

Progetto ricrea



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI BRESCIA

**SISTEMI
AMBIENTALI**



**PROMOCOOP
LOMBARDIA**

In collaborazione con



Progetto presentato a valere sul bando per il cofinanziamento di progetti di ricerca volti allo sviluppo di tecnologie per la prevenzione, il recupero, il riciclaggio ed il trattamento di rifiuti non rientranti nelle categorie già servite da consorzi di filiera, all'ecodesign dei prodotti e alla corretta gestione dei relativi rifiuti.

Progetto cofinanziato dal Ministero della Transizione Ecologica-Direzione Generale Economia Circolare.



MINISTERO DELLA
TRANSIZIONE ECOLOGICA

Progetto RICREA

Rifiuti cerealicoli per il biorisanamento

Deliverable D2.1

RELAZIONE SUI BIOSURFATTANTI PRODOTTI DAI RESIDUI DELLE COLTIVAZIONI CEREALICOLE

Aprile 2023

Progetto di ricerca RICREA “Rifiuti cerealicoli per il biorisanamento”

Partner del progetto:

Università degli Studi di Brescia, Dipartimento DICATAM
BioC-CheM Solutions, Milano
Sistemi Ambientali, Calcinato (BG)
Quadrifoglio Cooperativa, Castellucchio (MN)
Promocop Lombardia, Milano

Con il contributo di:

Ministero della Transizione Ecologica - Direzione generale Economia Circolare (DG EC)

© Copyright 2022 Università degli Studi di Brescia

Piazza del Mercato, 15 - 25121 Brescia | Partita IVA: 01773710171 | Codice Fiscale: 98007650173 |

E-mail: progetto.ricrea@unibs.it

Sito web del progetto RICREA: <https://www.progetto-ricrea.org/>

ALL RIGHTS RESERVED

INDICE

1. Il Work Package 2 (WP2)
2. Screening e caratterizzazione dei rifiuti cerealicoli
3. Isolamento e selezione di ceppi microbici in grado di produrre più efficacemente
4. Biotensioattivi a partire dai rifiuti cerealicoli
5. Produzione di biotensioattivi con i ceppi microbici produttori di biosurfattanti
6. Conclusioni e prossimi passi

1. Il Work Package 2 (WP2) del Progetto RICREA

Obiettivi del WP2 sono quelli di:

- caratterizzare (dal punto di vista chimico e microbiologico) gli scarti della filiera cerealicola e di isolare/identificare quelli più adatti alla produzione di biosurfattanti (Task 2.1);
- Isolare e selezionare microorganismi produttori di biosurfattanti che possano utilizzare gli scarti cerealicoli come substrati di crescita (Task 2.2)
- produrre i biotensioattivi con i ceppi microbici selezionati nel Task 2.2, cresciuti sugli scarti identificati nel Task 2.1 (Task 2.3)
- caratterizzare i biosurfattanti prodotti prodotti nel Task 2.3 (Task 2.4).

Nel primo anno di progetto sono stati completati i tasks 2.1 e 2.2, la produzione dei biosurfattanti su larga scala (Task 2.3) e la caratterizzazione dei surfattanti (Task 2.4) sono in fase avanzata.

2. Screening e Caratterizzazione dei Rifiuti Cerealicoli (Task 2.1) (M1-M4)

Nell'ambito del Task 2.1, BioC-CheM Solutions ha lavorato su cinque scarti agricoli (scarti di farro ed avena, scarti di soia, scarti di pisello proteico, scarti di Mais, scarti di frumento). Ad analisi macroscopica, i residui sono caratterizzati da una prevalenza di glume, glumette, resti di cariossidi e di culmi (cereali), resti di bacelli e semi, foglie e fusti (legumi). Il trattamento degli scarti che è stato adottato nei laboratori di BioC-CheM Solutions è stata la macinatura con un mulino per cereali (Figura 1). Questo trattamento è stato preferito a trattamenti chimici e termici per la sua semplicità e per la possibilità di compiere la sminuzzatura eventualmente direttamente alla fonte presso gli impianti di produzione. Inoltre, trattamenti più drastici (quali la maceratura in presenza di acidi forti ad alte temperature) non hanno mostrato vantaggi rispetto a quanto ottenuto con la sminuzzatura (dato non mostrato). La sminuzzatura è stata seguita da vagliatura su rete (Figura 2 B e C). Il materiale così preparato è stato utilizzato per le fasi successive.



Figura 1. Mulino utilizzato nella sminuzzatura degli scarti cerealicoli



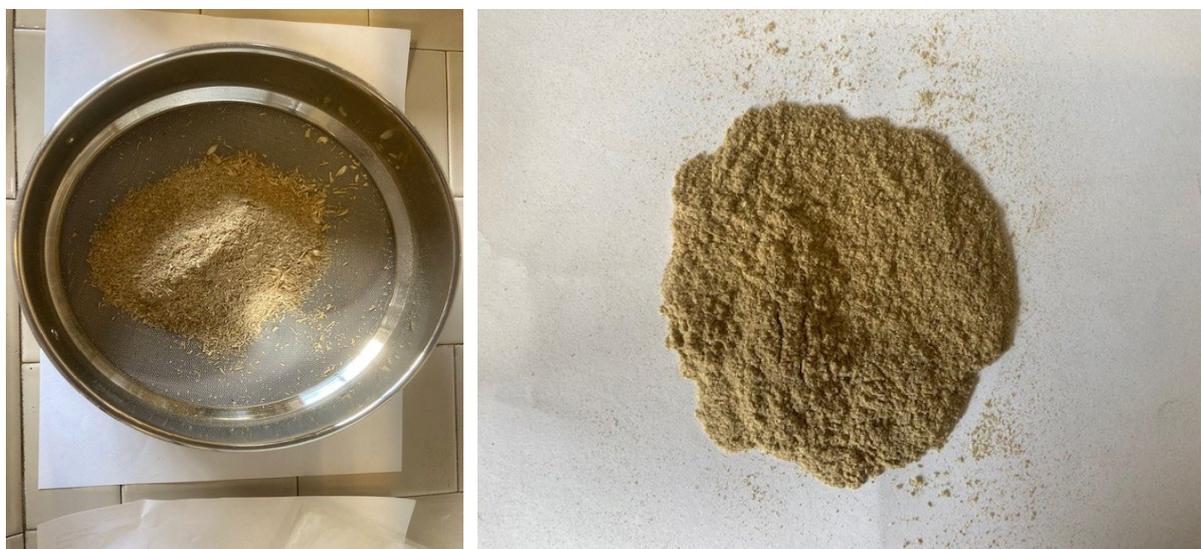


Figura 2. Scarti cerealicoli nelle diverse fasi di trattamento. A) sminuzzatura, B) setacciatura, C) materiale pronto all'uso.

3. Isolamento e Selezione di Ceppi Microbici in Grado di Produrre Più Efficacemente Biotensioattivi a Partire dai Rifiuti Cerealicoli (Task 2.2) (M2- M7)

Su terreni a base di scarti cerealicoli sono stati cresciuti dei microorganismi modello, identificati come produttori di biosurfattanti e disponibili presso BioC-CheM Solutions (Tabella 1).

Tabella 1. Microorganismi modello da utilizzare nel progetto

Genere	specie	ID	Progetto di riferimento	Terreno culturale di riferimento	applicazione	Origine del microorganismo
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	VB3	Kill spill	BCS340	Produzione di surfattina	BioC-CheM Solutions - Confidenziale
<i>Rhodococcus</i>	<i>erythropolis</i>	HF02B	Kill spill	BCS 346 333 242	Biorisanamento e accumulo cesio radioattivo Biosintesi triacilgliceroli	(Dabbs, 1998) (Kurosawa, 2015) (Li, 2015)

					Conversione acrilonitrile in acrilammide Sintesi PHA Biotrasformazione idrocarburi	(Haywood, 1991) (Warhurst, 1994)
<i>Candida</i>	<i>bombicola</i>	KS	Kill spill	BCS 343	Produzione di soforolipidi	BioC-CheM Solutions Confidenziale
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	DS10	Kill spill	BCS 340	Produzione di ramnolipidi	BioC-CheM Solutions Confidenziale

Tra i microorganismi modello utilizzati, tutti hanno dimostrato la capacità di crescere vigorosamente sul terreno formulato come sopra (Unità formanti colonia >10E9). *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* sono stati in grado di produrre un biosurfattante come mostrato in Figura 3.

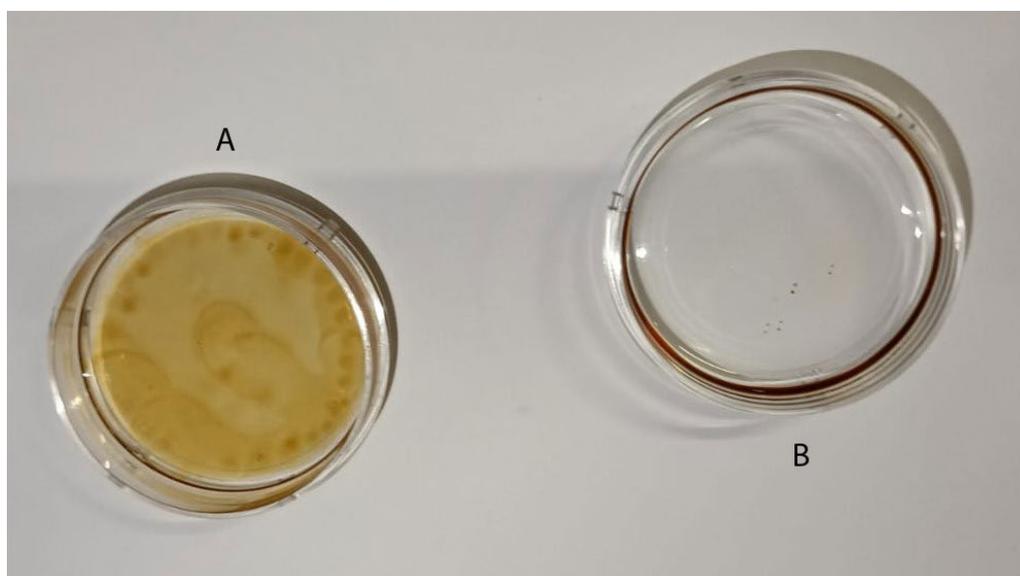


Figura 3. Test dell'alone effettuato con coltura di *Bacillus subtilis* VB3. La rottura della goccia di petrolio testimonia la presenza di biosurfattanti (A: controllo, B: campione). Risultati simili sono stati ottenuti con *Pseudomonas aeruginosa* DS10.

4. Produzione di Biotensioattivi con i Ceppi Microbici Produttori di Biosurfattanti (Task 2.3) (M6-M12)

IDENTIFICAZIONE DEI BIOSURFATTANTI PRODOTTI

In Figura 4 sono mostrati cromatografie TLC dei surfattanti ottenuti da di *Bacillus subtilis* cresciuto su scarti agricoli confrontati con uno standard di surfattina (Sigma-Aldrich). Si conferma che questo ceppo produce surfattina. In Figura 5 sono mostrati cromatografie TLC dei surfattanti ottenuti da colture di *Pseudomonas aeruginosa*, confrontati con uno standard di ramnolipidi. Si conferma che questo ceppo produce ramnolipidi.



Figura 4. TLC *Bacillus subtilis* (surfattina)

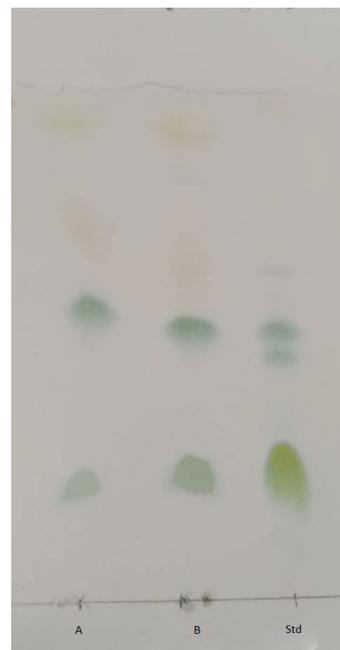


Figura 5. TLC *Pseudomonas aeruginosa* (ramnolipidi)

QUANTIFICAZIONE PRELIMINARE DEI BIOSURFATTANTI PRODOTTI

La produzione di sostanze surfattanti è stata valutata attraverso la determinazione dell'Indice di Emulsificazione (EI24(%)); il test mostra, in modo semplice e immediato, la capacità surfattante dei composti presenti nei brodi di coltura. La valutazione semi-quantitativa della produzione di ramnolipidi da parte di *Pseudomonas aeruginosa* è stata eseguita determinando l'emulsificazione di *n*-esadecano e petrolio con acqua.

Il test condotto utilizzando petrolio ha mostrato un indice di emulsificazione pari al 90%, confermando un potere emulsificante anche nel brodo abiotico, pari al 75% (Figura 6).



Figura 6. Determinazione dell'indice di emulsificazione in colture di *P. aeruginosa*. Da sinistra: controllo abiotico, campione di surnatante del brodo colturale a 144 ore in petrolio

La valutazione della produzione di surfattina da parte di *Bacillus subtilis* è stata eseguita determinando l'indice di emulsificazione attraverso l'utilizzo di *n*-esadecano; la prova ha determinato un valore d'interesse su scarti di pisello, con un indice di emulsificazione pari al 50%. Su scarti di mais e scarti di farro e avena si osserva invece una emulsificazione molto ridotta (Figura 7).

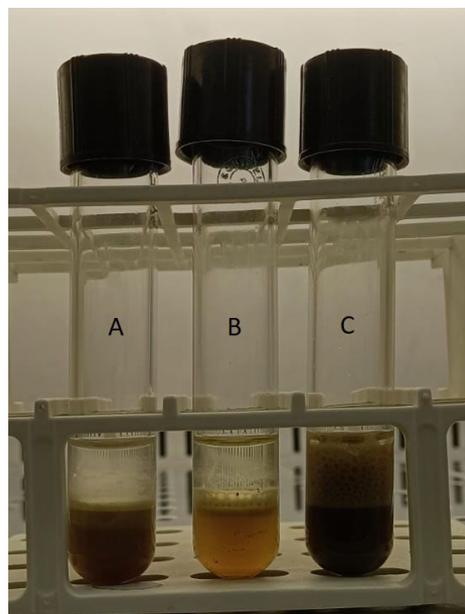


Figura 7. Determinazione dell'indice di emulsificazione in colture di *Bacillus subtilis*. Da sinistra: scarti di farro e avena (A), scarti di mais (B) e scarti di pisello (C). Campione di surnatante del brodo colturale a 144 ore in *n*-esadecano

MIGLIORAMENTO DELLA RESA DEI BIOSURFATTANTI PRODOTTI TRAMITE MODIFICA DEI TERRENI COLTURALI

Sono stati formulati dei terreni (indicati con le lettere da A ad H) basati su scarti cerealicoli adatti all'implementazione della produzione di surfattanti nei microorganismi scelti dalle prove precedenti: *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*.

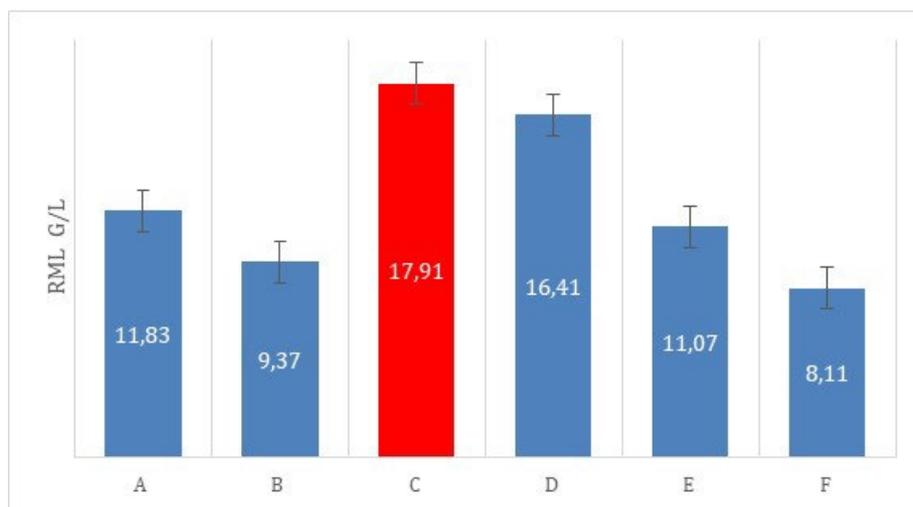


Figura 8. Rappresentazione grafica della produzione ottenuta su terreni complessi

Per ogni terreno formulato, è stata eseguita una titolazione HPLC dei ramnolipidi presenti nel brodo colturale al momento dell'harvest (144 h). Nelle condizioni saggiate, sono stati ottenuti risultati d'interesse con il terreno C (BCS388) e con il terreno D (non ancora codificato). I risultati ottenuti sono sintetizzati in Figura 8.

OTTIMIZZAZIONE DELLA PRODUZIONE DI SURFATTINA IN BACILLUS SUBTILIS

È stato eseguito uno studio preliminare per aumentare la produzione di surfattina da parte di *Bacillus subtilis*, basata sull'esperienza nell'uso degli scarti agricoli ottenuta durante questo lavoro e sull'esperienza aziendale nel campo dei biosurfattanti. Sono state eseguite delle prove di produzione con terreni formulati a partire da scarti agricoli. I valori di produzione di surfattina raggiunti non sono stati incoraggianti (Figura 9) ma sono comunque da intendersi come un punto di partenza per la formulazione di terreni e metodiche di produzione ad hoc per il ceppo in analisi.

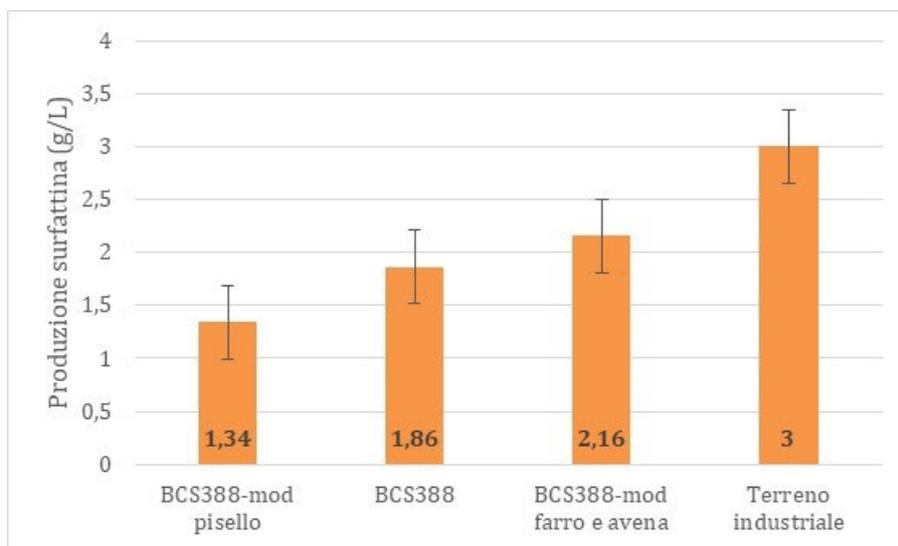


Figura 9. Produzione di surfattina su terreni formulati con miscele di scarti agricoli

5. Conclusioni e Prossimi passi

Il progetto RICREA si propone di congiungere lo smaltimento dei rifiuti provenienti dalle filiere agricole con la produzione di prodotti microbici ad alto valore aggiunto, quali i biosurfattanti. È stato possibile appurare la produzione di biosurfattanti su terreni composti da soli scarti agricoli da parte di *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*. Successivamente, gli scarti agricoli sono stati utilizzati per lo sviluppo di terreni industriali adatti alla produzione di biosurfattanti, ottenendo rese interessanti per *Pseudomonas* e per *Bacillus*. È stato quindi dimostrato come gli scarti agricoli possano essere un terreno di crescita adatto per diverse tipologie di microorganismi e la base per lo sviluppo di terreni industriali adatti alla produzione di prodotti ad alto valore aggiunto.

La produzione dei biosurfattanti su larga scala è in corso presso BioC-CheM Solutions (Task 2.3). La verifica della funzionalità, delle caratteristiche chimiche ed ecotossicologiche dei biosurfattanti prodotti da *Bacillus subtilis* VB3 e *Pseudomonas aeruginosa* DS10 (come previsto dal Task 2.4) sono in corso presso l'Università di Brescia e presso l'Università di Milano Bicocca. Alla luce dei risultati di efficacia e di sicurezza che saranno raccolti, si procederà alla scelta del miglior produttore da utilizzare per le prove applicative e si procederà alla produzione su larga scala per l'applicazione prevista dal WP3.