

Il settore lattiero caseario integrato alla produzione di microalghe: caso studio della scotta

Venerdì, 17 dicembre 2021
Convegno finale - Polo delle Microalghe

Katia Parati
Istituto Spallanzani

Progetto finanziato da:

CARATTERIZZAZIONE SCOTTA

-PRODUZIONE DI **SCOTTA** IN Italia: **1.000.000 t/anno** (siero esausto derivato dalla produzione di ricotta)

	H ₂ O (%)	S.S (%)	Lattosio (%)	Cloruri (%)	Proteine (%)	Grasso (mg/l)	Ceneri (%)	BOD (gO ₂ /L)	COD (gO ₂ /l)	pH
Scotta	94-95	5-6	3,5-4,5	0,5-1,8	0.3 – 0.5	45	0.6 – 2	20 – 30	60 – 70	5-6



CARATTERIZZAZIONE SCOTTA

	pH	N-NO3 (mg/l)	N-NH4 (mg/l)	TKN (mg/l)	P-PO4 (mg/l)	COD (gO2/l)
Scotta	5,5	2	10	450-500	45	50-55
Scotta (post termocalcificazione)	7,7	0-1	3,5	175-200	4,5	14

Scotta: COD alto, competizione con batteri

In collaborazione con caseificio Il Cigno, di Agnadello (CR)

PROCESSO DI TERMOCALCIFICAZIONE



Quali specie?

Valutazione in laboratorio delle specie idonee alla crescita su scotta

- *Arthrospira platensis*
- *Euglena gracilis*



Arthrospira platensis (Spirulina)

Content in 100 g

Proteins 35.4–70.0 g

Amino

acids Glutamate

7.0–7.3 g

Leucine 5.9–8.4 g

Aspartate 5.2–6.0 g

Lysine 2.6–4.6 g

Tyrosine 2.6–3.4 g

Phenylalanine

2.6–4.1 g

Methionine 1.3–2.7 g

Fat 4.0–16.0 g

% of total fatty

acids Palmitic

25.8–44.9%

Gamma-linoleic

17.1–40.1%

Linoleic 11.1–12.0%

Oleic 10.1–16.6%

Palmitoleic 2.3–3.8%

Stearic 1.7–2.2%

Carbohydrates

14.0–19.0 g

Crude fiber 3.0–7.0 g

Minerals

Potassium 2.0–2.6 g

Sodium 1.5–2.2 g

Total phosphorus

1.3–2.2 g

Iron 273.2–787.0 mg

Magnesium 330

Calcium 120–900 mg

Vitamins

B12 5.7–38.5 µg

B2 3.0–4.6 mg

B6 0.5–0.8 mg

Niacin (B3) 13–15 mg

Folic acid

0.05–9.92 mg

Carotenoids 0.3–2.6 g

Tocopherol 0.4–9.8 g

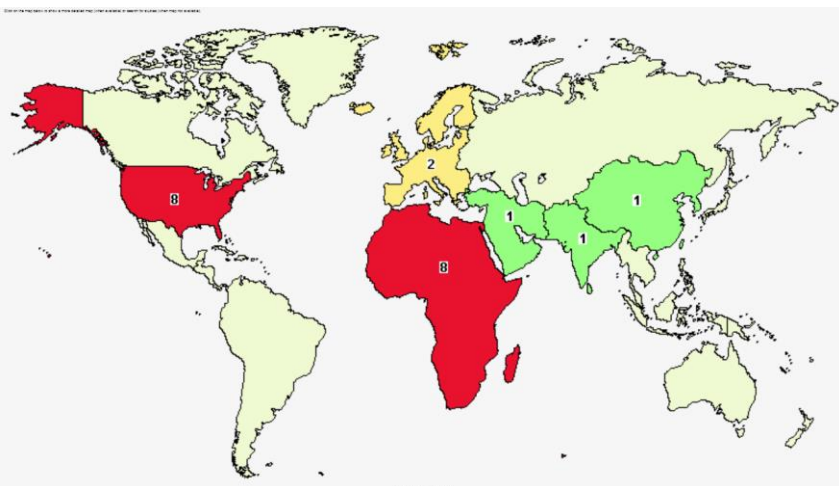
In 1967 Spirulina was recognized as a 'future food source' by the International Association of Applied Microbiology

*Generally recognized as safe
(GRAS) dal 1981 (FDA)*

Antiossidante
 Antinfiammatorio
 Ipoglicemizzante
 Antipertensivo
 Immunostimolante



TRIAL CLINICI



Least  Most
Labels give the exact number of studies.

ClinicalTrials.gov (ultimo accesso 16/12/2021)
"Spirulina"

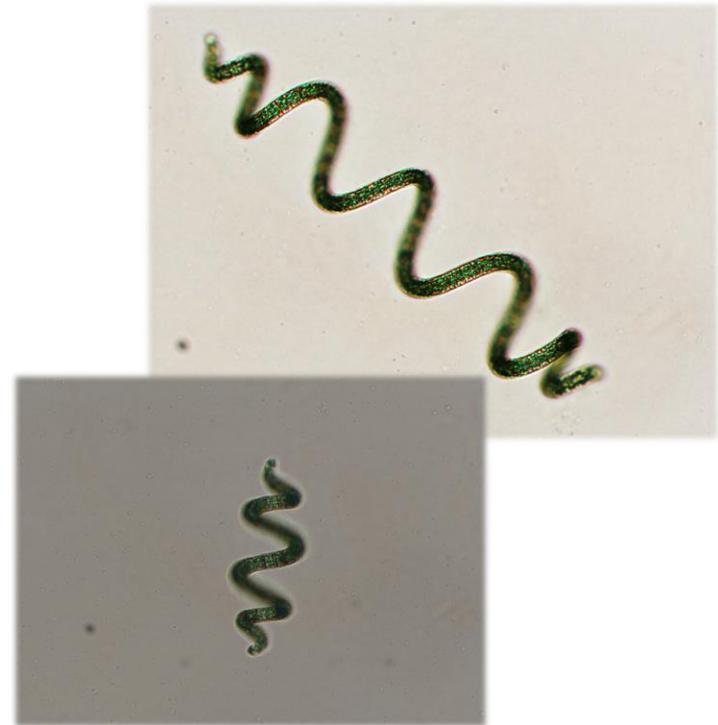
- 57 studi totali nel mondo, di cui:
- 33 studi nel mondo «completati»
- 24 studi nel mondo «in fase di completamento»

1	☐	Completed	Vitamin A Value of Spirulina Carotenoids in Humans
2	☐	Completed	Spirulina Supplementation and Infant Growth, Morbidity and Motor Development
3	☐	Completed	Effect of Spirulina on Zinc, Vitamin E and Linoleic Acid Levels in Palm Skin Following Chronic Exposure to Arsenic
4	☐	Completed	Carbon-13 (13C)-Spirulina Platensis Gastric Emptying Breath Test (GEBT) Has Results
5	☐	Completed	Effects of Spirulina Supplementation on Overweight or Obese Adults
6	☐	Completed	Effects of Spirulina on Cardiac Functions in Children With Beta Thalassemia Major
7	☐	Completed	Effect of Spirulina on Liver Iron Concentration in Beta Thalassemic Children With Hepatitis C
8	☐	Completed	Effect of Spirulina on Serum Hyaluronic Acid in Beta Thalassemic Children With Hepatitis C
9	☐	Completed	Effect of Spirulina on Liver Fibrosis by Transient Elastography in Beta Thalassemic Children With Hepatitis C
10	☐	Completed	The Effects of Spirulina Platensis on Insulin Resistance in HIV-infected Patients

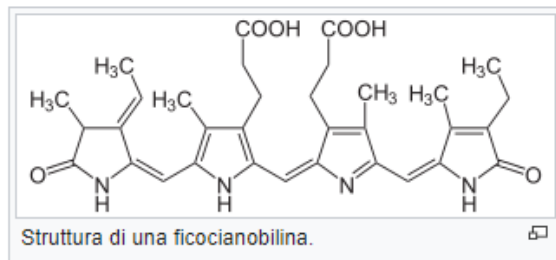
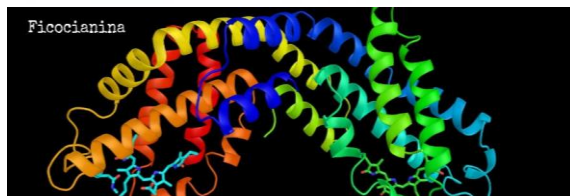
Arthrospira platensis

Cianobatterio caratterizzato da cellule formanti colonie a forma di spirale tricoli. Predilige acque salate, alcaline e calde.

Proprietà: proteine (60-70%), PUFA, pigmenti (**ficocianina**, betacarotene), vitamine (B, D, E, H) → cosmetica, nutraceutica, alimentare, mangimistica



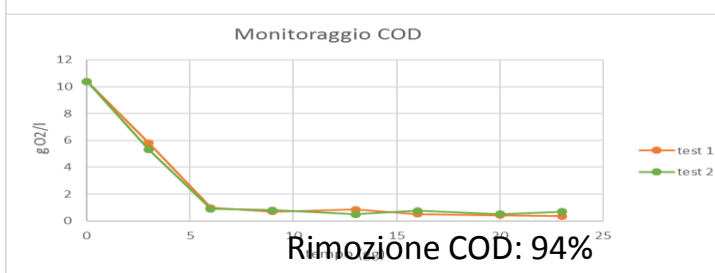
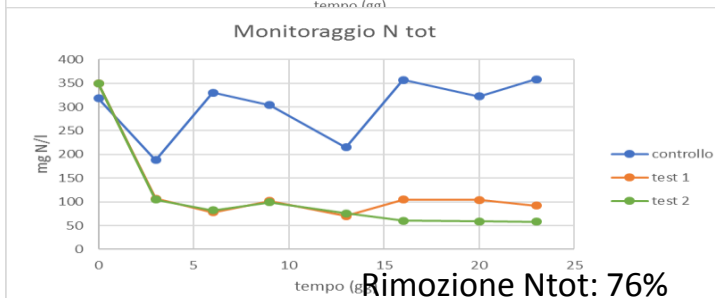
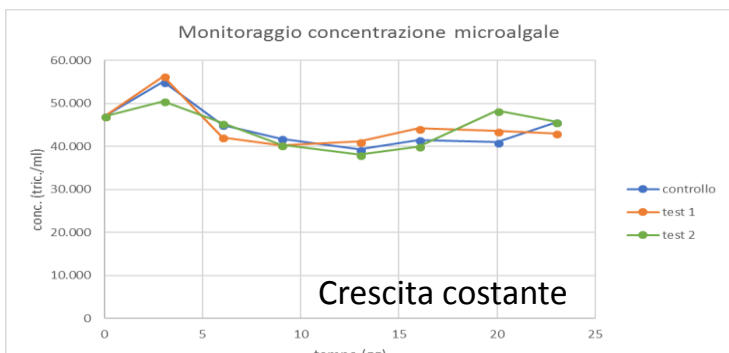
Valorizzazione dell' Arthrospira nel settore cosmetico e nutraceutico



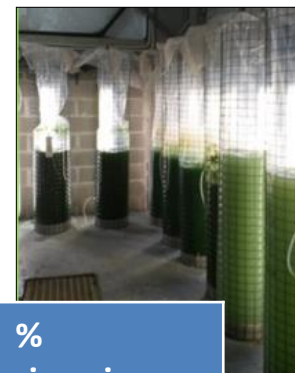
FICOCIANINA: associazione di proteine della famiglia delle ficobiliproteine, e di pigmenti idrosolubili della fotosintesi, le ficocianobiline, della famiglia delle ficobiline.

- potente antiossidante (40 volte superiore rispetto a quello della vitamina C e della vitamina E). Contrasta stress ossidativo.
- contrasta gli stati infiammatori
- contribuisce al rinvigorimento del **sistema immunitario**
- **alleviare i sintomi delle allergie stagionali.**

Coltivazione delle microalghe per la rimozione di nutrienti da sottoprodotti lattiero caseari



Prova di coltivazione di *Arthrospira platensis* (spirulina) su scotta salata: prova alla scala pilota (semi-batch)

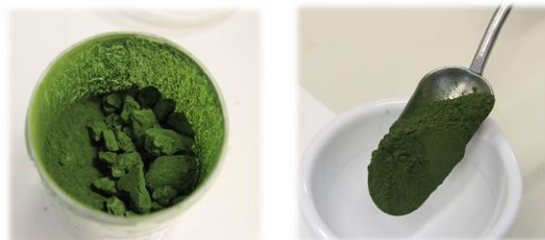
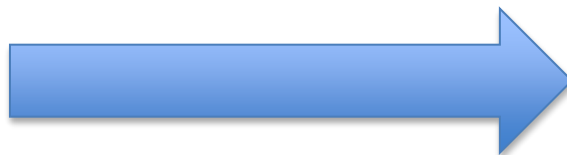


Parametro	Caratteristiche Scotta	Caratteristiche e effluente	% rimozione
pH	5,5	9	
COD (g/L)	10	0,5	95%
N-NO3 (mg/L)	<1	0	100%
N-NH4 (mg/L)	10	0	100%
N-tot (mg/L)	720	50-100	87-93%

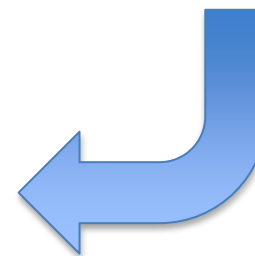




Raccolta



Liofilizzazione



Analizzata per verificare vie
di Valorizzazione



Analisi Biochimiche e microbiologiche della spirulina cresciuta su scotta

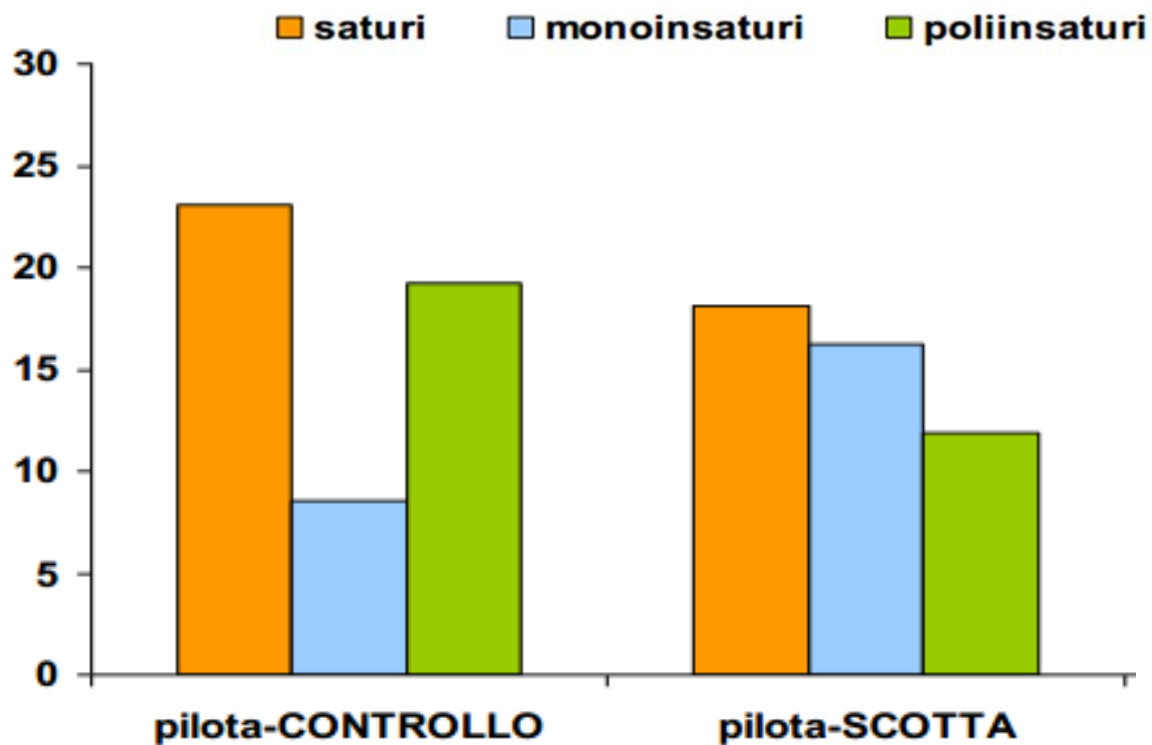
Campioni (dopo 25 gg)	Carica batterica totale	Enterobatteri	E. coli	sporigeni solfito riduttori	FA	Salmonella
Arthrospira platensis (control)	9,5E+04	<100	<100	<100	-	assente
Arthrospira platensis (scotta)	1,2E+05	<100	<100	<100	-	assente

Dati espressi come ufc/g

g/100g (dopo 6 gg)	Umidità (%)	Proteine (%)	Carboidrati (%)	Lipidi (%)	Ceneri(%)
Arthrospira platensis (control)	8,5	51.8	10.3	12,5	14,2
Arthrospira platensis (scotta)	8.05	47.43	5.26	9.7	24,8

g/100g (dopo 25 gg)	Umidità (%)	Proteine (%)	Carboidrati (%)	Lipidi (%)	Ceneri (%)
Arthrospira platensis (control)	9,7	45.1	9.3	13,5	17,1
Arthrospira platensis (scotta)	11.30	35.91	2.59	14,1	34

Composizione in acidi grassi



Spirulina nella mangimistica



- Nella carpa comune migliora la crescita e aumentare il tenore di proteine e grassi (Abdulrahman e Ameen, 2014)
- Stimolano pigmentazione pesci ornamentali, come ad esempio le carpe Koi (Gouveia, 2003),
- Stimola sistema immunitario delle larve di trota aumentando resistenza ai patogeni (Yeganeh, 2015).



- Induce aumento del tenore di grassi, proteine e lattosio nel latte di vacca (Simkus et al., 2007-2008), la cui produzione può aumentare del 21% (Kulpys et al., 2009).
- Migliora crescita e fertilità (Holman, 2013)

Saggio alimentare su *giovani di Storione (Acipenser baeri)*

Produzione mondiale caviale: 250 ton/year, per oltre €400 milioni per anno, potenziale di crescita. L'Italia (**LOMBARDIA**) è leader in Europa per la produzione di caviale (50 ton nel 2018) e seconda a livello mondiale (tra Cina e Russia)



Produzione
 biomassa
 microalgale (da
 medium sintetico
 standard (MS) e
 da SCOTTA
 (SCOTTA)

Raccolta e
 liofilizzazione

Preparazione
 mangimi

Prova
 alimentare su
 giovani storioni

Collaborazioni esterne al Polo: AIA (Veronesi), Università di Almeria (Spagna) e Università di Milano

5. Feeding trials and growth performance

The following parameters were calculated per group over 40 days of feeding trial:

Feed intake during the trial

Specific growth rate (SGR): $100 \times [(\ln \text{ final body weight} - \ln \text{ initial body weight}) / \text{days}]$

Feed conversion ratio (FCR): Feed intake/weight gain

Fish Survival (%)

Diet	IBW (g)	FBW (g)	Feed Intake (g)	SGR (%)	FCR	SURVIVAL %
M2- Control (algae free)	12,8	44,2	346,2	3,09	0,69	100
M3- <i>Nannochloropsis</i> , raw clean	13,3	46,5	346,5	3,13	0,75	85,4
M4- <i>Nannochloropsis</i> , raw pig	12,3	43,9	327,0	3,18	0,69	95,8
M5- <i>Nannochloropsis</i> , hydrol. clean	12,8	43,0	319,0	3,03	0,73	95,8
M6- <i>Nannochloropsis</i> hydrol. pig	13,4	48,2	354,7	3,20	0,65	95,8
M7- <i>Scenedesmus</i> , raw clean	12,5	40,8	320,1	2,96	0,71	97,9
M8- <i>Scenedesmus</i> , raw pig	12,7	40,5	319,8	2,90	0,72	100,0
M9- <i>Scenedesmus</i> , hydrol. clean	12,3	39,9	322,7	2,95	0,74	97,9
M10- <i>Scenedesmus</i> , hydrol. pig	12,6	40,2	329,5	2,90	0,75	97,9
M11-Arthrospira, clean	13	43.4	334.4	3	0,80	87.5
M12-Arthrospira, whey	12.7	42,1	324.1	3,1	0,76	97,9
M13-Scenedesmus/Chroococcus, pig	13.0	43,5	341,5	3,03	0,7	97,9

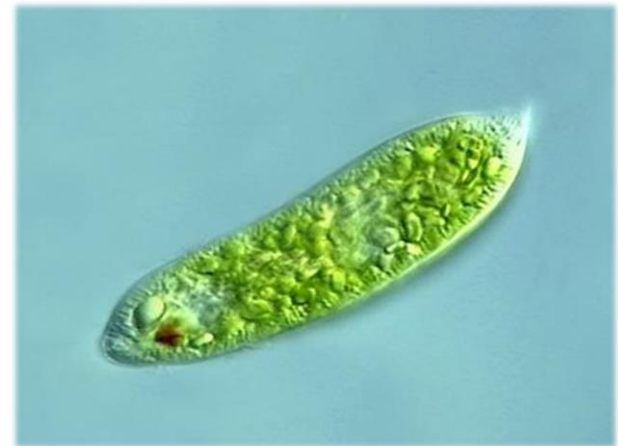
Euglena gracilis

Protista flagellato d'acqua dolce.

Proprietà: PUFA, proteine, β -glucani
(paramylon), betacarotene, vitamine C, E... →

Non ha parete cellulare, facilmente lisabile

APPLICAZIONI: cosmetica, nutraceutica,
mangimistica, bioplastiche

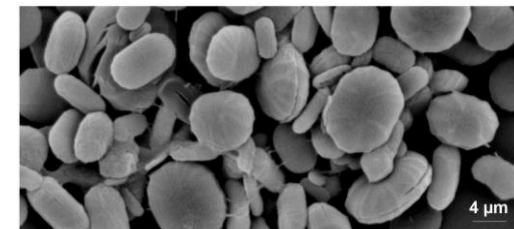


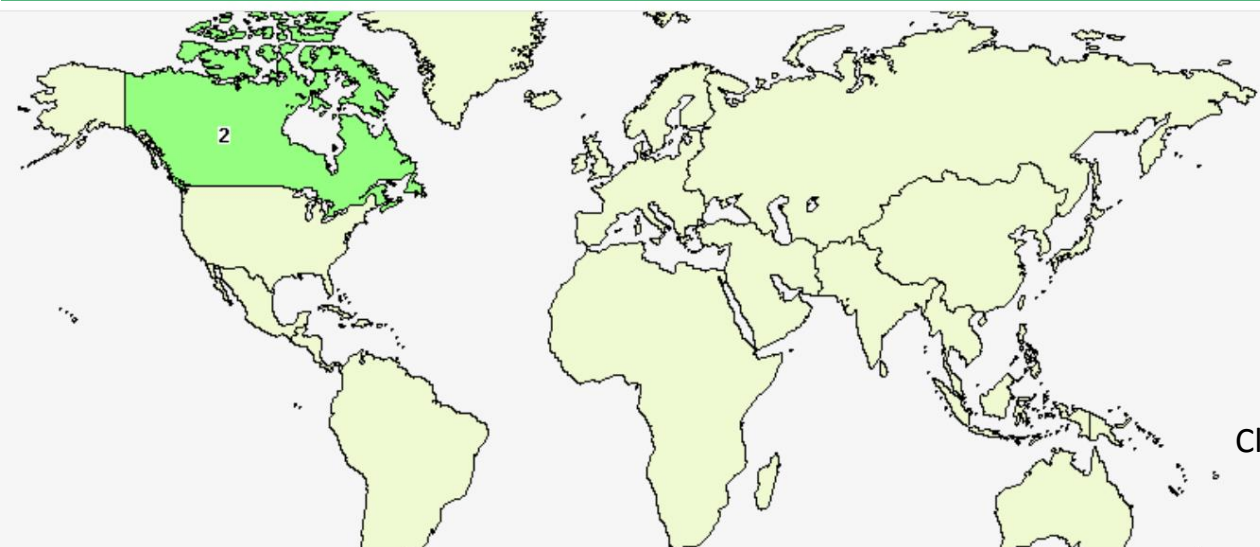
Euglena gracilis: proprietà

Paramylon (β -1-3 -glucano), rappresenta il 70-80% dei carboidrati. E' un granulo discoidale caratterizzato da elevata cristallinità (~ 90%)

In eterotrofia riesce ad accumulare fino al 50-70% di paramylon in peso secco dell'alga.

- **Antinfiammatorio e antiossidante** (farmaceutico) (Bersanti et al., 2011; Yasuda et al., 2018);
- Terapico contro dermatite atopica (Sugiyama et al., 2010)
- Migliora qualità spermatica (Ak Sonat et al., 2018)
- Protegge da danno epatico acuto indotto (Nakashima et al., 2018a)
- **Inibisce crescita di alcune cellule tumorali** (farmaceutico) (Watanabe et al., 2013)
- **Effetti immunostimolanti** (farmaceutico) (Russo et al., 2016)
- Effetti positivi su livelli di zucchero, insulina e colesterolo nel sangue (nutraceutico) (Shimada et al., 2016)
- Materia prima per la produzione di **bioplastiche** (Shibakami et al. 2013)
- Riduzione dei cambiamenti transitori nel punteggio della valutazione visiva dei sintomi dell'artrite reumatoide in un modello murino di artrite indotta [Suzuki et al., 2018]
- **Effetti sugli ormoni nelle piante legnose** (agricolo) (Scartazza et al., 2017)
- Immunostimolante anche in trota iridea, maiali, polli contro parassiti (mangimistica) (Jakob Sko et. Al, 2012; Levine et al., 2018; Yamamoto et al., 2018a,b).
- **Usato in cosmesi come filler naturale** (Tomita et al., 2016)





Euglena gracilis: Trial clinici

ClinicalTrials.gov (ultimo accesso 30/04/2021)
"euglena"

Row	Saved	Status	Study Title	Conditions	Interventions	Locations
1	☐	Completed	Ability of a Euglena Beta Glucan Supplementation to Augment Immune Function	- Symptoms Flu - Symptoms Cold	- Dietary Supplement: Whole Cell Euglena containing Beta Glucan - Dietary Supplement: Placebo	KGK Science Inc. London, Ontario, Canada
2	☐	Completed	Ability of Beta-glucan Supplementation to Augment Immune Function	- Cold - Cold Symptom - Flu (and 4 more...)	- Dietary Supplement: Beta-Glucan - Dietary Supplement: Placebo	KGK Science Inc. London, Ontario, Canada

E. gracilis: scala laboratorio

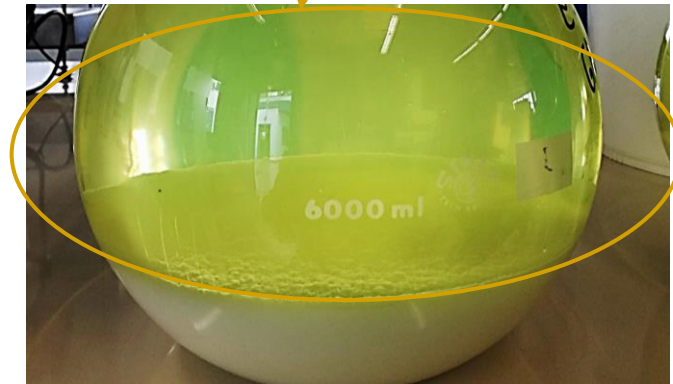
Recupero di scotta
direttamente dal
caseificio

Precipitazione
termocalcica

Recupero e diluizione
della **frazione
chiarificata** con acqua
(1:3)

Tre diverse tesi condotte:

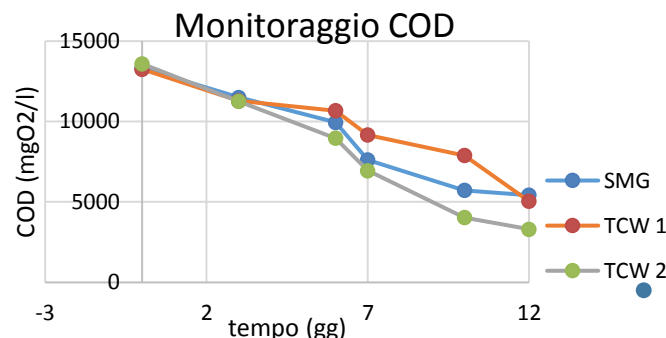
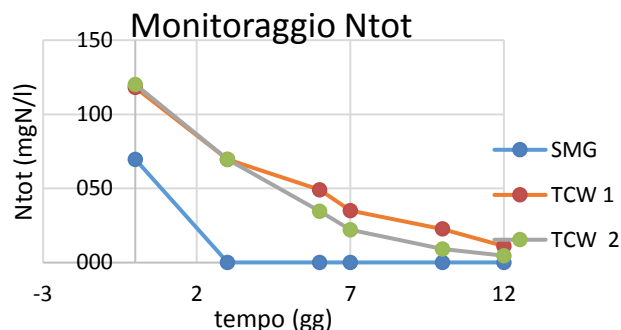
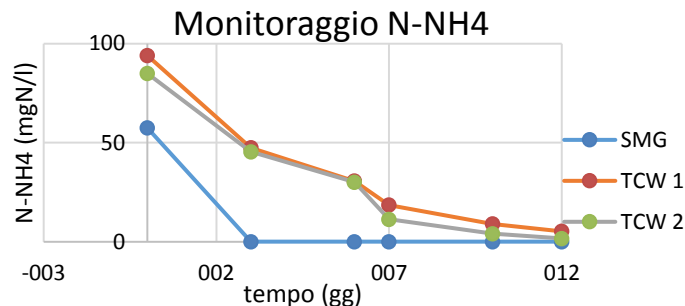
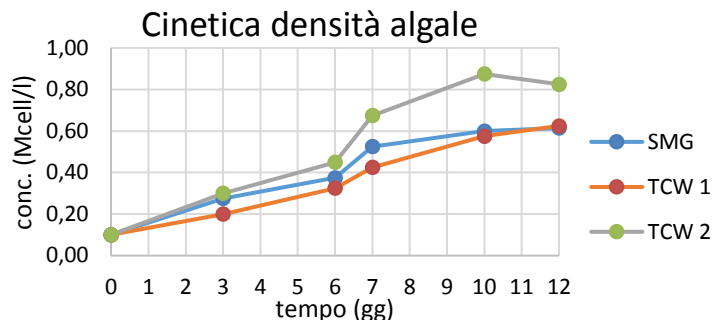
- TCW1: miscela con scotta termocalcificata e diluita (non prefiltrata)
- TCW2: miscela con scotta termocalcificata e diluita sottoposta a prefiltrazione (0,2 μm)
- SMG (controllo): crescita su medium standard con aggiunta di glucosio (COD analogo a quello presente in TCW1 e TCW2)



Euglena gracilis alla scala pilota

In collaborazione con caseificio Il Cigno, di Agnadello (CR)

Prova di coltivazione di *Euglena gracilis* su scotta salata: prova alla scala pilota (batch)



Test condotti in
duplicato e in
batch (PBR da 75
litri)

20-25° C

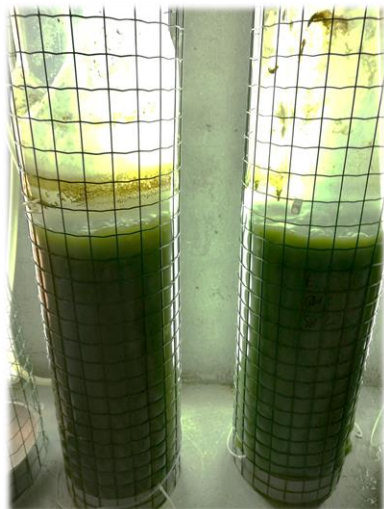
80 $\mu\text{molph m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Durata prova: 12
giorni

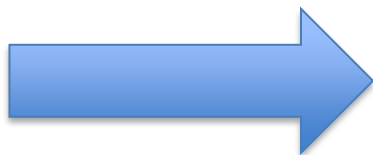
E. Gracilis su scotta alla scala pilota

Parametro	Caratteristiche Scotta diluita	Caratteristiche effluente	% rimozione
pH	5,5	6	
COD (g/L)	14	4	71
N-NO ₃ (mg/L)	<1	0	100%
N-NH ₄ (mg/L)	34	0	100%
N-tot (mg/L)	120	0	100%

E. gracilis: scala pilota



Raccolta



Liofilizzazione ed
essiccazione



Analisi della biomassa
e Valorizzazione

E. gracilis su scotta

Composizione biochimica



	lipidi		ceneri		proteine		paramylon		carbonio		umidità	
campione	media	sd	media	sd	media	sd	media	sd	media	sd	media	sd
MG1-01	25,15	0,36	3,18	0,06	15,23	0,22	55,84	1,03	47,60	0,59	8,87	0,15
MG1-02	28,39	0,58	2,32	0,08	16,30	0,35	56,46	0,83	50,56	1,09	7,92	0,26
TCW1-01	19,06	0,44	4,96	0,10	18,00	0,44	19,34	1,49	43,57	0,58	9,46	0,24
TCW1-02	21,04	0,14	9,46	0,13	22,63	0,00	20,98	0,97	43,81	0,04	10,41	0,30
TCW2-01	12,52	0,56	3,98	0,08	13,94	0,18	28,78	1,74	43,54	0,01	9,46	0,27
TCW2-02	14,24	0,30	3,91	0,09	15,38	0,27	29,73	1,06	43,30	0,04	9,39	0,11



E. gracilis su scotta

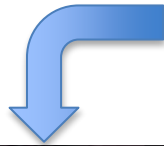
Analisi microbiologica



	CBT	Enterobatteri	coliformi	E.coli	Pseudomonas	Stafilococchi coagulasi positivi	Salmonella	lievitii	Muffe
campione	media	media	media	media	media	media			
MG1-01	2,2 x10 ⁷	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	assente	1,1 x 10 ⁷	<10 ²
MG1-02	1,2 x10 ⁸	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	assente	3,2 x 10 ⁷	<10 ²
TCW1-01	2,3 x10 ⁷	2,5 x10 ²	<10 ²	<10 ²	4,5 x 10 ³	<10 ²	assente	1,4 x 10 ⁷	<10 ²
TCW1-02	1,1 x10 ⁸	3,1 x10 ⁴	4,4 x10 ⁴	<10 ²	1,6 x 10 ³	<10 ²	assente	8 x 10 ⁶	6,5 x 10 ⁴
TCW2-01	6,7 x10 ⁶	4 x10 ⁴	6,1 x10 ⁴	<10 ²	1,5 x 10 ³	<10 ²	assente	2,2 x 10 ⁶	9 x 10 ⁴
TCW2-02	3,9 x10 ⁷	1,0 x10 ⁴	1,6 x10 ⁴	<10 ²	2,7 x 10 ³	<10 ²	assente	3,6 x 10 ⁶	6 x 10 ⁴

E. gracilis su scotta

Valorizzazione



Mangime



Estrazione paramylon

- **Immunostimolante** in trota iridea, maiali, polli (mangimistica) (Jakob Sko et. Al, 2012; Levine et al., 2018; Yamamoto et al., 2018a,b).

Bioplastiche
Biostimolanti
Cosmetico

E. gracilis: scala pilota

Conclusioni

- E' possibile coltivare *A. platensis* ed *E. gracilis* alla scala pilota su scotta
- Consorzio alghe-batteri si è dimostrato in grado di garantire efficiente rimozione dell'Ntot e del COD, dal 75% (per Euglena) al 99% (per Spirulina)
- Maggiore produzione di paramylon in condizioni di scarsità di azoto nel medium di coltivazione
- Contaminazioni microbiologiche della biomassa cresciuta su sottoprodotto caseario limitano le vie di valorizzazione alla mangimistica e all'estrazione e purificazione delle molecole bioattive destinate alla chimica verde.

Grazie per l'attenzione

UN RINGRAZIAMENTO
SPECIALE :

- Federico Castillo
Cascino
- Tiziana Bongiorno
- Lorenzo Proietti
- Luciano Foglio



katia.parati@istitutospallanzani.it