

**Borse di dottorato di ricerca finanziate da Regione Lombardia nell'ambito dell'Accordo di collaborazione con ENEA/Agenzia Nazionale per le Nuove Tecnologie, l'Energia e lo Sviluppo sostenibile (DGR n. 7792 del 17/01/2018 e 5321 del 4/10/2021).**

#### **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI MILANO-BICOCCA**

Dottorato in: Tecnologie convergenti per i sistemi biomolecolari.

**Luca Mastella** – Ingegneria di processo e metabolica per la produzione di vitamina B9 nei lieviti come esempio di simbiosi industriale ed economia circolare.

#### **Abstract**

La lignocellulosa è il principale componente strutturale delle piante legnose e non, e rappresenta una delle principali fonti potenziali di materia organica rinnovabile. La lignocellulosa è composta principalmente da due polimeri di carboidrati, cellulosa ed emicellulosa e dalla lignina (un polimero aromatico). Questi polimeri complessi da un lato costituiscono spesso una biomassa residua della filiera agroalimentare, ma allo stesso tempo contengono differenti monomeri zuccherini e precursori fenolici, aventi un enorme valore biotecnologico, poiché potenzialmente possono essere convertiti in differenti prodotti ad elevato valore aggiunto. In uno scenario in cui la popolazione mondiale è in aumento insieme alla generazione di rifiuti ed inquinamento a scapito delle risorse del pianeta e del benessere umano, questo progetto mira a proporre un esempio di bioeconomia circolare e simbiosi industriale. Più in dettaglio, il progetto parte dalla valutazione quali-quantitativa delle biomasse agricole residue fino alla valorizzazione di un sottoinsieme di interesse per il nostro territorio in folati, sfruttando i lieviti come cell factory microbiche. Il folato (Vitamina B9) è una vitamina B idrosolubile con ruoli importanti nella sintesi, riparazione e metilazione degli acidi nucleici, prodotta solo dalle piante verdi e da alcuni microrganismi: per questi motivi rappresenta una componente nutritiva essenziale per l'uomo. La vitamina B9 disponibile in commercio è sintetizzata chimicamente come acido folico, non ottimale in termini di bioattività per l'uomo; la produzione di folati naturali mediante fermentazione microbica sta quindi diventando un'alternativa sostenibile e desiderabile per l'integrazione umana. Nel corso del progetto è stata acquisita ed applicata la metodologia ENEA per l'analisi dei flussi di risorse e per la creazione di possibili sinergie tra le varie aziende presenti nella regione Lombardia. Grazie a questo lavoro è stato possibile identificare le principali biomasse di scarto prodotte nell'area nel settore agroalimentare e le vinacce non fermentate sono state quindi selezionate per ulteriori studi in laboratorio, e confrontate con biomasse residue precedentemente utilizzate, derivanti dal processo di produzione dello zucchero. Il lievito non convenzionale *Scheffersomyces stipitis* è stato sfruttato come ospite naturale per la produzione di vitamina B9, per la prima volta in questo lavoro. La crescita è stata ottimizzata e la produzione di folati è stata valutata prima in beuta e successivamente in bioreattore in terreni formulati che imitano gli idrolizzati di lignocellulosa. La produzione massima di folati è stata di  $3,7 \pm 0,07$  mg/L, che ad oggi è la più alta riportata se si considerano i microrganismi di tipo selvatico. Inoltre, è stata valutata la produzione di folati in beuta a partire da tre diverse biomasse residue: melassa di barbabietola da zucchero (SBM), polpa di barbabietola da zucchero (SBP) e vinacce non fermentate (UGM). *S.stipitis* è stato in grado di metabolizzare queste biomasse, raggiungendo titoli di folati rispettivamente di  $188,2 \pm 24,86$  µg/L,  $130,6 \pm 1,34$  µg/L e  $101,9 \pm 6,62$  µg/L. Parallelamente, il lievito *Saccharomyces cerevisiae*, suscettibile di manipolazione genetica, è stato ingegnerizzato nel percorso anabolico della produzione di folati per acquisire nuove conoscenze sui possibili bersagli per sbloccare i precursori che ne limitano la produzione. Otto geni diversi sono stati manipolati per la prima volta nello stesso background genetico sfruttando diverse strategie ingegneristiche. Questo è stato fondamentale per testare il miglior ceppo nel bioreattore e per portare la produzione e la produttività di folati rispettivamente a  $620,0 \pm 12,30$  µg/L e  $41,33$  µgfol/Lh, tra i più alti in letteratura. Nel complesso, questi risultati forniscono una solida evidenza di possibili processi di upcycling a base microbica di biomasse lignocellulosiche.

#### **Pubblicazioni**

- “Starting from residual biomasses in the logic of biorefineries and circular bioeconomy” Pubblicazione paper in *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*: Mastella, Luca, et al.

- "First report on Vitamin B9 production including quantitative analysis of its vitamers in the yeast *Scheffersomyces stipitis*." *Biotechnology for biofuels and bioproducts* 15.1 (2022): 1-13.

### Convegni

- Intervento orale al convegno SUN - 4/11/2020 " Il ruolo della simbiosi industriale per la prevenzione della produzione dei rifiuti: a che punto siamo?"
- Poster presentation al congresso ASBE V (Applied Synthetic Biology in Europe): Characterization of folate production in engineered yeasts.
- Flash poster presentation and Poster session al PhD meeting 2020: Development of a biobased microbial process for Vitamin B9 production. 1° premio come miglior poster.
- presentazione orale al Journal Club Bicocca: Engineering a riboswitch-based genetic platform for the self-directed evolution of acid-tolerant phenotypes.
- Poster session al BtBs Day 2019: Sustainable Production of Folate by Microbial Metabolic Engineering
- Flash poster presentation e poster session al congresso EFB2021: Assessment of folates.
- produced by wild type and engineered *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells.
- Presentazione orale al congresso ICY15: The flexibility of *Scheffersomyces stipitis* to valorize
- residual biomasses for Vitamin B9 production.
- Poster presentation al BtBs day 2021: Development of a sustainable bioprocess to
- produce Vitamin B9.
- Presentazione orale al PhD meeting 2021: Development of a sustainable bioprocess to
- produce Vitamin B9 Presentazione orale al Journal Club Bicocca: Development of techniques to detect Vitamin B9.
- Presentazione orale alla "1st Yeast4Bio Training school": Development of a sustainable bioprocess
- to produce Vitamin B9.
- Presentazione orale al PhD meeting 2022: Process and metabolic engineering for the optimization of vitamin B9 production in yeasts.