



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

Titolo del progetto: Estrazione sostenibile di composti bioattivi da cellule intere e scarti di lavorazione agroindustriale mediante processi innovativi e solventi invertibili 'green' formulati da metaboliti naturali atossici

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: Marco Bravi

Area per la quale si presenta la richiesta: GREEN

Numero di mensilità da svolgere in azienda: 8

Numero di mensilità da svolgere all'estero: 6 presso Department of Chemistry, Queen's University, Kingston, Ontario K7L 3N6 (Canada)

Azienda: Algreen B.V.

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:

L'acqua è un solvente "green" ideale per la solubilizzazione e la separazione di composti bioattivi a valore aggiunto in vari processi chimici e biologici, perché l'acqua ha un impatto minimo sull'ambiente e pochi problemi di sicurezza.

Tuttavia, molti composti bioattivi mostrano proprietà idrofobiche, che sono pochissimo solubili in acqua e ciò pone un ostacolo fondamentale allo sviluppo di tecnologie di separazione "green" che utilizzino mezzi acquosi.

Tra detti composti bioattivi (BC) idrofobici si trovano vitamine idrofobe (compresi i tocoferoli), carotenoidi, triacilgliceroli, che sono essenziali per l'uomo e per gli animali e sono quindi inclusi in formulati nutraceutici, integratori alimentari, cosmeceutici e cosmetici, integratori alimentari. Tra quelli idrofilici, proteine, carboidrati e ficobiliproteine.

Le materie prime che contengono detti BC possono talvolta essere inserite nella dieta o nel formulato in quanto tali, ma la produzione di integratori o di prodotti con funzionalità specifica richiede l'ottenimento di questi composti bioattivi da materie prime che li contengono ad una concentrazione o purezza sufficienti.

L'approvvigionamento di BC dalle materie prime richiede normalmente la lisciviazione con solvente idrofobo. I composti tradizionalmente utilizzati sono solventi organici, tra cui esano, acetone, etanolo, mentre i mezzi più recenti includono acetato di etile. Questi solventi organici vengono impiegati utilizzando il tradizionale approccio in tre fasi estrazione-separazione-recupero in base al quale la matrice contenente il BC desiderato viene prima lisciviata dal solvente in modo da ottenere un estratto; quindi, l'estratto viene separato dai residui solidi; infine, il solvente viene evaporato per separare il soluto, in modo che possa essere ottenuto come solido o liquido, mentre il solvente può essere riciclato dopo la condensazione. L'evaporazione del solvente è quindi fondamentale per i metodi tradizionali di lavorazione delle materie prime. Tuttavia, i solventi organici sono problematici per una serie di motivi, tra cui la loro natura infiammabile/esplosiva, la loro tossicità e il loro impatto ambientale. La loro pericolosità ha determinato l'introduzione di regolamenti per il loro impiego negli impianti di trasformazione per ridurre al minimo il rischio per gli operatori e la popolazione limitrofa, con un aumento dei costi connessi, lasciando peraltro intonse le preoccupazioni ambientali legate al loro utilizzo.

Recentemente, con l'introduzione di nuovi tipi di solventi, tra cui i liquidi ionici (IL) e i solventi eutettici naturali (NaDES), entrambi non volatili, sono stati alleviati numerosi problemi di sicurezza e di impatto ambientale. Inoltre i NaDES, che sono ottenuti da miscele di metaboliti, sono intrinsecamente non tossici. Nonostante l'evidenza dei

vantaggi rispetto ai solventi organici, tra cui la possibilità di progettare il solvente adattando la scelta dei suoi componenti, la maggiore solubilità mostrata dagli BC e la capacità generalmente maggiore di preservare tali caratteristiche biologicamente rilevanti come il potere o la conformazione antiossidante, la natura non volatile dei NaDES, che impedisce di ricorrere alle tecniche di recupero dei soluti consolidate, ha limitato finora un ampio ricorso a questa nuova classe di solventi.

Di recente, tuttavia, con l'introduzione del concetto di solvente modificabile in situ, è nato un nuovo approccio per il recupero del soluto in fase condensata e sono derivate dunque nuove tecniche. Fondamentalmente, la capacità del solvente di cambiare carattere dopo la dissoluzione del soluto viene utilizzata per ridurre la solubilità del soluto dopo l'estrazione, provocando così la separazione del soluto dal solvente e consentendone il recupero. Tra i solventi modificabili in situ, i solventi idrofili commutabili (SHS) si distinguono per la loro utilità in questo senso per affrontare l'estrazione degli BC.

Impiegando questo concetto fondamentale Cicci et al. (2018) hanno introdotto la Circular Extraction (CE), che apporta una ulteriore intensificazione, consentendo l'esaurimento della matrice estratta per quanto riguarda sia i soluti idrofobici che quelli idrofili e il successivo recupero di detti soluti dall'estratto. Per aggiungere valore al concetto CE, Sed et al. (2018) ha aperto la strada allo sviluppo di SHS biocompatibili, identificando il primo SHS invertibile basato su NaDES e dimostrato il suo utilizzo nel frazionamento della biomassa microalgale. Recentissimamente, Sapone et al. (2021) hanno dimostrato che mentre il concetto di estrazione bioattiva e incapsulamento resta sempre valido, il recupero del soluto può richiedere un adattamento della formulazione SHS che tenga conto debito delle specificità chimiche dell'BC estratto.

Il dottorato indagherà sulla possibilità di sfruttare la CE per ridurre la produzione di materiali di scarto e la contaminazione ambientale mentre si approvvigionano gli BC dalle materie prime per mangimi. In questo contesto le motivazioni che spingono all'utilizzo della CE sono duplici: infatti, in alcune materie prime gli BC si presentano in forma combinata, per cui risultano meno idrofobici o suscettibili all'estrazione; inoltre, mediante l'estrazione di soluti o frazioni idrofiliche si minimizza la massa residua finale che diventa rifiuto.

Le materie prime che saranno oggetto del progetto includeranno scarti di lavorazione dell'industria alimentare, come scarti di lavorazione dei crostacei (CPW), bucce di pomodoro (TP) e biomassa microbica contenente BC di apposita produzione fermentativa, quale biomassa batterica e di microalghe.

Gli utenti finali saranno principalmente quelli coinvolti nell'estrazione dell'BC e nella produzione di formulati BC utilizzati per la successiva produzione di nutraceutici, cosmeceutici e mangimi per animali. Per gli BC provenienti da rifiuti sarà presa in considerazione una varietà di utenti finali, inclusi produttori di cosmetici, nutraceutici e mangimi.

Il percorso di dottorato ed il progetto di ricerca è incentrato su tematiche Green coerenti con le traiettorie definite nella SNSI e nel PNR. La compatibilità del progetto rispetto alla SNSI, per la sfida "Industria intelligente e sostenibile, energia e ambiente", riguarda simultaneamente le aree "processi produttivi innovativi ad alta efficienza e per la sostenibilità industriale" e "tecnologie per biomateriali e prodotti biobased e bioraffinerie".

Questo lavoro sarà strutturato in tre fasi. La prima fase riguarderà uno studio dello stato dell'arte, sia tecnico che economico, sui composti da estrarre e sulla tecnologia da sviluppare. Il candidato dovrà quindi effettuare un'ampia ricerca bibliografica sulle metodologie e sugli eventuali modelli utilizzati allo scopo; Il candidato dovrà inoltre rivedere la chimica dei principali composti target di rilevanza nelle matrici estratte e per i settori nutraceutico, cosmetico e zootecnico, compresa l'acquacoltura. Al termine di questa fase, il candidato individuerà un piccolo insieme di composti target (ed eventualmente frazioni) che possono essere sfruttati e le relative specifiche per la commercializzazione nei mercati target.

La seconda fase riguarderà l'indagine sperimentale e comprenderà anche il riconoscimento computazionale

dell'idoneità di potenziali sistemi chimici invertibili all'uso per lo sviluppo del processo di estrazione e recupero al fine di ottenere una definizione ottimale del processo per valorizzare le singole materie prime, ridurre i sottoprodotti e gli sprechi e garantire il massimo utilizzo e riciclo del sistema di solventi. Durante questa fase del lavoro verranno inoltre identificate eventuali ulteriori operazioni unitarie necessarie per raggiungere la conformità di base alle specifiche e saranno valutate eventuali contingenze con la Società sostenitrice.

La terza fase riguarderà lo sviluppo del simulatore di processo per arrivare ad un progetto che permetta stime di redditività economica, sostenibilità ambientale, e che sia adatto a qualsiasi ingegneria.

Le prime due fasi comprenderanno anche la formazione accademica, obbligatoria, e quella erogata dall'azienda. La seconda fase prevede anche un periodo di ricerca della durata complessiva di sei mesi nelle due sedi estere individuate per la ricerca, che sono l'Università del Queens, Kingston (Canada), che ospita un centro di eccellenza sullo sviluppo delle tecnologie solventi invertibile, e il gruppo Sustainable Process Technology dell'Università di Twente, Paesi Bassi o, in alternativa a quest'ultimo, il gruppo di bioraffinazione dell'università di Wageningen, sempre nei Paesi Bassi.

Le fasi delineate possono essere provvisoriamente suddivise nei tre anni di attività di dottorato come segue: primo semestre, prima fase; successivi diciotto mesi, seconda fase; terzo anno, terza fase.

Bibliografia

Cicci, Agnese, et al. "Circular extraction: an innovative use of switchable solvents for the biomass biorefinery." *Green Chemistry* 20.17 (2018): 3908-3911.

Sed, Giorgia, et al. "A novel switchable-hydrophilicity, natural deep eutectic solvent (NaDES)-based system for bio-safe biorefinery." *RSC advances* 8.65 (2018): 37092-37097.

Sapone, Vittoria, et al. "Astaxanthin Extraction from *Paracoccus carotinifaciens* Employing Fatty Acid based Natural Deep Eutectic Solvents." *Chemical Engineering Transactions* 87 (2021): 463-468.

Titolo del progetto (inglese): Sustainable green process to extract bioactive compounds from food byproducts and whole cells with natural atoxic solvents

Progetto di ricerca (inglese):

Water is an ideal green solvent for the solubilization and separation of valued-added bioactive compounds in various chemical and biological processes, partly because water has a minimal impact on the environment and few safety issues. However, many bioactive compounds exhibit hydrophobic properties, which leads to their limited solubility in water and substantially hinders the development of green separation technologies using aqueous media.

Among said hydrophobic bioactive compounds (BCs) hydrophobic vitamins (including tocopherols), carotenoids, triacylglycerides, are found, which are essential for humans and animals and are thus included in formulated nutraceuticals, diet supplements, cosmeceuticals and cosmetics, and feed supplements. among hydrophilic ones, proteins and phycobiliproteins.

Raw materials that contain said BCs can be made part of the diet as such, but producing integrators, or products with specific functionality, requires obtaining these bioactive compounds from raw materials that contain them at a purity that make them suitable for the intended formulation.

Sourcing BCs from raw materials normally requires leaching them with hydrophobic solvent. Consolidated compounds used are organic solvents, including hexane, acetone, ethanol, while newer media include ethyl acetate. All of said

organic solvents are deployed by using the traditional three-step extraction-separation-recovery approach whereby the matrix containing the intended BC is first leached by the solvent so that an extract is obtained by dissolving it in the solvent; then, the extract is separated from any undissolved residue; eventually, the volatility of the solvent is deployed to separate the solute, so that it can be obtained as a solid or liquid, while the solvent vapour can be recycled after condensation. Solvent evaporation is therefore key to the traditional processing methods of raw materials. However, organic solvents are objectionable for a number of reasons, that include their flammable/explosive nature, their toxicity, and their environmental impact. Their hazardous nature has caused the introduction of a set of regulations for their deployment in processing plants to minimise the risk for operators and the population neighbouring processing sites, with an increase of entailed costs, without reducing the environmental concerns regarding their use.

Recently, along with the introduction of new types of solvents, including ionic liquids (ILs) and natural deep eutectic solvents (NaDES), both of which are essentially nonvolatile, a number of safety and environmental impact issues have been alleviated. Furthermore, being NaDES obtained as mixtures of metabolites, they are inherently non toxic. Despite the evidence of advantages with respect to organic solvents, including the possibility to design the solvent by tailoring the choice of its components, the higher solubility exhibited by BCs, and the generally higher capability to preserve such biologically relevant features as antioxidant power or conformation, their non-volatile nature impeding traditional solute recovery approaches has limited so far the rate of practical deployment of these new classes of solvents.

Recently, however, with the introduction of the concept of in situ-modifiable solvent, a novel approach targeting condensed-phase solute recovery has appeared and new techniques have stemmed from it. Basically, the solvent's ability to change its character after the dissolution of the solute is used to reduce the solute's solubility after the extraction, thus causing the solute to separate from the solvent and permitting its recovery. Among in situ-modifiable solvents, switchable-hydrophilicity solvents (SHS) stand out for their usefulness in this respect for targeting BCs. On top of SHSs, Cicci et al. (2018) introduced Circular Extraction (CE), which brings about a further enhancement by allowing the exhaustion of the extracted matrix with regard to both hydrophobic and hydrophilic solutes and the subsequent recovery of said solutes from the extract. To add value to the CE concept, Sed et al. (2018) paved the way toward the development of bio-safe SHS by identifying the first NaDES-based SHS and demonstrated its use in the fractionation of microalgal biomass. Lately, Sapone et al. (2021) demonstrated that while the bioactive extraction and encapsulation concept holds, recovering the solute may require a tailoring of the SHS formulation respectful of the chemistry of the extracted BC.

The doctorate will investigate the possibility of leveraging CE for reducing the production of waste materials and environmental contamination while sourcing BCs from the feed materials. In this context the motivation behind using CE are twofold: indeed, in some raw materials BCs appear in a combined form, so that they are less hydrophobic; furthermore, by the extraction of hydrophilic solutes or fractions the final residual mass that becomes waste is minimised.

The raw materials that will be targeted by the project will include processing wastes of the food industry, such as crustaceans processing waste (CPW), tomato peels (TP), and purposely produced microbial biomass containing BCs, such as bacterial biomass.

End users will be primarily those involved in BC extraction and in the production of BC formulates used for later production of nutraceuticals, cosmeceuticals and animal feed.

For waste-sourced BCs a variety of end-users will be considered including cosmetics, nutraceuticals and feed producers.

This work will be structured in three phases. The first phase will concern a study of the state of the art, both technical and economic, on the compounds to be extracted and on the technology to be developed. The candidate will

therefore have to carry out an extensive bibliographic search on the methodologies and on any models used for the purpose; The candidate will also revise the chemistry of the main target compounds of relevance in the extracted matrices and for the nutraceutical, cosmetic and zootechnical sectors, including aquaculture. At the end of this phase, the candidate will identify a small set of target compounds (and possibly fractions) that can be exploited and the relevant specifications for commercialisation in target markets.

The second phase will concern the experimental investigation and will also include the computational recognition of the suitability of potential invertible chemical systems for use for the development of the extraction and recovery process in order to attain an optimal definition of the process to enhance the individual feedstocks, reduce by-products and waste, and ensure maximal utilisation and recycle of the solvent system. During this phase of the work any further unit operations required to achieve basic compliance with specifications will also be identified and possible contingencies will be evaluated with the supporting company.

The third phase will concern the development of the process simulator to arrive at a project that allows estimates of economic profitability, environmental sustainability, and that is suitable for any engineering.

The first two phases will also include academic training, which is compulsory, and that provided by the company. The second phase will also include a research period lasting a total of six months in the two foreign locations identified for research, which are the University of Queens, Kingston (Canada), which hosts a center of excellence on the development of solvent technologies. invertible, and the Sustainable Process Technology group of the University of Twente, The Netherlands or, in alternative to this latter, the biorefining group at Wageningen University and Research, Wageningen, The Netherlands.

The phases outlined can be tentatively distributed over the three years of doctoral activity as follows: first six months, first phase; subsequent eighteen months, second phase; third year, third phase.

Bibliography

Cicci, Agnese, et al. "Circular extraction: an innovative use of switchable solvents for the biomass biorefinery." *Green Chemistry* 20.17 (2018): 3908-3911.

Sed, Giorgia, et al. "A novel switchable-hydrophilicity, natural deep eutectic solvent (NaDES)-based system for bio-safe biorefinery." *RSC advances* 8.65 (2018): 37092-37097.

Sapone, Vittoria, et al. "Astaxanthin Extraction from *Paracoccus carotinifaciens* Employing Fatty Acid based Natural Deep Eutectic Solvents." *Chemical Engineering Transactions* 87 (2021): 463-468.