

ESTRATTO DELLA RELAZIONE INTERMEDIA DEL PROGETTO “VALSO SVILUPPO NELLA FILIERA DEL BIODIESEL DI PROGRAMMI SPECIFICI PER IL RECUPERO DEI SOTTOPRODOTTI.

1) Elenco delle Unità Operative (UO) partecipanti e di eventuali collaborazioni esterne

Strutture CRA:

- CRA-CIN CENTRO DI RICERCA PER LE COLTURE INDUSTRIALI – Bologna (DTI)
- CRA-ACM CENTRO DI RICERCA PER L’AGRUMICOLTURA E LE COLTURE MEDITERRANEE – Acireale CT (DPV)
- CRA-ORA UNITÀ DI RICERCA PER L’ORTICOLTURA – Monsanpolo del Tronto AP (DPV)

Università e Consorzi Interuniversitari:

- CONSORZIO PER LO SVILUPPO DEI SISTEMI A GRANDE INTERFASE (CSGI), Firenze
- DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE VETERINARIE– UNIVERSITÀ DI BOLOGNA – Bologna
- CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCHE AGRO-AMBIENTALI ”Enrico Avanzi”
- Università di Pisa - pISA
- DIPARTIMENTO DI PROTEZIONE E VALORIZZAZIONE AGROALIMENTARE - CRIOF –
Università di Bologna

Azienda Private e Associazioni:

- FOUNDRY CHEM, Milano
- NOVAMONT SpA, Novara
- AGRIMUM ITALIA SpA, Livorno, Dr. Gianpiero PATALANO

- PROGETTO EURO VERDE, Padova, Dr. Stefano BOZZETTO
- CHIMICA VERDE BIONET, Arezzo, Dr. Giuseppe CROCE

Collaborazioni esterne

TECNOALIMENTI SpA, Milano (collaboraz. CRA-CIN)

VENETOAGRICOLTURA, Padova, (collaboraz. CRA-CIN)

STUDIOSILVA, Bologna, (collaboraz. CRA-CIN)

DIPARTIMENTO DI FARMACOLOGIA (collaboraz. DSMV Università di Bologna).

Collaborazioni esterne non onerose

- OSSERVATORIO MALATTIE DELLE PIANTE, Bologna (collaboraz. CRA-CIN)
- CENTRO INTERUNIVERSITARIO DI STUDI DI AGROINGEGNERIA (CISA) Firenze (collaboraz. CRA-CIN)

AZIONI E PRINCIPALI RISULTATI DEL PROGETTO

OR1: Studio di tecnologie microbiologiche e chimiche per la valorizzazione della glicerina

Att. 1. a) - Selezione ed eventuale ingegnerizzazione di lieviti per la conversione del glicerolo in acidi grassi a media catena di atomi di carbonio C12 e C14 (acido laurico e miristico). (CSGI Firenze, CRA-CIN) E' stato ingegnerizzato il ceppo Po1g di *Yarrowia lipolytica*, un lievito oleaginoso in grado di crescere utilizzando glicerolo come fonte di carbonio, con la tioesterasi CpFatB2 di *Cuphea palustris*. **b)** E' stato Progettato il gene sintetico per l'espressione in lievito della tioesterasi CpFatB2 di *Cuphea palustris* a partire dalla sequenza amminoacidica (depositata in banca dati), **c)** Clonaggio della sequenza nel plasmide di espressione pYLEX1 (7259 bp), presente nel Kit commerciale "YLEX

Expression kit” (Yeastern Biotech Co). Il costrutto è stato utilizzato per trasformare *Y. lipolytica* ed ottenere l’integrazione del gene CpFatB2 nel genoma ospite. **d)** Selezione dei trasformanti in terreno minimo solido YNB\glucosio privo di leucina, l’avvenuta integrazione è stata verificata mediante PCR da genoma di lievito. E’ stato ottenuto un clone positivo potenzialmente in grado di esprimere il gene eterologo. Definizione delle condizioni ottimali di crescita per favorire l’accumulo di biomassa indipendentemente dal tipo di terreno usato, la crescita viene effettuata a 28 °C in agitazione (180 rpm). **Att. 2. Sviluppo di processi basati su tecnologie brevettate nella produzione di polimeri a partire da glicerina grezza [Novamont]** **a)** Le analisi sulla glicerina derivata dalla filiera del biodiesel per la presenza di metalli pesanti, aldeidi, esteri, metanolo residuo, cere, insaponificabile, non hanno mostrato alcun parametro che potesse inficiare le applicazioni previste, il titolo in glicerina è risultato sempre superiore all’80%, confermando la fattibilità della sostituzione della glicerina di sintesi normalmente utilizzata per la produzione di film di pacciamatura **b)** Sono state individuate le specifiche tecniche per l’industrializzazione del nuovo blend **c)** I prodotti derivati hanno mostrato un minore carico di rottura, un incremento della deformabilità del film ed un abbassamento del valore di resistenza alla lacerazione dei film in condizioni di bassa temperatura ed umidità relativa. **Att. 3 Sviluppo di processi produttivi nella produzione di fluidi idraulici e lubrorefrigeranti a base di glicolipropilenici prodotti da glicerina grezza [Foundry Chem]** **a)** I risultati non sono al momento ancora divulgabili su richiesta del partner Foundry Chem **Att. 4 Validazione dei nuovi polimeri a base di glicerina grezza come film per sacchi destinati alla raccolta differenziata e/o teli pacciamanti in orticoltura [Novamont; CRA-ORA]** **a)** Produzione di filmati plastici ad uno spessore nominale di 15 µm utilizzando glicerina da biodiesel. **Att. 5 Valutazione e validazione della glicerina come coadiuvante ad azione legante in processi di pellettizzazione [Agrium].** L’esame della matrice da pellettizzare e delle sue caratteristiche di scorrevolezza, coesione, durezza ha suggerito di procedere alla pellettizzazione mediante trafilatura con dimensioni di 4,5 mm (diametro) e 72 mm di compressione. Le prime prove di pellettizzazione sono al momento in corso di svolgimento

OR2: Sviluppo di prodotti tecnici per l’agricoltura a base di farine disoleate come fertilizzanti organici azotati e ammendanti ad azione biofumigante

Att. 1. Messa a punto di specifici processi di proteolisi controllata finalizzati all’ottenimento di composti proteici ad uso fertilizzazione agraria [CSGI Firenze; CRA-CIN; Agrium] **a)** Definizione di due protocolli di idrolisi di farine di girasole e colza per diverse destinazioni d’uso: i) un idrolizzato proteico ottenuto a singolo stadio con

l'enzima Alcalasi della classe delle serina proteasi prodotta da *Bacillus licheniformis* per una produzione di peptidi per un utilizzo nella fertilizzazione radicale o come additivo proteico nell'alimentazione di animali da affezione ii) un idrolizzato proteico ottenuto a doppio stadio con l'applicazione dell'Alcalasi e del Flavourzyme estratto da *Aspergillus oryzae* per la produzione di aminoacidi liberi come biostimolanti fogliari. Ottimizzazione dei due processi per quanto riguarda i) la fase di pretrattamento delle farine ii) la fase di idrolisi enzimatica con uno screening di enzimi proteolitici iii) la fase di essiccazione e conservazione degli idrolizzati. **b)** Produzione di idrolizzati con più del 90% delle proteine presenti nella farina di partenza ed un contenuto amminoacidico pari a 10 g/L (35% sulle proteine totali). Il DH è risultato essere del 41%. **Att. 2. Realizzazione e validazione di concimi organici solidi e liquidi a lento rilascio a base di farine residue di Girasole AO e Colza 00 attraverso diverse formulazioni con idrolizzati proteici volte ad incrementarne le proprietà fertilizzanti [CRA-CIN; CSGI, C.I.R.A.A. Pisa; Agrium]**

a) In prove in microcosmo sulla mineralizzazione delle matrici organiche nel terreno, l'interramento di farine disoleate, oltre che arricchirlo di nutrienti, complessivamente, ha stimolato le attività microbiche migliorando le caratteristiche di fertilità del terreno stesso. I rilasci di CO₂ in atmosfera dovuti a incorporazione di farine non sono risultati correlabili alle variazioni di Carbonio organico nel terreno. **b)** Le farine derivate dal pannello di girasole, sia parzialmente che totalmente disoleate, hanno nel complesso evidenziato, nelle prove in lisimetro, un ottimo potere fertilizzante. Rispetto alla concimazione minerale, l'apporto delle stesse unità di N sotto forma organica legata alla frazione proteica del pannello di girasole ha determinato flessioni produttive modeste (raramente superiori al 10%) e talvolta non statisticamente significative. **Att. 3. Realizzazione di nuove formulazioni solide a base di farine residue come ammendanti ad azione biofumigante. Ricerca di nuove applicazioni nel settore agricolo ed industriale e loro validazione [CRA-CIN; CRA-ORA; Agrium]**

a) Messa a punto di sistemi per la riattivazione del sistema enzimatico disattivato durante la fase di disoleazione dei semi in modo da consentire il rilascio dei prodotti di idrolisi dei glucosinolati in tempi controllati dalla idratazione dei substrati, con una resa sul glucosinolato presente superiore all'80%. Le farine a base di carinata hanno sempre prodotto una maggiore proliferazione dell'apparato fogliare e radicale rispetto al testimone non trattato, soprattutto se in combinazione con il fungo benefico *Trichoderma harzianum* (isolato CRA-CIN), mentre nelle prove su *Pythium* non hanno diminuito la mortalità delle plantule da patogeno rispetto al testimone non trattato **b)** Le prove in vaso hanno mostrato un effetto di contenimento del nematode *Meloidogyne incognita* sia delle farine di carinata che di girasole rispetto al testimone non trattato nel caso di elevata infestazione, mentre le farine a base di carinata sono risultate maggiormente efficaci del girasole in presenza di medie-basse infestazioni. ii). Le prove in vaso in ambiente controllato sul contenimento di alcune specie di elateridi (*Agriotes* spp) hanno mostrato come due diverse formulazioni di farina di carinata hanno determinato una elevata

mortalità delle larve con relativa buona protezione delle plantule registrando minori erosioni sul seme ed un migliore stato delle plantule. c) La farina di carinata si è dimostrata, in prove in lisimetro, meno efficace della farina di girasole in termini di potere fertilizzante determinando mediamente cali produttivi dell'ordine del 20-25% rispetto alla tecnica di concimazione minerale. **Att. 4. Definizione di nuovi formulati liquidi da impiegarsi o nella difesa da funghi, insetti ed altri patogeni della parte aerea delle piante, o come biostimolanti per una distribuzione in manichetta e loro validazione [CRACIN, CRA-ACM, Agrium, CRA-ORA]** a) Messa a punto di tre formulazioni di sospensione di farine di carinata in una emulsione acqua-olio atte a riattivare il sistema enzimatico e determinare un rilascio di oltre l'80% degli isotiocianati potenziali in 30 minuti dall'aggiunta dell'acqua al formulato liquido-solido. b) Le formulazioni sono state diversificate per una distribuzione alla parte epigea ed alla parte ipogea della pianta per rendere più pratica ed efficiente la loro applicazione. I prodotti così preparati sono stati forniti alle diverse U.O. per lo svolgimento delle attività del progetto **Att. 5. Impiego della biofumigazione nella prevenzione dei marciumi che colpiscono i frutti dopo la raccolta: definizione di nuovi formulati a base di farina di carinata adatti allo scopo. [CRA- CIN; CRIOF Bologna]** a) La valutazione dell'AITC sintetico ha evidenziato in prove *in vitro* un valore di ED50 tra 0,61 e 0,92 µg/ml dopo 3 gg di incubazione sulla germinazione dei conidi di *Botrytis cinerea*. Il micelio è risultato più resistente rispetto ai conidi (ED50 dopo 3 gg compresa tra 1,23 ed 1,85 µg/ml). b) Conferma *in vivo* dei risultati di cui al punto a) su scala pre-pilota attraverso trattamenti in cabinotto in fase di post raccolta su fragole ed actinidia rispettivamente con dosi di AITC intorno 0,1 e 0,8 mg/L e un tempo di trattamento di 4-5 ore, con un indice di efficacia pari al 41 e 38,4%. c) i) Nel secondo anno il prodotto purificato è stato sostituito con farine di carinata opportunamente formulate ed in grado di rilasciare i prodotti di idrolisi in beuta esterna per essere poi pompate nel cabinotto di trattamento. Non sono stati registrati cambiamenti significativi di attività, né effetti fitotossici, ad eccezione di un colore più intenso e meno brillante delle fragole. ii) La valutazione della presenza di residui sulle fragole ha evidenziato una quantità di AITC intorno a 1 mg/Kg di frutta sia dopo un'ora che dopo una settimana dal trattamento. d) i) La valutazione dell'efficacia di formulati liquidi a base di glicerina nel contenimento di *Botrytis* su actinidia ha fornito risultati addirittura peggiori rispetto al testimone non trattato. ii) una prova di trattamento di patate Daisy ad una concentrazione di 1,3 mg/L di AITC puro, per 5 ore mostra differenze tra i campioni trattati e non trattati anche se è ancora in fase di valutazione iii) una prova su riso: "Galileo" infettato da *Fusarium*, sez. Liseola ha avuto una buona efficacia sul contenimento dei patogeni, ma una perdita totale della germinabilità della semente; **Att. 6. Validazione dei nuovi specifici formulati solidi (per una applicazione in pre-impianto) ad azione fertilizzante e/o ad azione ammendante per l'incremento della fertilità chimica e biologica dei terreni orticoli, frutticoli e floricoli [CRA-CIN; CRA-ORA; Agrium]** a) Avvio di una prova di fertilizzazione di pieno campo con farine residue. La prova è stata

trapiantata con pomodoro e melone alla fine di Maggio dopo una fertilizzazione pre-impianto ed è attualmente ancora in corso di svolgimento **b)** La prova di validazione delle farine ammendanti su un terreno naturalmente infestato da *Meloidogyne incognita* ha registrato durante la prova una distribuzione larvale molto eterogenea che ha determinato un'assenza di una ripetibilità dei 3 rilievi sulla conta delle galle sulle radici di pomodoro e melone. Nel secondo anno la prova sarà ripetuta valutando anche l'effetto fertilizzante ed eventualmente biocida di farine di carinata e girasole. **c) i)** Una prova di coltivazione di peperone dopo trattamento preimpianto con farine di carinata, tuttora in corso di svolgimento su terreno infetto da *Phytophthora capsici*, ha evidenziato un danno ridotto su tutte le file trattate rispetto al testimone non trattato anche se la malattia si è manifestata comunque. La tesi che finora appare migliore è quella trattata con pellett al dosaggio più alto **ii)** Una prova di coltivazione di crisantemo dopo trattamento preimpianto con farine di carinata, tuttora in corso di svolgimento su terreno infetto da Verticilliosi ha mostrato una riduzione della presenza dell'attacco dopo un intero ciclo di coltivazione. Lo spargimento del pellett attraverso macchine spandiconcimi tradizionali non ha presentato particolari problemi grazie alla consistenza che il pellett assume dopo il raffreddamento.

Att. 7. Validazione di formulati liquidi, nella difesa da funghi, insetti ed altri patogeni della parte aerea delle colture ed in fertirrigazione [CRA-CIN; CRA-ORA; CRA-ACM; Agrium] I formulati definiti nell'att. 4 **b)** hanno mostrato **a)** in prove svolte in Sicilia un chiaro effetto di contenimento di alcuni patogeni dell'apparato epigeo di agrumi quali afidi (*Aphis gossypii*), Cocciniglia asiatica degli agrumi (*Unaspis yanonensis*), Cocciniglia *Protopulvinaria pyriformis*, Ragno rosso degli agrumi (*Panonychus citri*), Cocciniglia cotonosa solcata degli agrumi (*Icerya purchasi*), Mosca bianca fioccosa (*Aleurothrixus floccosus*), Ragnetto rosso degli agrumi (*Tetranychus urticae*); mentre nell'uso per esche proteiche attivate con farine contro la mosca mediterranea *Ceratitis capitata* non è stata evidenziata alcuna azione di controllo. **b)** in prove svolte nelle Marche un potere abbattente analogo a quello del fitofarmaco convenzionale pur con una persistenza inferiore su alcuni patogeni tipici delle colture orticole quali l'oidio del melone (*Podosphaera xanthii*, *Golovinomyces cichoracearum*), il ragnetto rosso su melanzane e l'afide nero su carciofo (*Brachycaudus cardui*, *Aphis fabae-solanella*, *Capitophorus caeduinus*). In nessuna prova delle attività **a)** e **b)** il formulato, applicato alle dosi consigliate non ha mostrato alcun effetto fitotossico. **c) i)** La valutazione in capsula Petri dell'effetto anti-germinativo dell'allyl nitrile da Epiproigotrina da *Crambe abyssinica*, ha evidenziato un chiaro effetto anti-germinello con una relazione effetto-dose ed una sensibilità maggiore della *Lactuca sativa* rispetto alla *Portulaca oleracea*. **ii)** La valutazione dell'effetto combinato dei diversi prodotti di degradazione derivati da farine disoleate di *C. abyssinica* (allyl nitrile, Oxazolidine thione) ha mostrato un chiaro effetto sinergico sulla germinabilità e la vitalità delle plantule di lattuga.

OR3: Processi innovativi per la produzione di integratori a base di farine residue di Girasole AO e Colza 00 ad elevato valore aggiunto per l'alimentazione degli animali di affezione.

Att. 1. Applicazione di tecnologie di bioraffinazione (estrazione con micelle inverse e ultrafiltrazione) per la separazione dei componenti dei pannelli residui finalizzati all'ottenimento di diverse frazioni [CRA-CIN] a) Studi dei surfattanti non ionici e dei co-surfattanti (butanolo o isopropanolo) e del loro recupero hanno mostrato come l'uso delle micelle inverse non sembra una via percorribile nel breve periodo. b) Definizione della solubilità delle proteine a diversi pH come parametro fondamentale per una separazione delle diverse frazioni proteiche per mezzo di tecniche di ultrafiltrazione.

Att. 2. Messa a punto di processi enzimatici per incrementare il valore nutritivo di integratori adatti alla dieta di animali di affezione [CSGI Firenze; CRA-CIN; DSMV Bologna] a) i) Definizione delle metodiche per ottenere un idrolizzato proteico adatto all'alimentazione animale attraverso un processo di idrolisi a singolo stadio, a pH 8, in presenza di sola Alcalasi in modo da evitare l'accumulo di amminoacidi liberi responsabili di gusti amari tipici. In entrambe le farine, girasole e colza, è stato necessario isolare la frazione proteica prima di effettuare l'idrolisi, ii) Estrazione e precipitazione delle proteine mediante centrifugazione del campione dopo aggiunta di acido citrico (pH 4.5). ii) Risospensione delle proteine in acqua distillata riscaldata a 50 °C, in agitazione, e aggiustando il pH con KOH 2M in modo da favorire l'azione dell'Alcalasi (0.2 AU per grammo di proteina). La reazione di idrolisi è stata condotta per 1h. b) i) Analisi del profilo elettroforetico (SDS-PAGE) dell'idrolizzato presenza di bande a basso peso molecolare e l'accumulo di peptidi al di sotto del marcatore molecolare di 18 kDa. ii) Liofilizzazione e caratterizzazione degli idrolizzati per valutarne il tenore in proteine, lipidi, amido, fibra (incluse le frazioni fibrose NDF, ADF e ADL) e ceneri che evidenzia l'elevato tenore proteico ed il basso contenuto in fibra insolubile (NDF). c) Pianificazione e richiesta al comitato etico dell'Università di Bologna di autorizzazione allo svolgimento delle prove di tossicità degli idrolizzati su topo.

Att. 3 Caratterizzazione energetica e chimica del residuo dei processi di bioraffinazione per la produzione di calore o per un uso negli impianti per la produzione di biogas da reflui zootecnici [CRA-CIN; Progetto Euroverde] Sono stati valutati 3 campioni di residui dell'estrazione dell'olio (farina di girasole, farina di colza, pellet di girasole), rilevando un analogo potere metanigeno in termini di contenuto in m³ di biogas per tonnellata di sostanza organica volatile, pari a 455, con un contenuto in CH₄ del 56,8%.

Att. 3 Caratterizzazione energetica e chimica del residuo dei processi di bioraffinazione per la produzione di calore o per un uso negli impianti per la produzione di biogas da reflui zootecnici [CRA-CIN; Progetto Euroverde] Sono stati valutati 3 campioni di residui dell'estrazione dell'olio (farina di girasole, farina di colza, pellet di girasole), rilevando un analogo potere metanigeno in termini di contenuto in m³ di biogas per tonnellata di sostanza organica volatile, pari a 455, con un contenuto in CH₄ del 56,8%.

OR 4: Validazione economica, ambientale e di mercato delle innovazioni proposte.

Att. 1. Analisi economica del ciclo di produzione dei diversi processi e prodotti innovativi [CRA–CIN; C.I.R.A.A Pisa] a) Sono stati individuati i venti prodotti che saranno studiati dal progetto ed il livello di sviluppo raggiungibile, ma la valutazione economica non è stata possibile nei primi 18 mesi in assenza di prove su scala pre-pilota che avrebbero dovuto fornire i dati per l'analisi. **Att. 2. Analisi energetica ed ambientale dei co-prodotti proposti rispetto agli omologhi presenti sul mercato e rispetto alla sostenibilità della filiera biodiesel [CRA-CIN; C.I.R.A.A Pisa]** a) Definizione della metodologia per il calcolo di sostenibilità dei bioprodotto ed applicazione al caso studio dei prodotti per biofumigazione. La coltivazione di un ettaro di Brassica carinata nel centro Italia per la produzione dei formulati in prova potrebbe consentire di risparmiare circa 1,5 t di CO₂eq rispetto all'utilizzo dei tre omologhi che si vanno a sostituire. b) Valutazione di nuovi criteri di sostenibilità che prevedano di considerare gli aspetti di tossicità e biodegradabilità dei nuovi bioprodotto. **Att. 3. Analisi di mercato dei prodotti innovativi per definirne le prospettive applicative [CRA-CIN; Chimica verde Bionet; C.I.R.A.A. Pisa]** Definizione di un primo quadro conoscitivo sul mercato e sulle principali politiche di ricerca pubblica in atto nel campo delle Bioraffinerie e dei prodotti Bio-based.

OR 5 Trasferimento e divulgazione delle conoscenze acquisite

Att.1. Trasferimento al mondo agricolo ed industriale delle conoscenze acquisite al fine di facilitare un'ampia applicazione delle tecnologie acquisite [CRA–CIN; Chimica verde Bionet] a) Trasferimento e divulgazione delle conoscenze acquisite, sono state registrate 15 lettere di manifestazione di interesse di realtà agricole ed industriali. b) Realizzazione, stampa e diffusione del pieghevole di presentazione generale del progetto all'indirizzario del progetto in accordo con il CRA-CIN c) Predisposizione dello schema di schede informative per distributori ed utilizzatori finali dei settori oggetto di studio d) Presentazione del progetto in quattro eventi di rilevanza nazionale e) Partecipazione a due fiere in Italia di rilevanza internazionale (Bioenergy Cremona e Terra futura a Firenze). f) Realizzazione del sito del progetto VALSO sulla piattaforma www.chimicaverde.it