

Titolo: I microorganismi presenti in natura: “*Ti danno ciò che vuoi, se sai come chiederlo*”

Autori: Francesca Patrignani, Lucia Vannini, Rosalba Lanciotti

Affiliazione: Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari (DISTAL)
Centro Interdipartimentale per la Ricerca Industriale- CIRI AGROALIMENTARE
Alma Mater Studiorum, Università di Bologna

Oggi la scarsità delle risorse planetarie e la necessità di ridurre l’impatto ambientale degli scarti e dei sottoprodotti agroindustriali rende indispensabile il recupero della sostanza organica in questi contenuti e la sua valorizzazione in composti ad alto valore aggiunto. Infatti, scarti e sottoprodotti agro-industriali possono rappresentare, grazie a processi biotecnologici in grado di sfruttare le grandissime potenzialità metaboliche e la biodiversità dei microrganismi, una fonte di molteplici sostanze di pregio inclusi bioetanolo, precursori e componenti per l’industria chimica, farmaceutica e cosmetica ma anche ingredienti per l’industria alimentare o mangimistica (*Liguori et al., 2013*).

Moltissimi sono i microrganismi che in teoria potrebbero essere utilizzati per la valorizzazione della sostanza organica contenuta nei reflui e nei sottoprodotti agro-industriali ma relativamente pochi trovano applicazione industriale.

Infatti, in primo luogo la scelta del microrganismo è subordinata alle caratteristiche chimico-fisiche del substrato che deve essere valorizzato, alle rese e alla velocità di produzione del composto di interesse, alle specifiche che quest’ultimo deve avere in rapporto al settore di re-impiego.

In realtà, le caratteristiche chimico-fisiche dei reflui e degli scarti di lavorazione sono spesso stringenti per molti microrganismi in termini e pertanto operano una prima selezione degli eventuali agenti di bio-trasformazione. Ad esempio sono molti i microrganismi che sono in grado di produrre etanolo anche a partire da scarti e sottoprodotti dell’industria agro-alimentare (*Saeed et al., 2018*). Ad esempio, nell’ambito dei lieviti, le specie più interessanti sono riportate nella **tabella 1**. Tuttavia, le loro possibilità di impiego sono determinate dalla capacità di fermentare le fonti di carbonio presenti nel substrato e dalle rese di fermentazione. Ad esempio se deve essere valorizzato il siero che contiene come zuccheri residui lattosio e galattosio, tra i lieviti dobbiamo scegliere *Kluyveromyces lactis* o *Kluyveromyces marxianus* anche se sono meno alcool tolleranti di *Saccharomyces cerevisiae*, perché quest’ultima specie manca di β -galattosidasi, enzima necessario per la scissione del lattosio in glucosio e galattosio (*Guimaraes et al., 2010*). Se si devono valorizzare residui ligno-cellulosici questi devono essere sottoposti, prima della fermentazione, a diversi trattamenti per distaccare la lignina ed idrolizzare in zuccheri semplici cellulosa ed emicellulose mediante acidi più o meno concentrati o l’impiego di cellulasi generalmente di origine microbica. Sia i pretrattamenti per separare la lignina sia l’idrolisi di cellulose che emicellulose vengono generalmente effettuati ad alte temperature e con alte pressioni che, però, portano alla liberazione, oltre che di zuccheri fermentescibili (pentosi ed esosi), di sostanze tossiche (tra cui acidi acetico formico e paraidrossibenzoico, vanillina, furfurale). Queste contribuiscono a creare un ambiente estremamente selettivo. Pertanto, se non si vuole ricorrere alla detossificazione chimica del mezzo, diventa fondamentale selezionare microrganismi intrinsecamente resistenti alle sostanze tossiche presenti o in grado di convertire in substrati meno tossici. Inoltre, diventa estremamente interessante selezionare microrganismi in grado di utilizzare il maggior numero possibile di substrati presenti con elevate rese in etanolo. Infatti, l’idrolisi di cellulosa ed emicellulosa libera una miscela di zuccheri che includono glucosio, xilosio, mannosio e arabinosio. Non ci sono microrganismi non ingegnerizzati che riescono a metabolizzare efficacemente e rapidamente tutti questi zuccheri in etanolo. Infatti, *S. cerevisiae* (**figura 1**) generalmente fermenta gli zuccheri a 6 atomi di carbonio ma non i pentosi mentre *Pachysolen tannophilus*,

Candida utilis, *Pichia stipitis*, *C. shehatae* sono in grado di utilizzare i pentosi ma con velocità di fermentazione e rese in etanolo molto basse nonché scarsa tolleranza all'etanolo.

Anche nell'ambito dei batteri molte specie sono in grado di produrre etanolo. Le più interessanti sono riportate in **tabella 2**. Tra quelle citate la più interessante per le elevate rese e le scarse esigenze è *Zymomonas mobilis*, batterio Gram negativo, anaerobio facoltativo ed in grado di produrre da glucosio fino a 85 g/l (11% v/v) di etanolo in coltura continua e 127 g/l (16 % v/v) in batch (Saeed et al., 2018). Tuttavia, anche questa specie non è in grado di fermentare i pentosi che si liberano dalle emicellulose. Molto interessanti in questo senso sono alcune specie del genere *Clostridium* e *Thermoanaerobacter* (Scully et al., 2015) perchè in grado di produrre etanolo anche a partire da pentosi o direttamente da amido o cellulosa grazie alle loro attività litiche che liberano zuccheri semplici (**tabella 2**). Si tratta di specie termofile estreme, cioè in grado di sopportare temperature proibitive per la maggior parte degli esseri viventi. D'altra parte, i cosiddetti microrganismi estremofili, cioè in grado di sopravvivere e spesso moltiplicarsi in condizioni estreme di salinità, acidità, pressione e temperatura stanno assumendo sempre maggiore importanza nei processi biotecnologici industriali grazie alla loro versatilità metabolica, alle loro scarse esigenze nutrizionali e alla capacità di operare trasformazioni utili in condizioni avverse per la maggior parte dei microrganismi. Infatti, la pressione selettiva delle nicchie ecologiche di provenienza ha fatto sì che questi microrganismi sviluppassero peculiarità metaboliche, genetiche e di regolazione intra-cellulare straordinarie e per questo, anche a livello europeo, si sta investendo moltissimo per la ricerca su questi microrganismi. Tuttavia, le specie termofile estreme citate nella tabella, pur avendo un enorme potenziale per la produzione di etanolo da residui lignocellulosici, trovano scarsa applicazione perché i processi biotecnologici basati sul loro impiego sono ancora lontani dalla ottimizzazione e dalla validazione in ambiente industriale. Maggiori potenzialità applicative sembrano avere i ceppi ingegnerizzati di *Zymomonas mobilis* in grado di fermentare anche i pentosi grazie all'introduzione dei geni *E.coli* codificanti per il catabolismo dello xilosio quali xilosio isomerasi, xilosio transaldolasi, e xilosiotranschetolasi. I geni per l'utilizzazione dei pentosi sono stati trasferiti anche in ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*, così come sono disponibili a tale scopo ceppi ricombinanti di *Escherichia coli* e *Klebsiella planticola*. In ogni caso, sono ben note le problematiche legate all'impiego dei ceppi ricombinanti quali elevati costi, scarsa stabilità e difficoltà di applicazione su larga scala. Ancora più restrittive sono le possibilità d'impiego di ceppi ricombinanti appartenenti a specie potenzialmente patogene o indicatrici di contaminazione fecale (ad esempio *E. coli*). Infatti, se l'utilizzo di questi microrganismi può essere permesso nel caso di produzione di bio-etanolo o altre sostanze per l'industria chimica o dei materiali, la produzione di molecole/composti/ingredienti riutilizzabili nell'industria alimentare, nella mangimistica o nell'industria farmaceutica e nutraceutica impone l'uso di microrganismi sicuri (GRAS) o l'utilizzo di processi di separazione/purificazione dei composti di interesse in grado di assicurarne purezza e sicurezza. Non di meno, la messa a punto di tali processi è spesso complessa e incide in maniera significativa sui costi di produzione. La riduzione dei costi di produzione notoriamente è estremamente importante per tutte le produzioni industriali, ma è assolutamente indispensabile nel caso della valorizzazione di scarti e sottoprodotti agro-industriali. Al fine di ridurre i costi di produzione è necessario non solo evitare processi di separazione/purificazione complessi e costosi ma anche ottimizzare i processi biotecnologici al fine di massimizzare le rese e ridurre i tempi di produzione. Nel caso della produzione di bioetanolo ad esempio è di estrema importanza individuare, una volta selezionato il ceppo, condizioni in grado di limitare la produzione di sottoprodotti della fermentazione alcolica. Nel caso di impiego di lieviti bisogna scegliere condizioni di processo e/o formulazioni del substrato da fermentare in grado di ridurre al minimo la fermentazione glicerol-piruvica che notoriamente riduce la resa in etanolo del processo fermentativo dei lieviti.

Per questo è auspicabile effettuare la selezione dei microrganismi per uso biotecnologico nell'ambito di specie che siano poco esigenti da un punto di vista nutrizionale e resistenti a condizioni chimico fisiche e di processo stringenti ma anche sicure e senza ricorrere all'ingegneria genetica. Perciò ci si orienta spesso verso lieviti e muffe non tossinogene o batteri non patogeni. D'altra parte la biodiversità microbica è così ampia che per citare Kinichiro Sakaguchi (importante microbiologo giapponese della fine dell'800) «*i microrganismi naturalmente presenti in natura ti potranno dare tutto quello che ti serve se sai come chiederlo*».

Ad esempio, nella **tabella 3** sono riportati alcuni esempi di fermentazione allo stato solido di scarti agro-alimentari per l'ottenimento di prodotti per l'alimentazione animale. Negli esempi riportati l'uso di muffe non tossinogene e di lieviti consente di incrementare significativamente il valore nutrizionale di scarti vegetali da impiegare per la formulazione di mangimi. D'altra parte, ceppi selezionati di muffe e soprattutto i lieviti trovano molteplici applicazioni nei settori più disparati. Infatti, essi tradizionalmente trovano applicazione nella produzione di alimenti e bevande ma vengono utilizzati per la produzione di biomasse, ingredienti alimentari, aromi, coloranti, emulsionanti, stabilizzanti ed enzimi a partire da molti substrati ma soprattutto da reflui, scarti e sottoprodotti agro-industriali. La **tabella 4** riporta i prodotti ottenuti dai lieviti con applicazioni su scala industriale.

Dai pochi esempi riportati in tabella risulta chiaro che *Yarrowia lipolytica* (figura 2) (Zhou et al., 2018) è il lievito più utilizzato, dopo *Saccharomyces cerevisiae*, a livello industriale perché:

- ✓ è GRAS e frequentemente isolato nei prodotti alimentari tradizionali quali formaggi e salumi nei quali svolge spesso un ruolo importante nel processo di maturazione (Lanciotti et al., 2005a; Patrignani et al., 2007);
- ✓ ha ampia diffusione ambientale;
- ✓ può utilizzare gli idrocarburi e le sostanze idrofobiche come unica fonte di carbonio (Zhou et al., 2018);
- ✓ produce una vasta gamma di enzimi (lipasi, proteasi) e composti ad alto valore aggiunto in condizioni chimico-fisiche anche difficili utilizzabili in molti settori (lattoni, acido citrico, β -bloccanti etc...);
- ✓ resiste a numerose condizioni di stress (elevate concentrazioni saline, presenza di sostanze tossiche, limitazioni nutrizionali..) (Lanciotti et al., 2005a);
- ✓ è poco esigente da un punto di vista nutrizionale;
- ✓ presenta un'ampia variabilità nell'ambito della specie (importanza della selezione di ceppi appropriati in rapporto al processo biotecnologico richiesto).

Ad esempio ceppi selezionati di *Y. lipolytica* sono riusciti a crescere in acque reflue di oleifici senza necessità di aggiungere nutrienti riducendo in maniera significativa la domanda chimica e biologica di ossigeno e producendo interessanti concentrazioni di lipasi ed acido citrico (Lanciotti et al., 2005b). Le acque di vegetazione degli oleifici sono estremamente inquinanti e devono essere trattate prima di essere smaltite. Interessanti risultati per la riduzione del loro impatto ambientale sono stati ottenuti anche con *Candida tropicalis*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas* spp., *Sphingomonas* spp. e *Ralstonia* spp.. Tuttavia, solo *Y. lipolytica* è in grado di produrre, con rese interessanti e senza bisogno di nutrienti supplementari, diverse sostanze che possono trovare applicazioni in diversi settori.

Altro microrganismo molto interessante per la valorizzazione dei sottoprodotti dell'industria saccarifera è *Aureobasidium pullulans* (Prasongsuk et al., 2018). Si tratta di un lievito molto simile per le caratteristiche morfologiche alle muffe, ubiquitario, che può essere naturalmente trovato su numerose piante coltivate, sulle quali non produce alcun sintomo. Viene utilizzato in agricoltura come antagonista naturale di patogeni fungini e batterici, in competizione per lo spazio vitale e gli

elementi nutritivi. In Italia è autorizzato per controllo del “Colpo di fuoco batterico” delle pomacee (*Erwinia amilovora*), della Muffa grigia della vite (*Botrytis cinerea*) e delle malattie fungine che si sviluppano durante la conservazione delle mele. Ha inoltre scarsissime esigenze nutrizionali e ceppi selezionati si sono dimostrati in grado, dopo l’ottimizzazione del processo biotecnologico di produrre interessanti concentrazioni di frutto-oligo saccaridi (FOS) quali nistoso e kestoso (*Flores-Maltos et al., 2016*).

Tabella 1. Specie di lieviti utili per la valorizzazione di sottoprodotti dell’industria alimentare in etanolo

<i>Candida pseudotropicalis</i> ; <i>C. tropicalis</i> ; <i>Candida spp.</i> , <i>Pichia spp.</i>	Fermentano xilosio e altri pentosi ma hanno scarsa alcool tolleranza
<i>Kluveromyces lactis</i>	Fermenta il lattosio
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Fermenta il lattosio ed è in grado di idrolizzare l’inulina
<i>Saccharomyces cereviaiae</i>	La maggior parte dei ceppi fermenta solo glucosio, fruttosio, maltosi e saccarosio

Tabella 2. Specie di batteri utili per la per la valorizzazione di sottoprodotti dell’industria alimentare in etanolo

<i>Zymomonas mobilis</i>	Specie in grado di fermentare glucosio fruttosio e saccarosio. Sono disponibili ceppi ingegnerizzati in grado di fermentare i pentosi
<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	Estremofilo con temperatura ottimale di 68 °C
<i>Clostridium thermocellum</i>	Termofilo ed in grado di idrolizzare la cellulosa
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	Specie termofila estrema in grado di fermentare xilosio e amido

Tabella 3. Esempi di fermentazioni allo stato solido di scarti dell’industria alimentare ad opera di muffe e lieviti non tossinogeni

Bucce e torsoli di mela	<i>Candida</i> spp., <i>Saccharomyces</i> spp., <i>Torulopsis</i> spp.	Aumento del contenuto proteico, lipidico e in vitamine
Foglie di cavolfiori e scarti di altre <i>Brassicaceae</i>	Uso in successione di <i>Aspergillus niger</i> e <i>Torulopsis utilis</i>	Aumento del contenuto proteico fino ad oltre il 22%
Bucce di arance e altri agrumi	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Aumento del contenuto proteico fino circa il 20%

Tabella 4. Esempi di lieviti GRAS in grado di produrre composti di diversa natura da scarti dell'industria agro-alimentare per un loro utilizzo in campo alimentare, cosmetico, farmaceutico, nutraceutico

Prodotto	Utilizzo	Funzione	Specie di lievito utilizzata
lattoni	Industria alimentare e cosmetica	Aromatizzanti/antimicrobici	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Acido beta idrossibutirrico	Industria farmaceutica	Diminuzione del rischio cardiovascolare	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Alcool deidrogenasi	Industria farmaceutica	Produzione di beta bloccanti a partire da alcoli alogenati	<i>Yarrowia lipolytica</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Acido alfa chetoglutarico	Industria alimentare	Esaltatore di sapidità	<i>Yarrowia lipolytica</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Emulsionanti/tensioattivi	Industrie alimentare e dei detersivi	Stabilizzazione di schiume, emulsioni	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Enzimi pectinolitici	Industria alimentare	Chiarificazione dei succhi di frutta	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
Lipasi	Settori alimentare, farmaceutico, dei detersivi	Idrolisi dei trigliceridi Trans-esterificazione Riduzione dell'apporto calorico dei grassi	<i>Rhodotorula glutinis</i> ; <i>Cryptococcus</i> spp. <i>Yarrowia lipolytica</i>
Proteasi	Settore alimentare	Idrolisi delle proteine, aumento della digeribilità	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Sostanze probiotiche quali frutto-oligosaccaridi	Settore alimentare e nutraceutico	Favoriscono la sopravvivenza dei microrganismi probiotici	<i>Aureobasidium pullulans</i>

Figura 1. Morfologia della colonia di *Saccharomyces cerevisiae* cresciuto in terreno YPD



Figura 2. Morfologia della colonia di diversi ceppi di *Yarrowia lipolytica* cresciuti in terreno YPD



Figura 3. Morfologia della colonia di ceppi di *Aureobasidium pullulans* cresciuti in terreno YPD



Bibliografia

Flores-Maltos, DA; Mussatto, SI; Contreras-Esquivel, JC, Rodriguez-Herrera, R., Teixeira, JA Aguilar, CN (2016). Biotechnological production and application of fructooligosaccharides. *Critical Reviews in Biotechnology* , 36, 259-267

Guimaraes, Pedro M. R.; Teixeira, Jose A.; Domingues, Lucilia (2010). Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances* , 28,375-384

Lanciotti R, Gianotti A, Baldi D, Angrisani R, Suzzi G, Mastrocola D, Guerzoni ME (2005b). Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. *Bioresource Technology* 96, 317-22.

Lanciotti R, Vannini L, Lopez CC, Gobetti M , Guerzoni ME (2005a). Evaluation of the ability of *Yarrowia lipolytica* to impart strain-dependent characteristics to cheese when used as a ripening adjunct. *International Journal of Dairy Technology*, 58, 89-99

Liguori R, Amore A, Faraco V. (2013). Waste valorization by biotechnological conversion into added value products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 6129–6147.

Patrignani F, Iucci L, Vallicelli M, Guerzoni ME, Gardini F, Lanciotti R. (2007). Role of surface-inoculated *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* strains in dried fermented sausage manufacture. Part 1: Evaluation of their effects on microbial evolution, lipolytic and proteolytic patterns. *Meat Science* 75, 676–686

Prasongsuk S., Lotrakul P., Ali I, Bankeeree W, Punnapayak H (2018). The current status of *Aureobasidium pullulans* in biotechnology. *Folia Microbiologica*, 63, 129-140

Saeed MA, Ma H, Yue S, Wang Q, Tu M (2018). Concise review on ethanol production from food waste: development and sustainability. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 8851–28863

Scully, Sean Michael; Orlygsson, Johann Recent Advances in Second Generation Ethanol Production by Thermophilic Bacteria (2015). *Energies*, 8, 1-30

Zhou, YJ, Kerkhoven, EJ,; Nielsen, J, (2018). Barriers and opportunities in bio-based production of hydrocarbons. *Nature Energy*, 3, 925-935

CV

Francesca Patrignani

Francesca Patrignani è Professore Associato presso il DISTAL, Università di Bologna, dove svolge attività didattica in Laboratorio di Microbiologia Applicata e Laboratorio di Microbiologia Enologica. Le sue principali attività di ricerca riguardano lo studio della fisiologia, metabolismo ed opportunità applicative di batteri lattici, probiotici e lieviti non convenzionali in campo alimentare, anche associati all'utilizzo di tecnologie non termiche.

Lucia Vannini

Lucia Vannini è Ricercatore Confermato presso il DISTAL, Università di Bologna, dove svolge attività didattica in Microbiologia Industriale. Le sue attività di ricerca nel settore della Microbiologia degli Alimenti ed Industriale si sono focalizzate, in particolare, sulle tecnologie innovative non termiche per la decontaminazione e stabilizzazione degli alimenti, la selezione e

l'uso di microrganismi per la produzione di metaboliti microbici di interesse alimentare e la valorizzazione dei sottoprodotti del settore agro-alimentare.

Rosalba Lanciotti

Rosalba Lanciotti è Professore Associato presso il DISTAL, Università di Bologna, dove svolge attività didattica in Microbiologia delle Fermentazioni, Microbiologia Enologica e Valorizzazione dei sottoprodotti alimentari per via biotecnologica. Le sue principali attività di ricerca riguardano sia la microbiologia generale che applicata. Ha riconosciute competenze nel campo degli alimenti probiotici e funzionali ed in particolare sulle strategie in grado di ottimizzare la formulazione dei prodotti lattiero-caseari per aumentare la vitalità dei microrganismi probiotici e degli starter di fermentazione. Durante la sua attività di ricerca si è occupata anche di microrganismi non convenzionali per la valorizzazione di reflui, scarti e sottoprodotti dell'industria agro-alimentare.