

Agrobiopolis: una infrastruttura di ricerca a supporto dello sviluppo delle biotecnologie e della *green chemistry*

Il Centro di Innovazione Integrato Agrobiopolis rappresenta una infrastruttura di ricerca a supporto dello sviluppo ed applicazione delle biotecnologie e della *Green Chemistry*. Agrobiopolis, potendo contare su una dotazione strumentale ed impiantistica d'avanguardia, costituisce oggi un Polo Tecnologico multidisciplinare in grado di fornire Servizi Tecnologici Avanzati nei settori agroindustriale ed agroenergetico e aperto alle collaborazioni con soggetti privati (PMI) e pubblici. Nell'articolo, si riportano le schede sintetiche di alcuni casi applicativi di successo realizzati mediante l'impiego delle strumentazioni scientifico-tecnologiche di Agrobiopolis

■ Roberto Balducchi

Il **Centro di Innovazione Integrato Agrobiopolis** (figura 1), realizzato nell'ambito del Programma Fondi Strutturali dell'Unione Europea, situato all'interno del Centro Ricerche Trisaia dell'ENEA di Rotondella (MT), costituisce un Polo Tecnologico multidisciplinare aperto alle collaborazioni con soggetti pubblici e privati. Le attività di RS&T vengono effettuate utilizzando le infrastrutture scientifico-tecnologiche ivi disponibili e si pongono la finalità generale di sviluppare ed applicare processi e metodologie su base biotecnologica nei settori agroindustriale, agroalimentare ed agro-energetico. Agrobiopolis è articolato in aree funzionali comprendenti un Complesso Impiantistico Multifunzionale nella Hall Tecnologica, una serie di Laboratori Specialistici

ed un Demo Center. La disponibilità contestuale di Laboratori Specialistici attrezzati con strumentazioni avanzate e di Unità Operative Pilota installate nella



FIGURA 1 Centro di Innovazione Integrato Agrobiopolis
Fonte: ENEA

■ Roberto Balducchi

ENEA, Unità Tecnica Tecnologie Trisaia

Hall Tecnologica, rende possibile progettare e sviluppare processi su base chimico-biotechologica, dalla scala laboratorio fino alla scala preindustriale, e valutare il grado di innovazione dei risultati ottenuti verificandone la sostenibilità tecnico-economica e la possibilità di trasferimento su scala industriale.

Il Centro di Innovazione Integrato Agrobiopolis

La strumentazione e gli impianti disponibili consentono di operare in molteplici aree scientifico-tecnologiche tra cui quelle di genomica, proteomica, metabolomica, fermentazione, estrazione con fluidi supercritici, *Mild Technologies* per il settore agroalimentare, diagnostica alimentare e fitopatologica, analisi NMR, valorizzazione produzioni vegetali, preparazione di Materiali di Riferimento per l'agroalimentare (figura 2). L'acquisizione, anche recente, di avanzate strumentazioni da laboratorio, ha permesso di dotare Agrobiopolis di elevate capacità di RS&T in settori e discipline fortemente collegate sia alle esigenze del mondo della ricerca che del mondo produttivo. La dotazione del Complesso Impiantistico Multifunzionale è costituita da una serie di Unità Operative Pilota progettate sia per essere gestite autonomamente che per integrarsi tra loro al fine di poter sperimentare, fino alla scala pilota, differenti processi nei settori agro-industriale ed agro-energetico. Agrobiopolis costituisce quindi un importante punto di riferimento infrastrutturale, tecnico-scientifico ed

organizzativo nella strategia dell'Agenzia e del sistema della ricerca industriale, sia in attività finalizzate, sia al conseguimento di un aumento della conoscenza, sia nei confronti delle collaborazioni con il sistema pubblico/privato. Presso Agrobiopolis è possibile inoltre usufruire dell'offerta di servizi tecnologici specialistici avanzati, ospitare società di *spin-off* e *start-up*, usufruendo inoltre di training formativi di elevata specializzazione. Attraverso le competenze e le facilities disponibili, le attività di RS&T svolte presso Agrobiopolis si pongono in definitiva l'obiettivo generale di introdurre fattori di innovazione lungo i processi produttivi allo scopo di privilegiare le esigenze di sostenibilità delle diverse fasi, nonché rispondere, attraverso lo sviluppo di nuovi prodotti e processi basati sul potenziale innovativo delle biotecnologie, alla sempre crescente richiesta di prodotti a più alto contenuto tecnologico e di servizio ed a minore impatto ambientale.

Si riportano di seguito alcuni casi applicativi realizzati mediante l'impiego delle infrastrutture scientifico-tecnologiche di Agrobiopolis, sia nell'ambito di progetti finanziati condotti in partenariato pubblico/privato, che in risposta alla domanda proveniente dal sistema produttivo.

Processi di produzione su larga scala di lieviti ad attività antagonista

I danni causati alle produzioni ortofrutticole dagli agenti patogeni assumono, per alcune specie e varietà e, particolarmente, in alcune fasi della filiera

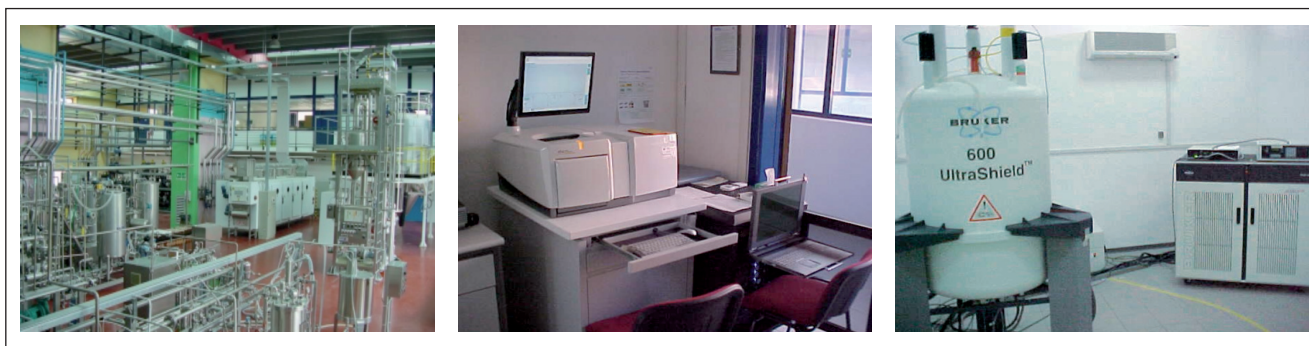


FIGURA 2 Centro di Innovazione Integrato Agrobiopolis a) La Hall Tecnologica b) High Throughput Sequencing Lab c) Laboratorio NMR
Fonte: ENEA



FIGURA 3 Azione inibitrice di lieviti antagonisti evidenziata su piastra Petri
Fonte: ENEA



FIGURA 4 Stazione BIOLOG, Laboratorio Fitopatologia, Centro Ricerche Trisaia
Fonte: ENEA



FIGURA 5 Fermentatori scala laboratorio, Laboratorio Camera Bianca Agrobiopolis, Centro Ricerche Trisaia
Fonte: ENEA

quali il post-raccolta ed il successivo stoccaggio, dimensioni che possono raggiungere anche il 60% di perdita del prodotto, con gravi evidenti ripercussioni economiche. Tra gli agenti di danno maggiormente significativi si annoverano principalmente i funghi fitopatogeni ed opportunisti, per il cui controllo e contenimento si utilizzano principi chimici ad attività fungicida. Tale consuetudine è accompagnata però dal crescente pericolo che possano essere trascinati nel prodotto finale residui chimici a livelli elevati e quindi potenzialmente tossici, con evidente rischio per il consumatore. In particolare la salubrità dei prodotti frutticoli è posta maggiormente a rischio quando l'uso dei fungicidi è effettuato dopo la raccolta, soprattutto nei casi in cui i tempi fra il trattamento ed il consumo sono ristretti, come spesso accade per specie quali gli agrumi, le fragole e l'uva. La legislazione vigente è in tal senso molto stringente e quindi, in teoria, non dovrebbero essere mai presenti, oltre certi limiti, residui di principi attivi nel prodotto "al banco". Nonostante ciò e nonostante i continui controlli, sia interni che esterni, è un rischio che oggettivamente esiste. Da tali osservazioni e da una serie di elementi di contesto più generale, quali la globalizzazione dei mercati, la mutata domanda di tipologia di prodotti da parte del consumatore, orientato maggiormente di un tempo verso le produzioni biologiche e comunque verso una maggiore qualità complessiva delle

produzioni agroalimentari, la riduzione o il divieto di utilizzo di alcuni presidi fitosanitari, l'aumentata selezione verso ceppi fungini resistenti esercitata dai prodotti chimici, già da diverso tempo ci si è orientati verso la ricerca e lo sviluppo di metodologie biologiche di controllo di tali fitopatie, in sostituzione o integrazione di quelle esistenti. Più in particolare, una metodologia alternativa di controllo di fitopatie prevede l'utilizzo di microrganismi che ne contrastino lo sviluppo, secondo varie strategie metaboliche, e tra questi, fra i più promettenti, vi sono i funghi (lieviti) cosiddetti "antagonisti".

Molti sono i lieviti isolati che sembrano avere marcata attività antagonista verso importanti patogeni. La stessa industria degli agro-farmaci è sempre più impegnata nella ricerca e sviluppo di presidi su base biologica utilizzabili nell'ambito di piani di difesa integrata ecocompatibile. Spesso però la gran parte di tale attività è testata solo fino alla scala di laboratorio ed è noto come la difficoltà maggiore per rendere tale capacità potenziale effettivamente utilizzabile su scala industriale, sia quella di riuscire a trasferire la metodologia dal laboratorio fino alla scala pilota, definendo con sufficiente precisione sia la metodologia di processo su scala pre-industriale che la fattibilità e convenienza tecnico-economica generale dello stesso. Nell'ambito di alcuni Progetti finanziati ed in partenariato con altri soggetti pubblici e privati,



FIGURA 6 Unità Operativa Pilota di Fermentazione (50 e 500 litri), Hall Tecnologica Agrobiopolis, Centro Ricerche Trisaia
Fonte: ENEA



FIGURA 7 Unità Operativa Pilota di Liofilizzazione (Capacità di carico 3 mq), Hall Tecnologica Agrobiopolis, Centro Ricerche Trisaia
Fonte: ENEA

l'ENEA ha messo a punto una metodologia finalizzata alla produzione su scala pilota (pre-industriale) di microrganismi antagonisti (lieviti del genere *Pichia* selezionati da ambienti naturali) da impiegare in programmi di lotta biologica in fase di pre-raccolta ed in post-raccolta contro funghi patogeni agenti di decadimento della frutta (in particolare verso agrumi, uva e fragole) (figura 3).

Inizialmente i ceppi selezionati sono stati caratterizzati sia dal punto di vista metabolico (mediante stazione BIOLOG - figura 4) che molecolare (mediante rRNA Sequencing) per la corretta identificazione. Successivamente si è messo a punto il protocollo di allevamento culturale

su scala laboratorio (fermentatore da 5 litri- figura 5), prediligendo terreni e substrati minimi o derivati anche da materie prime vegetali povere.

La fase successiva ha visto il trasferimento e adattamento della metodologia messa a punto in laboratorio su fermentatore in scala pilota da 50 litri e quindi da 500 litri (figura 6). Da questo punto in poi il resto delle fasi del processo sono state effettuate su alcuni altri impianti su scala pilota di Agrobiopolis.

La biomassa ottenuta, dopo opportuna separazione mediante centrifugazione, è stata quindi liofilizzata (figura 7) e conservata in adatto *packaging*. Lungo le varie fasi produttive è stata verificata la qualità



FIGURA 8 Campioni di lievito liofilizzato ottenuto alla fine del processo produttivo su scala pilota
Fonte: ENEA

complessiva della biomassa ottenuta, sottoponendone dei campioni alla determinazione dell'identità e vitalità, nonché alla verifica dell'assenza di microrganismi contaminanti, ricorrendo a metodiche microbiologiche, biochimiche e molecolari rapide, affidabili e riproducibili.

Il prodotto liofilizzato così ottenuto a base di lieviti (figura 8) possiede proprietà antagoniste nei confronti dei funghi agenti di marciume dei frutti di agrumi, uva e fragole.

Gli effetti dell'applicazione diretta del liofilizzato in sospensione acquosa ad idonee concentrazioni sui frutti, sono rappresentati da un contenimento del processo infettivo da parte dei funghi e quindi da una ridotta dannosità economica dell'infezione.

L'efficacia dei lieviti liofilizzati è stata attualmente provata esclusivamente a livello sperimentale in campo e nei magazzini di stoccaggio della frutta. Si prevede pertanto di sviluppare tutta la RST&D necessaria alla formulazione e registrazione di un biofungicida commerciale a base di lieviti (con le relative sperimentazioni in campo tossicologico ed ecologico).

Processi di estrazione di principi attivi da matrici vegetali con l'anidride carbonica (CO₂) allo stato supercritico

Le piante superiori sintetizzano un gran numero di sostanze chimiche e biologicamente attive, conosciute anche come "metaboliti secondari". Queste sostanze possono essere sfruttate, in funzione della specifica composizione chimica, per la preparazione di prodotti farmaceutici, cosmetici, liquoristici, di sostanze coloranti, di oli essenziali, di ingredienti per l'industria alimentare, di prodotti per la difesa delle colture. Le tecniche di estrazione utilizzate, le cui radici affondano in tempi antichi, sono oggi le più svariate. Tra queste si rammentano le semplici tecniche di spremitura, macerazione e percolazione, la distillazione in corrente di vapore, l'utilizzo di ultrasuoni, l'estrazione con fluidi supercritici fino alla più recente tecnica di estrazione che utilizza l'estrattore Naviglio. Ognuna di queste presenta caratteristiche particolari che la rendono applicabile e preferibile a seconda dei casi.

In determinati casi molte delle tecniche di estrazione

solido-liquido citate non risultano soddisfacenti (difficoltà nel recuperare l'estratto in maniera selettiva ed esaustiva, difficoltà nel calcolare i tempi ed i costi di processo, presenza spesso a livelli elevati di residui di solvente negli estratti ecc.). Per tali motivi la ricerca, per trovare delle valide alternative, si è indirizzata già da diversi anni verso l'utilizzo di estrazioni mediante l'utilizzo di fluidi allo stato supercritico (*SFE, Supercritical Fluid Extraction*): infatti le tecnologie di estrazione in fluidi supercritici hanno molte applicazioni potenziali nei processi di estrazione e frazionamento, come alternativa ai processi di separazione convenzionali. Il fluido comunemente impiegato è costituito da anidride carbonica allo stato supercritico. I motivi di questa scelta sono ambientali (la CO₂ non è tossica, non contamina gli estratti ed è poco costosa) e tecnico (possono essere raggiunte facilmente sia la sua temperatura critica che la pressione critica). Nei processi industriali, la CO₂ inoltre può essere riciclata minimizzandone il consumo. L'anidride carbonica in fase supercritica assume le caratteristiche di solvente non polare: con questo metodo è perciò possibile estrarre principalmente composti non polari da matrici generalmente solide. Il vantaggio della SFE è che alla fine dell'estrazione il solvente (l'anidride carbonica) viene allontanato sotto forma di gas dando la possibilità di recuperare i composti estratti concentrati e privi di residui di solvente. Questa tecnica trova attualmente applicazioni a livello industriale come l'estrazione dell'olio dai semi, della caffeina dal caffè, della nicotina dal tabacco, del grasso dell'olio di semi ecc. Accanto a questi settori trova applicazione nel settore degli aromi e delle essenze e, più recentemente, nel settore farmaceutico e dei materiali.

L'ENEA, da più di due decenni, è impegnata nello sviluppo e messa a punto di protocolli di estrazione di metaboliti secondari e sostanze utili impiegando la tecnica SFE mediante l'utilizzo degli impianti su scala laboratorio (figura 9) e su scala pilota (figura 10) disponibili presso le proprie infrastrutture tecnologiche di Agrobiopolis in Trisaia, che completano ed integrano quelle disponibili presso il Centro Ricerche della Casaccia (Roma).

Tra le piante o parti di esse (fiori, foglie, radici, bucce ecc.) che sono state oggetto di indagini utilizzando

la SFE, si citano, tra le altre, piante officinali, l'olivo, l'alloro, gli agrumi, la vite, nonché le biomasse residue al termine delle colture (carciofo) o i residui di lavorazione industriale e agricola (pomodoro, carciofo, vite) allo scopo di ricavarne principi attivi di interesse industriale: sostanze bioattive, nutraceutici e/o antiossidanti (flavonoidi, fenilpropanoidi, antociani e secoiridoidi).

Tra le applicazioni della tecnica SFE più recentemente utilizzate si segnalano quelle per ottenere sostanze naturali da specie vegetali (alloro, arancio dolce, olivo) da poter impiegare nella difesa delle colture agrarie e quelle finalizzate ad estrarre sostanze ad attività antiossidante (da farine di grano saraceno) e farmaceutica (da bucce di specifiche cvs di limoni). La caratterizzazione chimica degli estratti e la loro stabilità e composizione nel tempo vengono effettuate tipicamente mediante analisi chimica, cromatografia liquida o gascromatografia. I protocolli di estrazione e caratterizzazione sono stati messi a punto sia su scala laboratorio che su scala pilota.

Processi di trasformazione e valorizzazione del latte d'asina

Tale azione si inserisce nel quadro più generale che ha come obiettivo la valorizzazione di produzioni agroalimentari tipiche e tradizionali. L'obiettivo che ci si è prefissati, nel caso specifico della filiera del latte d'asina e dei suoi derivati, è quello di tentare di trovare soluzione ad aspetti tecnologici che ne limitano la effettiva trasformazione e successiva commercializzazione. Ciò può essere perseguito sia mettendo a punto metodologie produttive che sistemi di trasformazione e conservazione che consentano di passare dall'attuale modello produttivo artigianale ad un modello che risponda ai requisiti minimi tipici di un sistema di produzione di livello industriale. Tale passaggio richiede consistenti modifiche ed integrazioni al modello esistente, integrazioni e modifiche che, per la parte tecnologica, vanno testate su piccola scala prima del successivo passaggio su scala maggiore.

Le tendenze verso una alimentazione di qualità e "sostenibile", nel senso più ampio del termine, sono in costante crescita e compito del mondo della ricerca



FIGURA 9 Impianto CO₂ SFE da Laboratorio (Capacità fino a 1 litro), Laboratorio di chimica analitica Agrobiopolis, Centro Ricerche Trisaia
Fonte: ENEA

industriale è anche quello di individuare soluzioni che concilino tali esigenze con quelle del mercato (industria e consumatore) e dello sviluppo rurale. In tale contesto si inserisce la richiesta pervenuta da parte degli operatori del settore tesa a valorizzare una produzione tipica e di elevato valore aggiunto, quale quella del latte d'asina.

L'interesse legato a questa particolare produzione da parte degli operatori del settore va di pari passo con l'interesse mostrato dal consumatore verso i *farma-food*, o nutraceutici, ed il crescente desiderio



FIGURA 10 Unità Operativa Pilota CO₂ SFE (Matrici solide, liquide e viscoso; capacità fino a 15 litri), Hall Tecnologica Agrobiopolis, Centro Ricerche Trisaia
Fonte: ENEA



FIGURA 11 Unità Operativa Spray-dryer (Capacità 20 Kg/h), Hall Tecnologica Agrobiopolis, Centro Ricerche TRISAIA
Fonte: ENEA

di poter disporre di produzioni agroalimentari e zootecniche orientate a garantire il benessere e la salute. Il latte d'asina, per il suo particolare profilo biochimico, che lo rende il più simile a quello materno, è considerato per tali motivi già di per sé un nutraceutico particolarmente utile nell'alimentazione dei lattanti e nell'infanzia nei casi di intolleranza o allergie ad altri tipi di latte. La presenza nel latte d'asina di sostanze ad attività probiotica, di anticorpi e di composti azotati ad azione antibatterica, rende peraltro questo alimento molto utile anche nell'alimentazione delle persone anziane e debilitate. Altro impiego noto fin dall'antichità è inoltre quello cosmetico. Studi recenti su bambini allergici al latte vaccino hanno dimostrato che il latte di asina è tollerato dalla maggior parte di loro. Il sapore dolce lo rende infatti gradevole e ben accetto a differenza delle alternative



FIGURA 12 Cosmetico a Base di liofilizzato di latte d'asina
Fonte: ENEA

formule speciali a base di idrolisati proteici o di aminoacidi, il cui utilizzo nei bambini è compromesso proprio dal retrogusto amaro.

L'ENEA, su specifica richiesta di Associazioni di allevatori, ha partecipato a programmi di ricerca industriale che avevano l'obiettivo di superare alcuni limiti nell'impiego su scala industriale di tale prodotto (modesta produzione in volume di latte per capo, discontinuità temporale e parcellizzazione logistica della produzione su scala nazionale, scarsa conservabilità) tra i quali, in particolare, l'esigenza di trasformare rapidamente il latte fresco, mantenendone inalterate le caratteristiche biochimico-fisiche e nutraceutiche.

A tal fine si sono effettuate delle prove preliminari di liofilizzazione *mild* su piccola scala, verificando l'efficacia di alcuni protocolli. Dopo aver individuato la tecnologia più adeguata di liofilizzazione (basata sull'utilizzo dello *Spray-dryer* – figura 11) e messo a punto il protocollo, si sono impiegate le *facilities* impiantistiche su scala pilota disponibili presso Agrobiopolis per verificare la fattibilità tecnico-economica su grande scala trasformando 600 litri di latte. I risultati ottenuti dalle analisi chimico-fisiche hanno confermato la sostenibilità del processo.

Accanto a questo risultato, con la polvere di latte liofilizzato ottenuto a valle del processo su scala pilota, gli operatori industriali hanno messo a punto e commercializzato anche dei prodotti cosmetici (figura 12).