

Borsa di studio attivata ai sensi di quanto disposto dal D.M. n. 1061 del 10/08/2021

Titolo del progetto: Studio di processi innovativi green per la produzione sostenibile di estratti naturali con attività funzionale

La borsa sarà attivata sul seguente corso di dottorato accreditato per il XXXVII ciclo:

PROCESSI CHIMICI PER L'INDUSTRIA E PER L'AMBIENTE

Responsabile scientifico: Roberto Lavecchia, Antonio Zuorro

Area per la quale si presenta la richiesta: GREEN

Numero di mensilità da svolgere in azienda: 6

Numero di mensilità da svolgere all'estero: 6 presso Universidad Miguel Hernandez, Elche, Spain

Azienda: DEPOFARMA S.p.A.

Il Dipartimento è disponibile a cofinanziare per un importo pari a euro: 10000

Dipartimento finanziatore: DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA CHIMICA, MATERIALI, AMBIENTE con delibera del 21-09-2021

Progetto di ricerca:

Il progetto di ricerca PHYTOGREEN: si pone come primario obiettivo lo sviluppo, validazione e susseguente scale-up industriale di processi innovativi e sostenibili per la produzione di prodotti nutraceutico-funzionali a base di -amminobutirrico (Gaba) da prodotti di fermentazione del comparto lattiero-caseario ed in particolare dai prodotti residuali di filiera (side-stream).

L'acido -aminobutirrico (GABA) è un aminocadico non proteico a 4 atomi di carbonio proveniente da microrganismi in piante e animali e agisce quale principale neurotrasmettitore inibitorio del sistema nervoso centrale. L'acido -aminobutirrico esercita anche effetti positivi nel trattamento dello stress, dell'ipertensione e nella prevenzione del diabete. Di conseguenza, il GABA è stato classificato quale componente bioattivo in prodotti alimentari e farmaceutici. I metodi biosintetici per la produzione di GABA ad oggi rappresentano un ambito più promettente rispetto ai metodi di sintesi chimica, poichè i primi hanno una procedura di reazione semplice, un'elevata efficienza catalitica, condizioni di reazione blande ed elevata compatibilità ambientale.

Molti microrganismi possono produrre GABA, inclusi batteri, funghi e lieviti. Tra i batteri produttori di GABA, i batteri lattici (LAB) sono comunemente usati in molti alimenti fermentati. Negli ultimi decenni, diverse specie di LAB sono state isolate da alimenti fermentati tradizionali e valutate per la loro capacità di sintetizzare GABA, tra cui *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus*.

La capacità dei LAB di produrre GABA varia tra le diverse specie e ceppi. Le rese di GABA sono estremamente influenzate da diversi fattori, inclusa l'attività della glutammato decarbossilasi (GAD), correlata al LAB e soprattutto alle condizioni di fermentazione. Di particolare rilievo in ambito di ricerca direzionata all'utilizzo di fonti di scarto è la possibile produzione di GABA da prodotti di scarto dell'industria lattiero casearia come substrato utile alla produzione di prodotti per il settore nutraceutico.

L'approvvigionamento di GABA naturale ai fini di produrre alimenti fortificati rappresenta ad oggi una grande sfida in relazione alla crescente domanda globale. Pertanto, la produzione di alimenti arricchiti con GABA mediante fermentazione utilizzando microrganismi benefici è un processo innovativo e sostenibile considerato prioritario in ambito nutraceutico. Per le industrie alimentari e farmaceutiche, sono necessari continui studi ai fini dello screening di

vari tipi di microrganismi produttori di GABA e relative declinazioni di impiego.

Il contesto

La linea di ricerca si colloca per tali motivi nel contesto Green Deal Europeo incardinando 4 degli obiettivi della Agenda 2030 e lungo le Diretrici degli Obiettivi Tematici OT3 (mobilitare l'industria per un'economia pulita e circolare) ed OT6 (dal produttore al consumatore: un sistema alimentare equo, sano e rispettoso dell'ambiente). Ai fini della pertinenza del DM 1062, tutte le attività di ricerca rientrano inoltre nel tema Green rivolte allo sviluppo industriale di tecnologie a ridotto impatto ambientale per l'affiancamento della transizione ecologica di vari segmenti alimentari e farmaceutici.

L'intero progetto risulta attinente a tematiche trasversali quali la conservazione e valorizzazione della biodiversità animale (latte da razze autoctone) che possano esprimere componenti e molecole ad attività funzionale endogene al fine del loro utilizzo in ambito nutraceutico.

Le fasi operative

Diversi sono i fattori in grado di incidere nella produzione di GABA da parte dei batteri lattici. Questi fattori includono quali elementi primari: pH, temperatura, tempo di coltura, additivi nutrizionali nei terreni di crescita delle colture batteriche e vari ingredienti di fermentazione.

Saranno quindi oggetto di studio attività di ricerca volte allo sviluppo di:

a.selezione dei residui di filiera più idonei alla produzione di Gaba ed altre molecole ad azione funzionale: andranno ad essere indagati substrati da diverse matrici di scarto della industria casearia in relazione al potenziale di formazione di GABA (siero, latticello, etc)

b.messa a punto di processi ai fini estrattivi per l'isolamento e la produzione di GABA da substrati dell'industria casearia.

In particolare saranno oggetto di indagine step di processo quali la fermentazione e purificazione delle matrici di origine basati su tecnologie a ridotto impatto ambientale. I fattori determinati ai fini della produzione di acido aminobutirrico saranno inoltre modellati mediante utilizzo di diverse tecniche di disegno sperimentale (Response Surface Methodology-RSM) al fine di identificare le condizioni ottimali di processo.

c.sviluppo di modelli di sostenibilità ambientale ed economica propedeutici alla integrazione dei nuovi processi produttivi in ambito di redazione di piani di sostenibilità aziendali ad oggi prioritari per le aziende che adottano misure ed interventi specifici mirati alla transizione ecologica

Riferimenti bibliografici

Aoki H., Uda I., Tagami K., Furuya Y., Endo Y., Fujimoto K. The production of a new tempeh like fermented soybean containing a high level of γ -aminobutyric acid by anaerobic incubation with *Rhizopus*. *Biocsi. Biotechnol. Biochem.* 2003;67(5):1018–1023

Bloch-Tardy M., Roland B., Gonnard P. Pig brain 4-aminobutyrate 2-ketoglutarate transaminase. Purification, kinetics and physical properties. *Biochimie.* 1974;56:823–832

Chembler J.A., Koffas M.A.G. Metabolic engineering for plant natural product biosynthesis in microbes. *Curr. Opin. Biotech.* 2008;19:597–605.

Chen K.N., Chen M.J., Liu J.R., Lin C.W., Chiu H.Y. Optimization of incorporated probiotics as coating materials for probiotic microencapsulation. *J. Food Sci.* 2004;70:260–266.

Cho Y.R., Chang J.Y., Chang H.C. Production of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2007;17:104–109.

Choi S.I., Lee J.W., Park S.M., Lee M.Y., Ge J.I., Park M.S., Heo T.R. Improvement of gamma-aminobutyric acid (GABA) production using cell entrapment of *Lactobacillus brevis* GABA 057. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2006;16:562–568.

Titolo del progetto (inglese): PHYTOGREEN - sustainable process technologies for the formulation and production of nutraceutical and pharmaceutical preparations

Progetto di ricerca (inglese):

The PHYTOGREEN research project: its primary objective is the development, validation and subsequent industrial scale-up of innovative and sustainable processes for the production of nutraceutical-functional products based on γ -aminobutyric acid (GABA) from fermentation products in the dairy sector -caseario and in particular from the residual products of the supply chain (side-stream).

γ -Aminobutyric Acid (GABA) is a 4-carbon non-protein aminocadic originating from microorganisms in plants and animals and acts as the primary inhibitory neurotransmitter of the central nervous system. γ -aminobutyric acid also exerts positive effects in the treatment of stress, hypertension and in the prevention of diabetes. As a result, GABA has been classified as a bioactive component in food and pharmaceutical products. Biosynthetic methods for the production of GABA to date represent a more promising area than chemical synthesis methods, as the former have a simple reaction procedure, high catalytic efficiency, mild reaction conditions and high environmental compatibility. Many microorganisms can produce GABA, including bacteria, fungi and yeasts. Among the GABA-producing bacteria, lactic acid bacteria (LAB) are commonly used in many fermented foods. In recent decades, several LAB species have been isolated from traditional fermented foods and evaluated for their ability to synthesize GABA, including *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus*.

The ability of LABs to produce GABA varies between different species and strains. GABA yields are highly influenced by several factors, including the LAB-related glutamate decarboxylase (GAD) activity and especially fermentation conditions. Of particular importance in the field of research aimed at the use of waste sources is the possible production of GABA from waste products of the dairy industry as a useful substrate for the production of products for the nutraceutical sector.

Supply of natural GABA and the enriched food is a big challenge for the growing global demand. Therefore, the production of GABA enriched foods by fermentation using beneficial microorganisms is an indispensable process. For food and medicinal industries, studies will be required to screen various types of GABA-producing microorganisms from as many as possible fermented foods. There is a positive relation between the optimal fermentation condition and GABA synthesis by microorganisms. Since the production of GABA is totally dependent on the biochemical properties of GAD, clarification of biochemical properties of the GAD for the fermenting microorganism facilitates the optimization of fermentation processes.

The context

For these reasons, the research line is placed in the European Green Deal context, hinging 4 of the objectives of the 2030 Agenda and along the Thematic Objectives OT3 (mobilizing industry for a clean and circular economy) and OT6 (from producer to consumer: a fair, healthy and environmentally friendly food system). For the purposes of the relevance of Ministerial Decree 1062, all research activities also fall under the Green theme aimed at the industrial development of technologies with reduced environmental impact to support the ecological transition of various food and pharmaceutical segments.

The entire project is relevant to transversal issues such as the conservation and enhancement of animal biodiversity (milk from native breeds) that can express components and molecules with endogenous functional activity for the purpose of their use in the nutraceutical field.

The operative phases

There are several factors that can affect the production of GABA by lactic bacteria. These factors include as primary elements: pH, temperature, culture time, nutritional additives in the growth media of bacterial cultures and various fermentation ingredients.

Research activities aimed to:

a. selection of the most suitable supply chain residues for the production of GABA and other molecules with functional action: substrates from different waste matrices of the dairy industry will be investigated in relation to the formation potential of GABA (whey, buttermilk, etc.)

b. development of processes for extraction purposes for the isolation and production of GABA from substrates of the dairy industry.

In particular, process steps such as fermentation and purification of the origin matrices based on technologies with reduced environmental impact will be investigated. The factors determined for the production of aminobutyric acid (will be modeled by using different experimental design techniques (Response Surface Methodology-RSM) in order to identify the optimal process conditions.

c. development of environmental and economic sustainability models preparatory to the integration of new production processes in the context of drafting corporate sustainability plans that are currently priority for companies that adopt specific measures and interventions aimed at the ecological transition

References

Aoki H., Uda I., Tagami K., Furuya Y., Endo Y., Fujimoto K. The production of a new tempeh like fermented soybean containing a high level of γ -aminobutyric acid by anaerobic incubation with *Rhizopus*. *Biocsi. Biotechnol. Biochem.* 2003;67(5):1018–1023

Bloch-Tardy M., Roland B., Gonnard P. Pig brain 4-aminobutyrate 2-ketoglutarate transaminase. Purification, kinetics and physical properties. *Biochimie.* 1974;56:823–832

Chembler J.A., Koffas M.A.G. Metabolic engineering for plant natural product biosynthesis in microbes. *Curr. Opin. Biotech.* 2008;19:597–605.

Chen K.N., Chen M.J., Liu J.R., Lin C.W., Chiu H.Y. Optimization of incorporated probiotics as coating materials for probiotic microencapsulation. *J. Food Sci.* 2004;70:260–266.

Cho Y.R., Chang J.Y., Chang H.C. Production of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2007;17:104–109.

Choi S.I., Lee J.W., Park S.M., Lee M.Y., Ge J.I., Park M.S., Heo T.R. Improvement of gamma-aminobutyric acid (GABA) production using cell entrapment of *Lactobacillus brevis* GABA 057. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2006;16:562–568.