/L), visualizzabile in Tabella 16.

Parallelamente all'andamento della biomassa e del D-glucosio, il pH del mezzo di coltura subisce variazioni significative durante la fermentazione. Nelle prime 24 ore, il pH da un valore di circa 6,3 diminuisce progressivamente, raggiungendo un valore di circa 4,8, successivamente, il pH inizia a risalire gradualmente aumentando nel corso di tutta la fermentazione arrivando a circa 7,5.

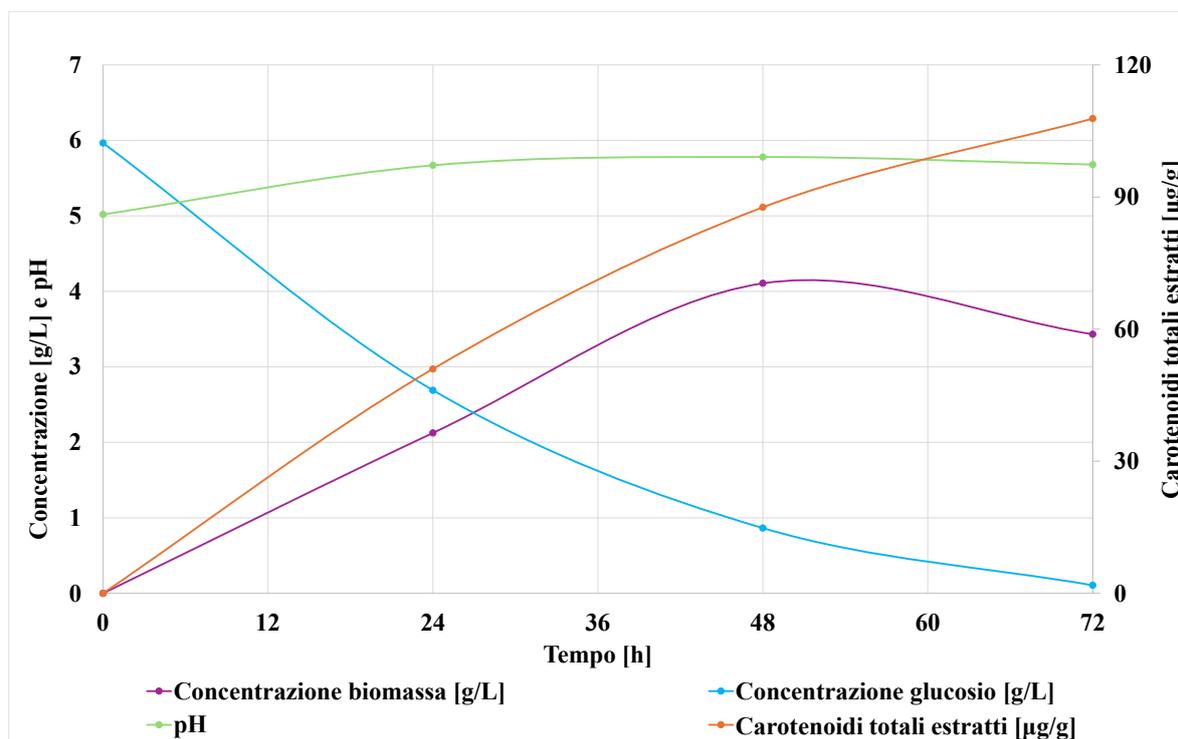
L'andamento del pH è particolarmente importante poiché influisce direttamente sulla crescita del lievito (Cheng et al., 2016). Un ambiente troppo alcalino è inibente per la crescita cellulare; infatti, il lievito predilige un pH di circa 5,5 (Cheng et al., 2016).

La drastica riduzione della biomassa, osservata dopo le 48 ore, può quindi essere attribuita alla combinazione di due fattori principali che creano condizioni sfavorevoli per il metabolismo di *R. mucilaginosa*: la carenza di D-glucosio, che è fondamentale per la crescita cellulare, e l'aumento del pH, che porta il terreno di coltura al di fuori dal range ottimale (5-5.5) per la crescita del lievito.

Concentrandoci sui carotenoidi totali estratti da una quantità costante di 0,1 grammi di lievito, emerge una considerazione interessante.

Nelle prime 48 ore, si osserva che l'accumulo di carotenoidi segue l'andamento della crescita della biomassa. Tuttavia, a 72 ore di fermentazione, nonostante i carotenoidi totali estratti da una quantità fissa di 0,1 grammi di lievito diminuiscano (valor medio di 106,45 µg/g) rispetto alle 48 ore (valor medio di 117,674 µg/g), non si ha una diminuzione drastica come quella che si ha per quanto concerne la biomassa tra le 48 ( $13,352 \pm 0,462$  g/L) e 72 ore ( $5,204 \pm 0,196$  g/L) di fermentazione. Questo fenomeno può essere spiegato dal fatto che le cellule, a 72 ore di fermentazione, hanno accumulato una maggiore quantità di carotenoidi. È per questo motivo che la quantità di carotenoidi per unità di biomassa rimane elevata nonostante la drastica riduzione della concentrazione di biomassa totale. Il chiarimento di questo meccanismo osservato verrà affrontato nel paragrafo successivo dove si illustrano gli stessi parametri monitorati nella fermentazione utilizzando come medium di coltura lo sciroppo di BSG tq.

### 3.5.6.2 Evoluzione nel corso della fermentazione in sciroppo di BSG



**Figura 51:** Andamento della concentrazione della biomassa secca, della concentrazione di D-Glucosio, del pH e della concentrazione dei carotenoidi totali estratti in sciroppo di BSG tq nel corso della fermentazione.

Nella Figura 51 si nota che la concentrazione di biomassa secca aumenta progressivamente durante le prime 48 ore di fermentazione, raggiungendo un picco massimo ( $4,107 \pm 0,031$  g/L) proprio come visto nel caso di YM. Tuttavia, dopo le 48 ore, si osserva una diminuzione della concentrazione di biomassa arrivando a 72 ore con un valore di  $3,433 \pm 0,108$  g/L.

Analizzando la curva che mostra la concentrazione del D-glucosio, si nota che la sua concentrazione, partendo da un valore di circa 6 g/L diminuisce costantemente nel tempo, e a 72 ore è quasi completamente esaurito ( $0,107 \pm 0,0124$  g/L). Questo esaurimento quasi totale del D-glucosio coincide con la riduzione della biomassa, evidenziando che la disponibilità di questo zucchero è un fattore limitante per la crescita delle cellule.

Il pH del mezzo di coltura mostra un comportamento diverso a quanto visto con YM. Nelle prime 24 ore, il pH, partendo da un valor medio di circa 5, aumenta gradualmente, raggiungendo il suo picco a 48 ore con un valore di circa 5,75. Si nota comunque che tra le 24 e le 72 ore di fermentazione non si assiste ad una variazione significativa del pH, che rimane comunque in un intervallo ottimale di crescita per il lievito.

Se consideriamo i carotenoidi totali estratti da una quantità fissa e pari a 0,1 grammi di lievito, emerge che questi aumentano progressivamente nel tempo, anche dopo che la biomassa ha raggiunto il suo massimo e ha iniziato la fase di declino. Questo perché i carotenoidi continuano ad essere prodotti e accumulati all'interno delle cellule anche dopo che la crescita cellulare ha raggiunto il suo massimo e inizia la fase di declino. A 72 ore di fermentazione, come si era già visto nel caso di YM, il quantitativo di carotenoidi estraibile da 0,1 grammi di lievito e quindi accumulato nelle cellule di *R. mucilaginosa* (valor medio di  $107,813$  µg/g), è maggiore rispetto a quello accumulato a 48 ore di fermentazione (valor medio di  $87,671$  µg/g).

Questa dinamica può essere spiegata dal fatto che la produzione e l'accumulo di metaboliti secondari come i carotenoidi può continuare anche dopo che la crescita cellulare ha raggiunto il suo massimo e la biomassa ha iniziato la sua fase di declino.

Il fenomeno è stato descritto anche nello studio di Marova et al., (2004). In particolare, nell'articolo si dimostra come nel genere *Rhodotorula*, in condizioni particolari di stress ambientali, nonostante vi sia una diminuzione della biomassa, si registra un aumento nel quantitativo di carotenoidi prodotti e accumulati all'interno delle cellule.

Da un punto di vista metabolico, ciò può essere spiegato dal fatto che i carotenoidi svolgono un ruolo di protezione verso il microrganismo stesso grazie alla loro azione antiossidante e la loro produzione per tale motivo è influenzata anche da specifiche condizioni ambientali sfavorevoli (Catzu, 2013).

### 3.5.7 Ottimizzazione del processo di estrazione dei carotenoidi

A seguito dell'estrazione dei carotenoidi effettuata con la metodica proposta da Cheng et al. (2016) e discussa nel paragrafo 3.5.4, poiché la biomassa non si decolorava totalmente, e dalla letteratura emerge che l'estrazione dei carotenoidi è efficace se il pellet a fine protocollo di estrazione risulta essere grigio (Cheng et al., 2016), (Lopes et al., 2017), si è deciso di ottimizzare il processo estrattivo.

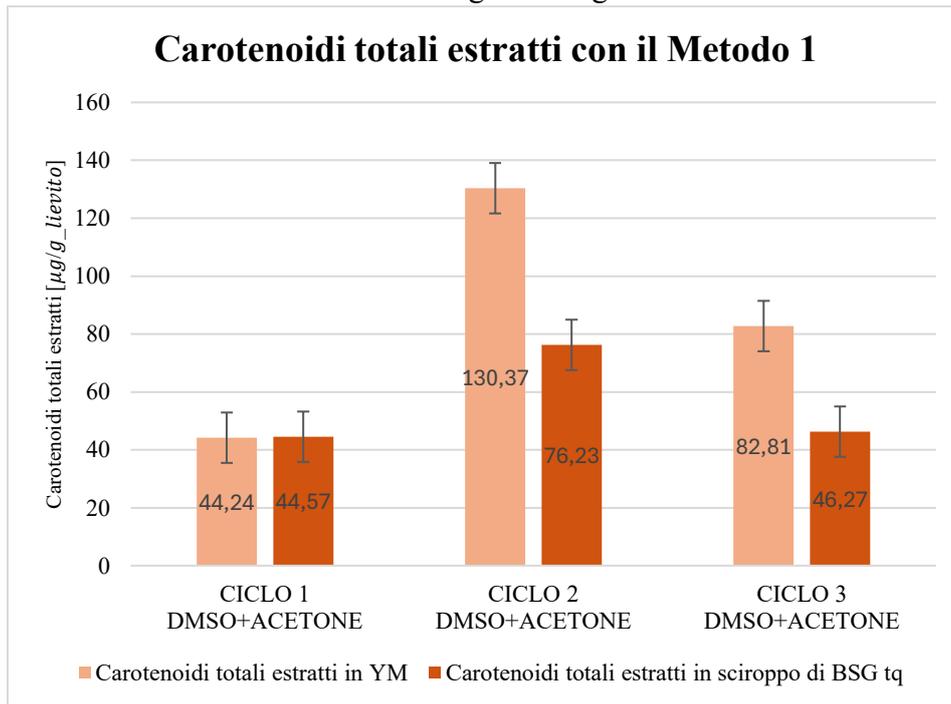
Si vuole quindi individuare quale sia il protocollo di estrazione dei carotenoidi, tra quelli proposti in letteratura, più efficiente. Per questa valutazione, pertanto, i carotenoidi estratti non vengono considerati in relazione ad un tempo specifico di fermentazione, ma si crea un unico pool distinguendo solo i carotenoidi totali estratti dai due diversi terreni di coltura usati: terreno YM e sciroppo di BSG tq.

Le differenti metodologie di estrazione, descritte nel dettaglio nel Paragrafo 2.7.2, derivano una dal protocollo proposto da Cheng et al. (2016), altre due dai protocolli di (Lopes et al., 2017).

#### 3.5.7.1 Metodo 1

Si riportano nel dettaglio i dati relativi all'estrazione eseguita con il Metodo 1 (Cheng et al., 2016). In particolare, questo protocollo prevede l'aggiunta di acetone e DMSO contemporaneamente al campione di biomassa, seguito da operazioni di ultrasonificazione (60 kHz per 10 minuti) e centrifugazione (4100 rpm per 10 minuti) ed infine misurazione allo spettrofotometro a 490 nm. Si ripete l'operazione per tre cicli consecutivi.

I risultati si presentano con l'uso di un grafico a barre che permette di effettuare un confronto immediato tra i carotenoidi totali estratti a seguito di ogni ciclo.



**Figura 52:** Confronto dei carotenoidi totali estratti in YM e sciroppo di BSG tq a seguito di ogni ciclo di estrazione seguendo il protocollo del Metodo 1.

Di seguito si riportano anche i dati numerici che sono espressi come media e relativa deviazione standard.

In particolare, si riportano i carotenoidi totali estratti dopo ogni ciclo, oltre al totale complessivo dei carotenoidi estratti. Per la formula utilizzata nella valutazione dei carotenoidi totali estratti, si rimanda alla formula indicata nel Paragrafo 2.7.1.

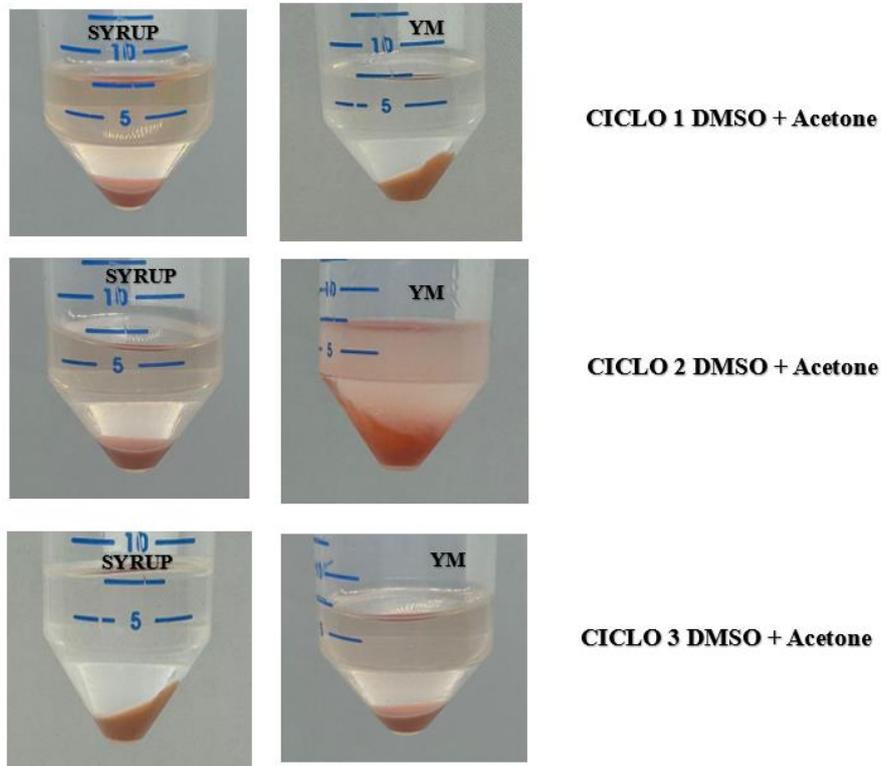
**Tabella 17:** Metodo 1: carotenoidi totali estratti in YM e sciroppo di BSG tq a seguito di ogni ciclo di estrazione.

	CICLO 1 DMSO+ACETONE	CICLO 2 DMSO+ACETONE	CICLO 3 DMSO+ACETONE	TOTALE
<b>Carotenoidi totali estratti in YM [µg/g]</b>	44,24 ± 1,61	130,37 ± 4,68	82,81 ± 18,45	257,42 ± 24,74
<b>Carotenoidi totali estratti in sciroppo BSG tq [µg/g]</b>	44,57 ± 2,84	76,23 ± 11,10	46,27 ± 3,10	167,07 ± 17,04

Dai dati riportati in Tabella 17, emerge che con il secondo ciclo si estrae un quantitativo di carotenoidi maggiore sia in sciroppo di BSG tq ( $76,23 \pm 11,10 \mu\text{g/g}$ ) che in terreno YM ( $130,37 \pm 4,68 \mu\text{g/g}$ ), segue il terzo ciclo dove in sciroppo di BSG tq si estraggono  $46,27 \pm$

3,10  $\mu\text{g/g}$  ed in terreno YM  $82,81 \pm 18,45 \mu\text{g/g}$  ed infine nel primo ciclo si estrae un quantitativo di carotenoidi più basso:  $44,57 \pm 2,84 \mu\text{g/g}$  in sciroppo di BSG tq e  $44,24 \pm 1,61 \mu\text{g/g}$  in terreno YM.

Nella Figura 53 si riporta la colorazione del pellet e relativo surnatante per i diversi cicli di estrazione.

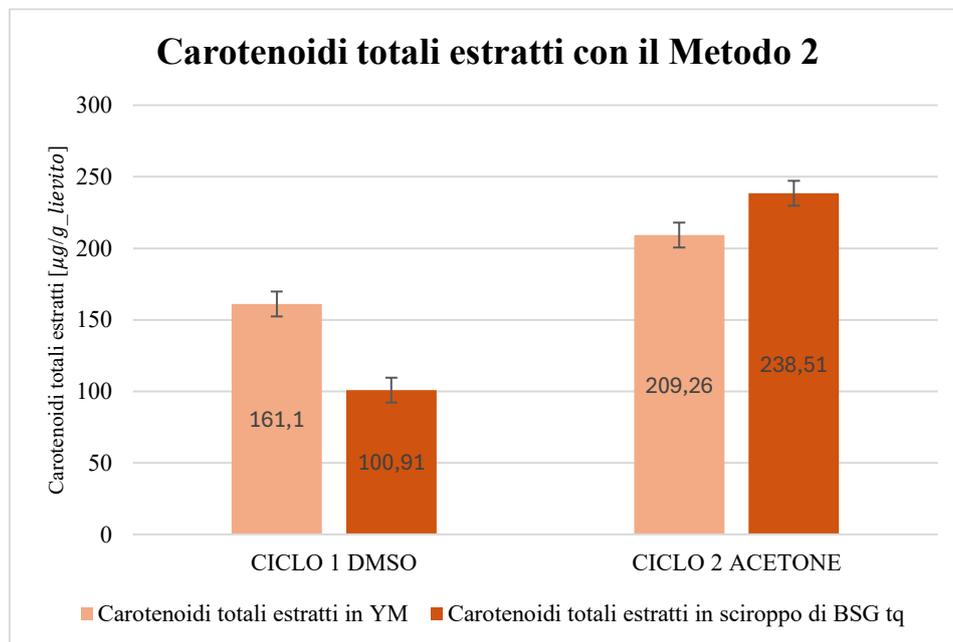


**Figura 53:** Colorazione del pellet e del surnatante a seguito dei cicli di estrazione con il Metodo 1.

Come si può notare dalle immagini la colorazione del pellet rimane fino alla fine del protocollo di estrazione rosata sia per quanto riguarda lo sciroppo di BSG tq che YM. Ciò è imputabile al fatto che il protocollo di estrazione nel Metodo 1 non è efficace nell'estrarre tutti i carotenoidi.

### 3.5.7.2 Metodo 2

Si presentano i valori dell'estrazione eseguita seguendo il protocollo descritto nel Metodo 2 (Lopes et al., 2017) che utilizza i solventi DMSO e acetone applicati separatamente nei due cicli di estrazione al campione di biomassa.



**Figura 54:** Confronto dei carotenoidi totali estratti in YM e sciroppo di BSG tq a seguito di ogni ciclo di estrazione seguendo il protocollo del Metodo 2.

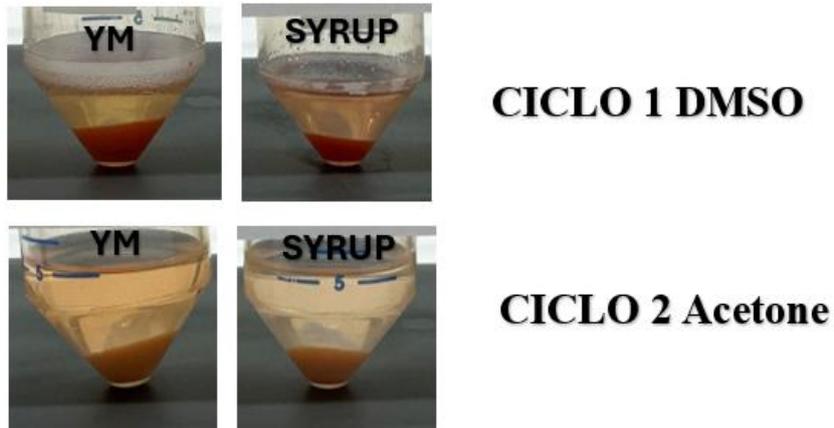
In Tabella 18 si mostrano i valori numerici espressi come media e relativa deviazione standard, riportando anche il totale dei carotenoidi estratti dato dalla somma dei risultati ottenuti a seguito di ogni ciclo.

**Tabella 18:** Metodo 2: carotenoidi totali estratti in YM e sciroppo di BSG tq a seguito di ogni ciclo di estrazione.

	CICLO 1 DMSO	CICLO 2 ACETONE	TOTALE
<b>Carotenoidi totali estratti in YM [µg/g]</b>	161,10 ± 9,69	209,26 ± 2,69	370,36 ± 12,38
<b>Carotenoidi totali estratti in sciroppo BSG tq [µg/g]</b>	100,91 ± 3,25	238,51 ± 5,46	339,42 ± 8,71

Come si evince dai valori in Tabella 18, nel secondo ciclo si estrae un quantitativo di carotenoidi maggiore rispetto al primo ciclo. Non si ha una significativa differenza tra il totale dei carotenoidi estratti in YM e in sciroppo di BSG tq.

Si mostra la colorazione del pellet e del surnatante sia per quanto riguarda l'estrazione dei carotenoidi su sciroppo di BSG tq che quelli in YM.

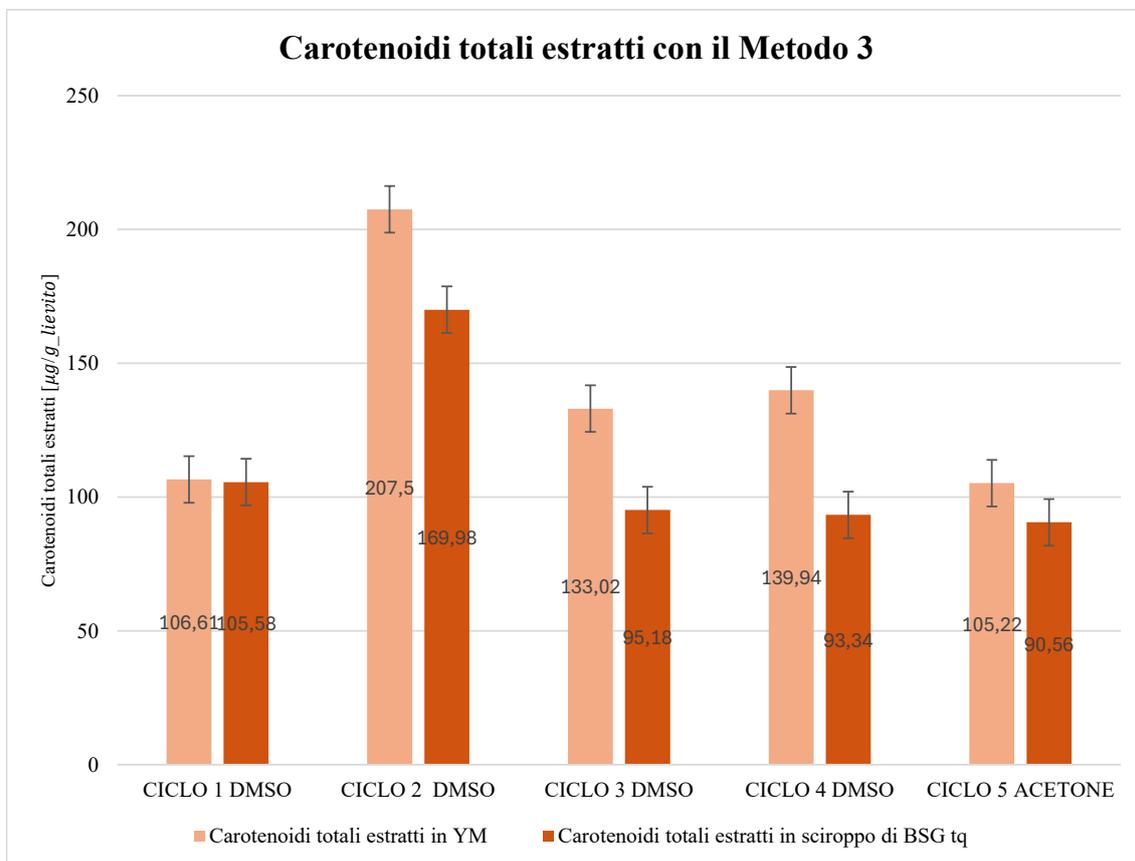


**Figura 55:** Colorazione del pellet e del surnatante a seguito dei cicli di estrazione con il Metodo 2.

Nella Figura 55, si nota anche in questo caso come nel Metodo 1, che a seguito di ogni ciclo di estrazione la colorazione del pellet rimane aranciata. Questo sempre a causa del fatto che il Metodo 2 non permette di estrarre tutti i carotenoidi presenti nel pellet.

### 3.5.7.3 Metodo 3

Di seguito si mostrano i risultati relativi all'estrazione eseguita seguendo il protocollo descritto nel Metodo 3 (Lopes et al., 2017) che prevede l'utilizzo di DMSO in 4 cicli sostituendo il solvente fresco a seguito di ogni ciclo e nel quinto ciclo è previsto l'uso di acetone.



**Figura 56:** Confronto dei carotenoidi totali estratti in YM e sciroppo di BSG tq a seguito di ogni ciclo di estrazione seguendo il protocollo del Metodo 3.

In Tabella 19 si presentano i dati numerici relativi ai carotenoidi totali estratti espressi come media e relativa deviazione standard. Si riporta anche il totale dei carotenoidi estratti calcolato sommando i risultati ottenuti a seguito di ogni ciclo.

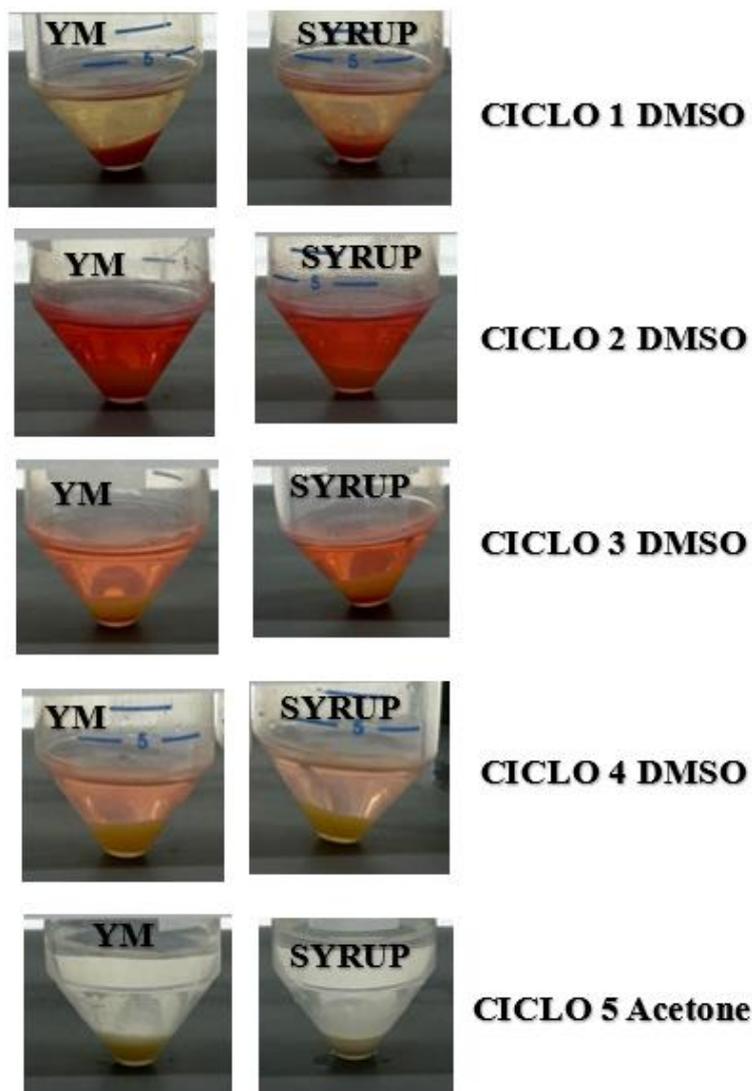
**Tabella 19:** Metodo 3: carotenoidi totali estratti in YM e sciroppo di BSG tq a seguito di ogni ciclo di estrazione.

	CICLO 1 DMSO	CICLO 2 DMSO	CICLO 3 DMSO	CICLO 4 DMSO	CICLO 5 ACETONE	TOTALE
<b>Carotenoidi totali estratti in YM [µg/g]</b>	106,61 ± 0,25	207,50 ± 1,2	133,02 ± 6,10	139,94 ± 0,54	105,22 ± 7,94	692,30 ± 16,06
<b>Carotenoidi totali estratti in sciroppo BSG tq [µg/g]</b>	105,58 ± 1,27	169,98 ± 5,22	95,18 ± 5,17	93,34 ± 17,09	90,56 ± 0,91	554,63 ± 29,66

L'analisi dei dati ottenuti mette in evidenza come il totale dei carotenoidi estratti usando il Metodo 3 sia significativamente superiore rispetto a quello ottenuto con gli altri due metodi. Si ricorda infatti che la biomassa usata per questa estrazione, a parità di terreno di coltura, è la stessa usata negli altri metodi. Analizzando nel dettaglio si nota come il secondo ciclo di estrazione con DMSO sia il più efficace in termini di quantità estratta, sia per quanto riguarda il terreno YM che lo sciroppo di BSG tq usato.

Con il procedere dei cicli successivi al secondo, si osserva una tendenza alla diminuzione della quantità di carotenoidi estratti.

In Figura 57 si presenta la colorazione del pellet e del surnatante sia per quanto riguarda l'estrazione dei carotenoidi su sciroppo di BSG tq che quelli in YM a seguito di ogni ciclo di estrazione. In questo caso si ha una variazione cromatica importante raggiungendo la completa decolorazione della biomassa al termine del protocollo di estrazione.



**Figura 57:** Osservazione della colorazione del pellet e del surnatante a seguito dei cicli di estrazione con il Metodo 3.

Osservando le immagini relative al processo di estrazione in Figura 57, il primo fenomeno che emerge è la variazione cromatica del pellet, che a seguito dei vari cicli di estrazione assume una tonalità sempre più grigiastrea. Questo fenomeno, come riportato in letteratura (Cheng et al., 2016; Lopes et al., 2017) è indice di una buona riuscita del processo estrattivo. Il progressivo declino dell'estrazione di carotenoidi nei cicli successivi, evidente dai valori decrescenti dei carotenoidi totali estratti, come riportato in Tabella 19, trova riscontro anche nell'osservazione della variazione cromatica sia del pellet che del surnatante, mostrata in Figura 57. Con il ripetersi dei cicli di estrazione, la colorazione di entrambi cambia e diventa progressivamente meno intensa, ad indicare che la disponibilità dei carotenoidi nella biomassa si riduce progressivamente.

Un ulteriore punto di riflessione riguarda il ciclo 2 di estrazione con DMSO, durante il quale si è registrato il massimo quantitativo di carotenoidi estratti, come riportato in Tabella 19. Questo risultato è visibile anche nella colorazione particolarmente intensa del surnatante, che appare di un rosso molto vivido, indice di una presenza elevata di carotenoidi nel surnatante. Infine, analizzando nel dettaglio l'evoluzione del pellet dal ciclo 1 fino all'ultimo ciclo, si nota un progressivo schiarimento della tonalità, che passa da un arancione iniziale ad una

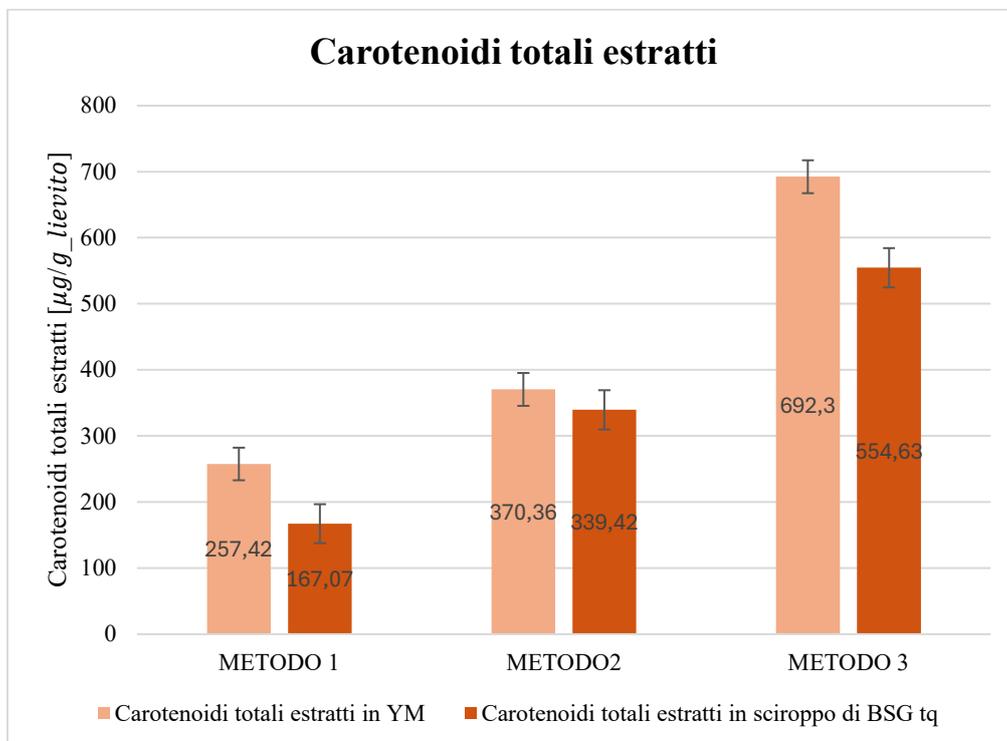
gradazione sempre più chiara, fino a raggiungere una colorazione grigiastra sintomo del fatto che tutti i carotenoidi disponibili sono stati estratti. Per tale ragione l'osservazione attenta della colorazione del pellet e del surnatante offre un metodo visivo immediato per monitorare l'andamento del processo di estrazione e può servire come indicatore immediato del successo del protocollo di estrazione impiegato.

### 3.5.7.4 Confronto tra i protocolli di estrazione dei carotenoidi

Dopo aver eseguito i protocolli di estrazione dei tre metodi descritti nel paragrafo 2.7.2, è fondamentale procedere con valutazioni di tipo quantitativo e qualitativo. Le valutazioni quantitative sono riferite alla quantità dei carotenoidi totali estratti calcolati mediante la formula riportata da Cheng et al., (2016) nel paragrafo 2.7.1, determinando di conseguenza il metodo più efficiente tra questi.

Un altro aspetto importante per l'ottimizzazione del protocollo di estrazione è la valutazione qualitativa, ossia l'osservazione della colorazione del pellet, ottenuto a fine protocollo di estrazione. Dalla letteratura, si estrapola che l'estrazione dei carotenoidi può ritenersi efficace se la colorazione del pellet a fine protocollo di estrazione risulta essere grigia (Cheng et al., 2016), (Lopes et al., 2017). Al contrario, una colorazione del pellet ancora aranciata indica che il processo di estrazione non è stato efficiente e sarà necessaria una ottimizzazione del protocollo di estrazione.

Inizialmente, i risultati relativi ai carotenoidi totali estratti utilizzando i tre diversi protocolli, vengono presentati attraverso un grafico a barre. Questo grafico permette di effettuare un confronto immediato tra i diversi metodi di estrazione.



**Figura 58:** Confronto dei carotenoidi totali estratti in YM e sciroppo di BSG tq differenziando i tre metodi usati.

Per una maggiore precisione nell'analisi dei risultati, si riportano i valori numerici nella Tabella 20. I dati sono espressi come media e deviazione standard.

**Tabella 20:** Valori dei carotenoidi totali estratti con i tre differenti metodi, espressi in  $\mu\text{g/g}_{\text{lievito}}$ , in YM e sciroppo di BSG tq.

	METODO 1	METODO 2	METODO 3
<b>Carotenoidi totali estratti in YM [<math>\mu\text{g/g}</math>]</b>	257,42 $\pm$ 24,74	370,36 $\pm$ 12,38	692,30 $\pm$ 16,06
<b>Carotenoidi totali estratti in sciroppo BSG tq [<math>\mu\text{g/g}</math>]</b>	167,07 $\pm$ 17,04	339,42 $\pm$ 8,71	554,63 $\pm$ 29,66

Dai risultati emerge chiaramente che il Metodo 3, derivante dal protocollo proposto da Lopes et al., (2017) che prevede diversamente dagli altri due metodi l'uso di DMSO e acetone separatamente, aggiungendo ad ogni ciclo di estrazione solvente fresco riscaldato alla temperatura di 55 °C, risulta essere il metodo più efficace per l'estrazione dei carotenoidi, sia nel caso del terreno YM (692,30  $\pm$  16,06  $\mu\text{g/g}$ ) sia nello sciroppo di BSG tq (554,63  $\pm$  29,66  $\mu\text{g/g}$ ). Nel metodo 2, derivante dal modello di Lopes et al., (2017) e caratterizzato dall'uso di DMSO e acetone separatamente ma senza cambiare solvente fresco, si estrae un quantitativo di carotenoidi circa la metà rispetto al Metodo 3, infatti numericamente abbiamo 370,36  $\pm$  12,38  $\mu\text{g/g}$  carotenoidi estratti in terreno YM ed un quantitativo di 339,42  $\pm$  8,71  $\mu\text{g/g}$  estratti in sciroppo di BSG tq.

Il metodo meno performante è invece il Metodo 1, proposto da Cheng et al., (2016), dove si prevede l'utilizzo di DMSO e acetone applicati contemporaneamente al campione di biomassa, che estrae circa un terzo dei carotenoidi totali ottenibili usando il Metodo 3, con il Metodo 1 si estrae un quantitativo di carotenoidi pari a 257,42  $\pm$  24,74  $\mu\text{g/g}$  in terreno YM e 167,07  $\pm$  17,04  $\mu\text{g/g}$  in sciroppo di BSG tq.

Soffermandoci sul Metodo 3 di estrazione, si nota che la quantità di carotenoidi estratti dal terreno YM (692,30  $\pm$  16,06  $\mu\text{g/g}$ ) è superiore di circa cento unità rispetto a quella ottenuta dallo sciroppo di BSG tq (554,63  $\pm$  29,66  $\mu\text{g/g}$ ), tuttavia, si può affermare che lo sciroppo di BSG, derivante da un rifiuto di scarto del processo di produzione dell'industria birraia, rappresenta un terreno di coltura valido e competitivo, paragonabile anche ad un terreno ricco come YM per quanto concerne la quantità di carotenoidi sintetizzati ed accumulati nella biomassa. Tuttavia, si ricorda che con lo sciroppo di BSG tq la quantità di biomassa ottenuta è inferiore rispetto a quella ottenuta con il terreno YM.

La valutazione di tipo qualitativa è invece relativa alla colorazione del pellet risultante a fine protocollo di estrazione di ogni metodo usato e si rimanda alla descrizione dei paragrafi precedenti a seguito di ciascun metodo.

Si può imputare l'efficienza del Metodo 3 al fatto che si cambia il solvente estraente a seguito di ogni ciclo, a differenza di quello che avveniva con il Metodo 2. Infatti, quando si sostituisce il solvente saturo (che ha perso la sua capacità estrattiva) con uno nuovo, si ripristina il potenziale estrattivo, in quanto il solvente fresco può dissolvere nuove molecole di carotenoidi che non erano state estratte nei cicli precedenti.

## 4. Conclusioni e futuri sviluppi

In questo lavoro di tesi è stato usato il BSG, brewers' spent grain, un prodotto di scarto agroindustriale, ottenuto dal processo di birrificazione, per la produzione di uno sciroppo da utilizzare come terreno di coltura per la crescita del lievito *Rhodotorula mucilaginosa*.

Lo scopo è quello di andare a produrre carotenoidi, biopigmenti di interesse industriale, mediante fermentazioni in fase liquida.

Alla luce dei risultati ottenuti, si possono effettuare le seguenti conclusioni:

- Lo sciroppo di BSG tal quale, ottenuto mediante estrazione in autoclave per 20 minuti a 121 °C, si è rivelato essere un buon terreno di coltura per *R. mucilaginosa*.
- Con lo sciroppo di BSG tq si ha per 72 ore di fermentazione un pH in un range, compreso tra 5 e 5.5, compatibile con la crescita del lievito e la produzione di carotenoidi.
- Per avere un'idea di quali siano le limitazioni per la produzione di biomassa e carotenoidi, durante tutto il corso della fermentazione si monitorano:
  - D-glucosio poiché se questo nutriente diventasse limitante, la crescita cellulare e la produzione di carotenoidi si potrebbe arrestare.
  - pH in quanto affinché si abbia la massima resa in biomassa e produzione di carotenoidi da parte di *R. mucilaginosa* è necessario che il parametro sia in un intervallo specifico altrimenti si ha un effetto inibente.
- L'aggiunta di glucosio o glicerolo e cloruro di ammonio, in diverse concentrazioni, allo sciroppo di BSG tq non ha portato miglioramenti significativi dal punto di vista della biomassa prodotta e dei carotenoidi accumulati.
- In colture in beuta, condotte a 25 °C e 150 rpm, è stato possibile valutare che:
  - La concentrazione più alta della biomassa si ottiene dopo 48 ore di fermentazione con un valore pari a  $4,107 \pm 0,031$  [g/L].
  - Il quantitativo totale di carotenoidi estratti maggiore è stato ottenuto dopo 72 ore di fermentazione con un valore di  $107,813 \pm 21,843$  [ $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{lievito}}$ ], corrispondente ad una concentrazione di  $370,122 \pm 2,359$  [ $\mu\text{g}/\text{L}$ ].
- L'ottimizzazione del protocollo di estrazione è stata condotta da un punto di vista quantitativo e qualitativo: il metodo che prevede l'uso di DMSO per quattro cicli (aggiungendo a seguito di ogni ciclo il solvente fresco) e acetone nell'ultimo ciclo ha estratto un quantitativo superiore di carotenoidi rispetto agli altri protocolli testati e l'analisi della colorazione del pellet risultante ha mostrato una colorazione grigiastra confermando la buona riuscita del processo estrattivo.

Il progetto ha dimostrato che le trebbie esauste possono essere riutilizzate e valorizzate in un modo etico, sostenibile e in un'ottica di economia circolare: lo sciroppo prodotto a partire dal BSG si è rilevato essere un buon terreno di coltura per la crescita di *R. mucilaginosa*. I pigmenti prodotti dal lievito dopo 72 ore di fermentazione nello sciroppo di BSG e successivamente estratti non sono di molto inferiori a quelli prodotti utilizzando un terreno ricco come YM utilizzato come controllo, se si considerano le deviazioni standard (i carotenoidi totali estratti sono di  $117,674 \pm 31,147$  [ $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{lievito}}$ ] e  $106,453 \pm 28,964$  [ $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{lievito}}$ ] a 48 e 72 ore di fermentazione rispettivamente). Sebbene il processo non sia ancora stato sviluppato su scala industriale, i dati ottenuti indicano che vi è la possibilità di utilizzare scarti agroalimentari per produrre metaboliti di interesse industriale in quanto da una parte si riducono i costi di produzione legati alle materie prime per la loro produzione, dall'altro si ha un approccio sostenibile e innovativo, che diminuisce la quantità di scarti e l'impatto ambientale.

Le prospettive future potrebbero muoversi in varie direzioni:

- Ci si può concentrare sullo scale-up valutando come cambiano i risultati con prove in bioreattore.
- Si potrebbero trovare combinazioni promettenti per quanto concerne l'ottimizzazione del rapporto C/N: ad esempio monitorando attentamente il pH ed agendo eventualmente con l'uso di soluzioni tampone per riportare il parametro in un range ottimale per *R. mucilaginosa*.
- Si potrebbero introdurre componenti nel medium di coltura che provocano un livello adeguato di stress come il perossido di idrogeno (Marova et al., 2004) e valutare se si assiste ad un incremento nella produzione di carotenoidi.
- Si potrebbe considerare l'influenza dell'aerazione nei processi fermentativi ma anche se l'aggiunta di ioni metallici, sali, o l'alternanza del ciclo buio/luce con l'utilizzo della luce LED favorisce la crescita del lievito e la produzione di importanti metaboliti.
- Si può variare il protocollo di estrazione dei carotenoidi con l'uso di solventi ecologici ed ecocompatibili per ridurre l'impatto ambientale del processo.

## 5. Bibliografia

Bianco, A., Budroni, M., Zara, S. *et al.* The role of microorganisms on biotransformation of brewers' spent grain. *Appl Microbiol Biotechnol* 104, 8661–8678 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10843-1>.

Lynch K.M., Steffen E.J., Arendt E.K. (2016). Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. *J Inst Brewing* 122(4): 553–5681.

Castro, L.E.N., Colpini, L.M.S. All-around characterization of brewers' spent grain. *Eur Food Res Technol* 247, 3013–3021 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03860-5>.

Casas-Godoy, L., González-Escobar, J.L., Mathis, A.G. *et al.* Revalorization of untreated Brewer's spent grain: novel and versatile feedstock to produce cellulases, lipases, and yeast biomass in a biorefinery approach. *Biomass Conv. Bioref.* 13, 1659–1670 (2023). <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01157-3>.

Nyhan L, Sahin AW, Schmitz HH, Siegel JB, Arendt EK. Brewers' Spent Grain: An Unprecedented Opportunity to Develop Sustainable Plant-Based Nutrition Ingredients Addressing Global Malnutrition Challenges. *J Agric Food Chem.* (2023 Jul 19);71(28):10543-10564. doi: 10.1021/acs.jafc.3c02489. Epub 2023 Jul 10. PMID: 37428126; PMCID: PMC10360159.

Chetrariu, A.; Dabija, A. Spent Grain: A Functional Ingredient for Food Applications. *Foods* 2023, 12, 1533. <https://doi.org/10.3390/foods12071533>

Mussatto, S. I., Dragone, G., & Roberto, I. C. (2006). Brewers' spent grain: Generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, 43(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.06.001>.

Mussatto, S. I. (2014 May). Brewers' spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. *J Sci Food Agric.* 94(7):1264-75. Doi: 10.1002/jsfa.6486. Epub 2014 Jan 24. PMID: 24254316.

Forna D., Valorizzazione degli scarti di birrificazione: processi di fermentazione con *R. mucilaginosa* per la produzione di carotenoidi. (2022). Politecnico di Torino.

Lopes, F. C., Ligabue-Braun, R. Agro-Industrial Residues: Eco-Friendly and Inexpensive Substrates for Microbial Pigments Production. *Frontiers in Sustainable Food Systems.* (March 2021). <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.589414>.

Mussagy, C.U., Ribeiro, H.F., Santos-Ebinuma, V.C. *et al.* *Rhodotorula* sp.-based biorefinery: a source of valuable biomolecules. *Appl Microbiol Biotechnol* 106, 7431–7447 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12221-5>.

Rodrigues, T. V. D., Amore, T. D., Teixeira, E. C., & Burkert, J. F. de M. (2019). Carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa* in Batch and Fed-Batch fermentation using agroindustrial byproducts. *Food Technology and Biotechnology.* (come google dice che si fa bibliografia Harvard). <https://doi.org/10.17113/ftb.57.03.19.6068>

Cutzu, R. (2013). *Produzione di carotenoidi in Rhodotorula glutinis su glicerolo*. Università degli studi di Sassari.

Sharma, R., Ghoshal, G. (2019). Optimization of carotenoids production by *Rhodotorula mucilaginosa* (MTCC-1403) using agro-industrial waste in bioreactor: A statistical approach. *Biotechnology Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00407>

Torres-Alvarez D., León-Buitimea A., Albalade-Ramírez A., Rivas-García P., Hernández-Núñez E., Morones-Ramírez J.R. (2022). Conversion of banana peel into diverse valuable metabolites using an autochthonous *Rhodotorula mucilaginosa* strain. *Microbiological Cell Factories*.  
<https://link.springer.com/article/10.1186/s12934-022-01834-0>

Ghilardi C., Sanmartin N.P., Carelli A.A., Borroni V. (2020). Evaluation of olive mill waste as substrate for carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Bioresources and Bioprocessing*.  
<https://link.springer.com/article/10.1186/s40643-020-00341-7>

Costa W.A.D., Padilha C.E.D.A., Júnior S.D.D.O., Silva F.L.H.D., Silva J., Ancântara M.A., Ferrari M., Santos E.S.D. (2020). Oil-lipids, carotenoids and fatty acids simultaneous production by *Rhodotorula mucilaginosa* CCT3892 using sugarcane molasses as carbon source. *Brazilian Journal of Food Technology*. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.06419>

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

Allahkarami, S., Sepahi, A., A., Hosseini, H., Razavi, M., R. (2021). Isolation and identification of carotenoid-producing *Rhodotorula* sp. from Pinaceae forest ecosystems and optimization of *in vitro* carotenoid production. *Biotechnology Reports*.  
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00687>

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

Igreja, W. S., Maia, De Andrea F., Lopes, A. S., Chisté, R. C. (2021). Biotechnological production of carotenoids using low-cost substrates is influenced by cultivation parameters: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16).  
<https://doi.org/10.3390/ijms22168819>

Tazzini N. (2 novembre 2021). Carotenoidi: definizione, struttura, classificazione. *Nutrizione*. Tuscany Diet.

Paul D., Kumari P.K., Siddiqui N. (2023). Yeast Carotenoids: Cost-Effective Fermentation Strategies for Health Care Applications. *Fermentation*.; 9(2):147.  
<https://doi.org/10.3390/fermentation9020147>

Lopes N.A., Remedi R.D., Dos Santos Sá C., Burkert C.A.V., De Medeiros Burkert J.F. (2017 May 29). Different cell disruption methods for obtaining carotenoids by *Sporodiobolus*

*pararoseus* and *Rhodothorula mucilaginosa*. Food Sci Biotechnol.;26(3):759-766. doi: 10.1007/s10068-017-0098-y. PMID: 30263601; PMCID: PMC6049574.

Marova I., Breierová E., Kočí R., Friedl Z., Slovak B., Pokorna J., (2004). Influence of exogenous stress factors on production of carotenoids by some strains of carotenogenic yeasts. Annals of Microbiology. 54. 73-85.

## Ringraziamenti

Desidero esprimere la mia più profonda gratitudine alla Professoressa Bosco per la sua disponibilità e presenza costante durante tutto il percorso di questo studio sperimentale. Le sue intuizioni, i suoi consigli e la sua competenza professionale hanno arricchito notevolmente le mie conoscenze, permettendomi di approfondire e completare questa tesi raggiungendo gli obiettivi prefissati. La ringrazio per aver creduto in me dandomi l'opportunità di realizzare questo lavoro e per avermi fornito gli strumenti necessari per crescere come studentessa e come professionista.

Un sentito ringraziamento va alla Dottoressa Mollea che con rigore e dedizione mi ha seguita durante tutto il percorso, dedicandomi tempo e risorse fondamentali e contribuendo in modo significativo alla mia formazione. Il suo sostegno è stato cruciale non solo per lo svolgimento di questo lavoro, ma anche per il consolidamento delle mie competenze, che saranno preziose nel mio futuro professionale. Il suo costante incoraggiamento mi ha permesso di superare le difficoltà con maggiore sicurezza e consapevolezza.

Un enorme ringraziamento va a Giovanni per la tua infinita pazienza, per tutto quello che fai per rendermi felice e per il tuo amore. I momenti di studio condivisi, la tua presenza costante ed ogni attimo che abbiamo trascorso insieme hanno reso tutto molto più gestibile e sereno. Sono estremamente fortunata ad averti nella mia vita e non riesco ad immaginare come avrei potuto affrontare questo percorso universitario senza di te al mio fianco. Sei un confidente sincero ed un pilastro fondamentale nella mia vita. La tua capacità di comprendermi senza bisogno di parole, il tuo sostegno nei momenti di sconforto ed il tuo entusiasmo ad ogni mio successo hanno fatto una grande differenza in questi anni.

Un ringraziamento speciale va a Giuse per il modo unico in cui arricchisci e completi la mia vita. Sei da sempre la mia fonte di ispirazione più grande, un modello a cui tendere e non solo mia sorella, ma anche la mia migliore amica. I ricordi più belli della mia vita sono tutti legati a te, dalle gite fuori porta agli aperitivi, dalle giornate di shopping sfrenato durante i tuoi anni universitari fino alle nostre avventure condivise. Ti ringrazio per il tuo supporto e per la tua capacità di aiutarmi a vedere sempre le cose da prospettive differenti. Ma soprattutto ti ringrazio perché grazie a te non conoscerò mai cosa vuol dire la solitudine sapendo che qualunque cosa accada potrò sempre contare su di te e tu ci sarai. Sei davvero speciale ed insostituibile.

Infine, il ringraziamento più grande lo dedico ai miei genitori, che pongo alla fine perché nessuna riga scritta fino a questo punto sarebbe stata possibile senza di voi. Il vostro sostegno quando ne avevo più bisogno, la vostra fiducia nei momenti di sconforto ed il vostro amore incondizionato sono stati essenziali per arrivare fin qui. Senza di voi tutto questo non sarebbe stato possibile. Grazie per avermi sempre incoraggiata a non mollare e per avermi fornito il supporto emotivo e pratico di cui avevo bisogno. Avete creato un ambiente pieno di amore e sicurezza che mi ha permesso di crescere, essere felice e prosperare. I vostri sacrifici per non farmi mancare niente, le notti insonni per cercare di tranquillizzarmi, tutti i consigli che alla fine si sono sempre rivelati essere i migliori e tutti gli insegnamenti che mi avete dato mi hanno reso ciò che sono oggi e non lo dimenticherò mai. Non posso esprimere a parole quanto sia grata di avervi come genitori, siete il mio punto di riferimento ed il mio esempio più grande e tutto ciò che ho realizzato lo devo a voi.