

## **Task 4.2: SCO (Single Cell Oils) da scarti agroalimentari per biodiesel e biolubrificanti**

### **4.2.1 Breve stato dell'arte e riferimenti alla valenza di innovazione scientifica, economica e sociale dell'azione (max 1 pagina)**

La bioeconomia costituisce uno dei settori prioritari su cui si focalizza l'impegno della Comunità Europea per lo sviluppo e l'innovazione nei programmi strategici di ricerca, in particolare nell' SC 2. Food security, sustainable agriculture and forestry, marine and maritime and inland water research and the Bioeconomy: Innovative, Sustainable and Inclusive Bioeconomy (ISIB) di Horizon 2020. Lo sviluppo di nuove tecnologie nell'ambito della bioeconomia costituisce una importante opportunità per il mondo agricolo, che oggi è sempre più rivolto a nuove sfide come la produzione di nuovi materiali, di energia, di altri beni no-food anche tramite il recupero e la valorizzazione degli scarti; la bioeconomia può inoltre contribuire a migliorare l'efficienza economica e la redditività dei sistemi agricoli. A livello nazionale il Piano Strategico per l'Innovazione e la Ricerca nel Settore Agricolo, Alimentare e Forestale 2014-2020 dà ampio spazio alla bioeconomia, in particolare nell' Area 5 "Utilizzo sostenibile delle risorse biologiche a fini energetici e industriali" che prevede come obiettivo specifico lo "Sviluppo di processi sostenibili per la produzione di bioprodotti e biocombustibili attraverso schemi di bioraffinerie multiprodotto adattati alle biomasse disponibili localmente", i cui risultati attesi sono lo sviluppo dell'economia rurale, la valorizzazione di aree marginali e/o degradate e l'attivazione di nuove filiere per la valorizzazione di residui agricoli e scarti agroindustriali. La produzione di oli utilizzabili come biocombustibili o biolubrificanti mediante biotecnologie microbiche che utilizzano come substrati effluenti e scarti delle filiere agricole e agroindustriali risponde a tutte queste esigenze, ed in più contribuisce a ridurre il problema della competizione delle filiere degli oli vegetali a destinazione alimentare rispetto alle coltivazioni non-food, in quanto gli oli di origine microbica sono ottenuti in impianti industriali e pertanto non richiedono consumo di superfici agricole.

La produzione di single cell oils (SCOs), lipidi prodotti da microrganismi oleaginosi, rappresenta un'importante opportunità per le biotecnologie industriali; difatti numerosi microrganismi oleaginosi (lieviti e funghi) cresciuti su substrati zuccherini accumulano composti lipidici nella cellula quando viene esaurito un nutriente nel mezzo di crescita, usualmente l'azoto. Diversi studi sono stati condotti per valutare la possibilità di ottenere SCO da microrganismi cresciuti su substrati zuccherini quali glucosio, melasso, zuccheri di origine lignocellulosica, glicerolo, siero di latte, permeato di siero di latte, N-acetil glucosamina ed altri, in molti casi ottenendo buone rese di fermentazione grazie alle elevate produzioni di biomassa e/o di composti lipidici accumulati dalla biomassa. A titolo di esempio, sono state riportate rese di fermentazione con *Cryptococcus curvatus* pari a 20 g/l di SCO in siero di latte deproteinato e 22 g/l usando glicerolo grezzo come substrato. Sia la quantità di composti lipidici accumulati nella cellula che la composizione in acidi grassi (saturi-mono o poliinsaturi, o con catene di diversa lunghezza) possono variare in funzione della tipologia del substrato, delle condizioni fisiologiche di crescita (temperatura, disponibilità di ossigeno, pH) e del ceppo di microrganismo; per questo motivo è necessario per ogni tipo di substrato preso in considerazione individuare il microrganismo e le condizioni ottimali per massimizzare le rese ed orientare le caratteristiche qualitative dell'olio (ad es. le proprietà lubrificanti e antiossidanti). L'utilizzo di effluenti delle attività agricole ed agroindustriali come substrati di crescita costituisce un'ottima opportunità in quanto consente di ridurre i costi di processo, ma contemporaneamente impone una messa a punto specifica delle condizioni tecnologiche ottimali.

#### **4.2.2 Profilo ed esperienza dei proponenti e partecipanti in relazione all'attività (riportare anche max 5 pubblicazioni in totale) (max 1 pagina)**

Presso il GR di Torino del CREA-RPS nel corso degli ultimi cinque anni sono stati condotti e coordinati progetti di ricerca finalizzati alla valorizzazione in bioraffineria di scarti e residui di filiere agricole ed agroindustriali, con l'ottenimento di fonti di energia rinnovabili, di biomasse microbiche e di biomolecole ad alto valore aggiunto. Le competenze del GR di Torino sono particolarmente sviluppate nell'ambito della microbiologia applicata a processi biotecnologici di interesse per il settore agrario; sono state svolte ricerche nell'ambito delle fermentazioni di scarti ed effluenti (scarti del settore frutticolo, siero di latte e scotta) per la produzione di bioenergie (bioetanolo, biogas) e biomolecole (bioplastiche) (Progetto Biomolener, Bando Bioenergie MiPAAF 2007; Progetto Combufrutta, PSR Regione Piemonte). In particolare sono state condotte ricerche finalizzate alla produzione di SCO da funghi filamentosi cresciuti su siero di latte misto a digestato di liquami zootecnici (Progetto VEROBIO, Bando Bioenergie MiPAAF 2007) ed alla produzione di pigmenti da biomasse microbiche cresciute utilizzando come substrato glicerolo proveniente come scarto dalla filiera del biodiesel (progetto LIEBIG, Bando Bioenergie MiPAAF 2007). Inoltre sono state condotte numerose ricerche sul metabolismo lipidico di *Saccharomyces cerevisiae*, con particolare riferimento all'effetto delle basse temperature, della disponibilità di ossigeno e della composizione del substrato sulla composizione quali/quantitativa della componente lipidica cellulare.

Il ruolo del GR di Torino come Unità Operativa del progetto consisterà nella messa a punto della tecnologie fermentative più idonee al conseguimento delle migliori rese di oli con caratteristiche specifiche di idoneità per l'uso come biolubrificanti o biocombustibili, con particolare riferimento alla valutazione di differenti microrganismi, allo studio degli aspetti fisiologici ed all'ottimizzazione dei substrati di crescita.

#### **Task leader:**

**Laura Bardi** - UO CREA-RPS, Laurea in Scienze Agrarie (Università di Torino 1986), Agronomo, Enologo (Ministero dell'Agricoltura L. 10/04/1991 n. 129) e Consulente Tecnico del Giudice del Tribunale di Torino. Ricercatore degli Istituti di Ricerca e Sperimentazione Agraria del Ministero dell'Agricoltura dal 1989 presso l'Istituto Sperimentale per l'Enologia (Sez. Microbiologia); Primo Ricercatore dal 1997 presso l'Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante. Direttore di Sezione Incaricato della SOP di Torino del CREA-Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante dal 2004. Dirigente di Ricerca del CREA-RPS Responsabile del Gruppo di Ricerca di Torino dal 2007. Professore a contratto di Microbiologia Agroalimentare per l'Università del Piemonte Orientale (2004-06) e di Chimica delle Fermentazioni e Microbiologia Industriale per l'Università di Torino (1999-2003). Docente della Scuola di Biodiversità e Bioindicazione della Società Italiana di Scienza del Suolo (dal 2011). Ricercatore Associato presso il Dipartimento di Chimica Generale ed Organica Applicata, Università di Torino (2001-04), presso il Centro di Micologia del Suolo del Consiglio Nazionale delle Ricerche (1997-2001) e presso l'Istituto di Genetica dell'Università di Parma (1990-91). Membro del Comitato Scientifico della Piattaforma Nazionale IT-SusChem, Sez. Biotecnologie Industriali. Membro del Comitato Scientifico per la Convenzione di collaborazione fra Regione Piemonte e CREA (22.05.2007 art. 4). Membro dell'Editorial Board of the Journal of Micology (Hindawi) e peer reviewer per riviste numerose scientifiche internazionali. Membro di Società Scientifiche: Società Italiana di Microbiologia Agraria, Alimento e Ambientale (SIMTREA), Società Italiana di Scienza del Suolo (SISS), International Soil Science Society (ISSS), Società Italiana di Microbiologia Generale e Biotecnologie Microbiche (SIMGBM), Federazione Italiana Scienze della Vita (FISV), Federation of European Microbiological Societies (FEMS).

Principali linee di ricerca: Utilizzo di microrganismi per la produzione di energia da fonti rinnovabili; Valorizzazione di scarti agricoli ed agroindustriali in bioraffinerie; Bonifica di suoli ed

acque ad uso agrario contaminati da xenobioti organici mediante bioremediation e rhizoremediation; Gestione della microflora rizosferica di piante di interesse agrario in funzione della fertilità biologica e della protezione da stress abiotici; Studio della fisiologia cellulare di microrganismi eucariotici in funzione della gestione della fermentazione alcolica.

#### Pubblicazioni

- Bardi L, Benedetti A, 2012. L'azienda agricola del futuro è una bioraffineria sostenibile. *Terra e vita*, 29-30, 10-11.
- Cutzu R, Coi A, Rosso F, Bardi L, Ciani M, Budroni M, Zara G, Zara S, Mannazzu I, 2013. From crude glycerol to carotenoids by using a *Rhodotorula glutinis* mutant. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(6), 1009-1017.
- Mannazzu I, Angelozzi D, Belviso S, Budroni M, Farris GA, Goffrini P, Lodi T, Bardi L, 2008. Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during adaptation to unfavourable conditions of fermentation: cell lipid composition, membrane integrity, viability and fermentative activity. *International Journal of Food Microbiology*, 121(1), 84-91.
- Zara G, Angelozzi D, Belviso S, Bardi L, Goffrini P, Lodi T, Budroni M, Mannazzu I, 2009. Oxygen is required to restore flor strain viability and lipid biosynthesis under fermentative conditions. *FEMS Yeast Res*, 9, 217-225.
- Zoppellari F, Bardi L, 2013. Production of bioethanol from effluents of the dairy industry by *Kluyveromyces marxianus*. *New Biotechnology*, 30, 607-613.

#### Collaborazioni esterne:

- L'Azienda Cascina Fontanacervo (Villastellone, Torino) fornirà gli effluenti necessari per le prove. Le analisi gascromatografiche delle componenti lipidiche cellulari con tipizzazione degli acidi grassi verranno effettuate presso la sede di Milano del CREA-IT.

#### **4.2.3 Obiettivi della task**

Obiettivo della ricerca è l'individuazione dei ceppi microbici e delle condizioni tecnologiche ottimali di conduzione del processo fermentativo finalizzato a produrre SCO da biomasse microbiche cresciute su effluenti dell'agroindustria come substrati di crescita, finalizzando in particolare la ricerca all'ottenimento di oli con le specifiche caratteristiche qualitative richieste per l'utilizzo come lubrificanti o combustibili. Si intende in tal modo perseguire il massimo valore aggiunto possibile dal processo e fornire una nuova tecnologia che, inserita in filiere agroalimentari ed agroindustriali, utilizzandone i reflui di origine ad un nuovo co-prodotto.

#### **4.2.4 Descrizione delle attività che saranno sviluppate nella task**

Linea 1: Screening di microrganismi. Verrà effettuata una selezione di ceppi di lieviti e di funghi filamentosi in funzione della massima conversione in olio del lattosio da siero di latte e scotta e di glicerolo di scarto della filiera del biodiesel. Uno screening preliminare verrà effettuato con colture in beuta di ceppi microbici (lieviti e funghi filamentosi) che verranno coltivati utilizzando come substrati siero di latte e scotta, tal quali o addizionati di glicerolo nelle condizioni fisiologiche di crescita ottimali; verranno quantificati la resa in biomassa microbica ed il contenuto lipidico cellulare. Sulla base delle maggiori rese di fermentazione ottenute verranno prescelti i ceppi microbici che verranno utilizzati nelle azioni successive.

Linea 2: Ottimizzazione del substrato e della tecnica fermentativa. La composizione di substrato ottimale verrà individuata mediante saggi di crescita in cui gli effluenti (siero di latte, scotta, glicerolo) verranno miscelati in varie proporzioni, così da bilanciare il contenuto in carboidrati con il contenuto in azoto. Difatti il rapporto C/N è normalmente minore nel siero di latte rispetto alla

scotta; inoltre l'aggiunta di glicerolo grezzo può essere modulata per innalzare in modo controllato il rapporto C/N, così da aumentare le rese in biomassa. L'eventuale efficacia dell'aggiunta di glicerolo come fonte di carbonio anche in fase stazionaria di crescita verrà presa in considerazione come tecnica per indurre l'accumulo di composti lipidici di riserva (tecnica di fermentazione "feast and famine").

Linea 3: Identificazione delle migliori condizioni fisiologiche di crescita. Sia la quantità di biomassa microbica prodotta che il contenuto lipidico cellulare sono condizionati dalle condizioni fisiologiche di crescita: temperatura, pH, disponibilità di ossigeno. Verranno effettuate prove di crescita in bioreattore così da poter controllare tali fattori:

*Temperatura* – La temperatura può differentemente influenzare la resa di fermentazione e la qualità del prodotto. Usualmente alte temperature inducono processi più rapidi con rese maggiori; per ciò che concerne la qualità, invece, le temperature più alte inducono una composizione lipidica con un minore indice di insaturazione degli acidi grassi, mentre le temperature più basse danno origine ad una componente lipidica più ricca in acidi grassi insaturi ed acidi grassi a breve-media catena. Per ciascun ceppo microbico prescelto verranno condotte fermentazioni alle temperature più alta e più bassa del range di termofilia specifico del microrganismo stesso, determinando le corrispettive produzioni di biomassa microbica, contenuto lipidico cellulare e composizione in acidi grassi della componente lipidica, così da individuarne le caratteristiche qualitative più idonee in finzione dell'utilizzo come biolubrificanti e/o biocombustibili.

*Disponibilità di ossigeno*- Le crescite in anaerobiosi conducono di norma a minori produzione di biomassa microbica; d'altro canto l'anaerobiosi può indurre una variazione del profilo in acidi grassi della componente lipidica con incremento del contenuto percentuale in acidi grassi saturi e a media catena. Verrà presa in considerazione anche questa possibilità, valutando se le rese ottenibili sono compatibili con l'esigenza di produrre oli con caratteristiche tecniche peculiari.

Linea 4: Elaborazione dei dati, stesura dell'elaborato scientifico e divulgazione.

#### 4.2.5 Descrizione degli output della task (deliverable)

D.4.2.1 Linea1: Output dell'Attività sulla linea 1.

Pool di ceppi microbici selezionati (da utilizzare nelle fasi successive).

D.4.2.2 Linea 2: Output dell'Attività sulla linea 2.

Definizione del formulato ottimale per l'alimentazione del processo in bioreattore.

D.4.2.3 Linea 3: Output dell'Attività sulla linea 3.

Definizione del protocollo di gestione del processo in bioreattore.

D.4.2.4 Linea 4: Output dell'Attività sulla linea 4.

Trasferimento e divulgazione dei risultati di progetto.

#### 4.2.6. Articolazione temporale delle attività e dei deliverable previsti nella task (Gantt)

		Attività	Deliverable
Quadrimestri	1		
	2		
	3	Linea 1	D.4.2.1
	4		
	5		
	6	Linea 2	D.4.2.2
	7		
	8		
	9		

	10		
	11	Linea 3	D.4.2.3
	12		
	13		
	14	Linea 4	D.4.2.4
	15		

#### ***4.2.7 Risultati attesi, ricadute e benefici, ostacoli prevedibili ed azioni correttive***

La produzione di biocombustibili e biolubrificanti per via biotecnologica da biomasse microbiche può contribuire a ridurre il problema del consumo di SAU per usi non-food. Inoltre con un processo di tipo industriale è più agevole, rispetto alle produzioni vegetali, modulare la qualità del prodotto, in quanto il controllo delle condizioni di processo in bioreattore consente di intervenire sulla fisiologia dei microrganismi, indirizzandola alle finalità ricercate.

La nuova tecnologia sviluppata consentirebbe inoltre di valorizzare scarti ed effluenti di altre filiere agricole ed agroindustriali, migliorando il valore aggiunto complessivo e riducendo i costi di smaltimento e l'impatto ambientale della filiera nel suo complesso.

La messa a punto di nuovi processi dà origine come indotto all'opportunità di creazione di nuove figure professionali, con conseguente creazione di manodopera e nuove imprese.

La base di screening di microrganismi potrebbe dover essere ampliata se ad una prima disamina non dovessero essere identificati ceppi con caratteristiche idonee.

#### ***4.2.8 Piano di sfruttamento e divulgazione dei risultati***

Sarà valutata la possibilità di realizzare brevetti relativamente alla tecnologia di produzione di biolubrificanti da biomasse microbiche.

I risultati di progetto verranno divulgati mediante pubblicazioni su riviste nazionali ed internazionali, scientifiche e tecniche, e mediante presentazione in congressi e seminari.

#### ***4.2.9 Tabelle delle richieste finanziarie per singola azione***

**Tabella 4.2.9.1:** Attrezzature tecnico-scientifiche di cui si richiede il finanziamento.

**Tabella 4.2.9.2:** Richiesta complessiva di finanziamento per la task.