



da inviare via mail a [bandopondottorati@uniroma2.it](mailto:bandopondottorati@uniroma2.it) entro il  
**25/09/2021**

**Richiesta per borsa di studio da attivare ai sensi di quanto  
disposto dal D.M. n. 1061 del 10/08/2021**

Il sottoscritto, Morozzo della Rocca Blasco, qualifica ricercatore, afferente al Dipartimento di Biologia, tel Interno 0672594368 email [blasco.morozzo.della.rocca@uniroma2.it](mailto:blasco.morozzo.della.rocca@uniroma2.it)

CHIEDE

l'attivazione di una borsa di studio di dottorato ai sensi di quanto disposto dal D.M. n. 1061 del 10/08/2021. A tal fine comunica quanto segue:

La borsa sarà attivata sul seguente corso di dottorato accreditato per il XXXVII ciclo: Biologia Cellulare e Molecolare

Area per la quale si presenta la richiesta :

- Innovazione
- Green

Tipologia di cofinanziamento (pari ad euro 8000 una tantum):

Nome dell'Ente finanziatore pubblico o privato: Birrificio BirraDaAmare Srl, via Falzarego 8, 00054 Fiumicino, Roma

Persona di Riferimento: Andrea Frigerio, Tel. 0687648914 / 3497277786

Email [andrea.frigerio@molsoncoors.com](mailto:andrea.frigerio@molsoncoors.com)

Fondi di ricerca dipartimentali

Progetto di Ricerca

***Verso una fermentazione assistita dal suono: un nuovo processo industriale sostenibile e rispettoso dell'ambiente per migliorare la velocità di produzione***

**Scopo**

Costruire una nuova metodologia basata sulla fermentazione assistita da ultrasuoni per aumentare l'efficienza energetica del processo di produzione industriale.

**Stato dell'arte**

Il nostro pianeta soffre di un intenso tasso di estrazione e consumo delle sue risorse naturali a causa delle attività umane; c'è quindi la necessità di cercare alternative efficaci per fornire nutrienti, prodotti chimici ed energia da metodologie che hanno un impatto limitato sull'ambiente. In questa prospettiva il programma "Green Deal",



sviluppato dalla Commissione Europea, delinea la strada da percorrere nel trovare nuove strategie per sostenere la crescita economica, disaccoppiandola dal consumo di risorse. Attraverso l'introduzione di un nuovo quadro normativo su economia circolare, biodiversità e innovazione (The European Green Deal, 2019), si punta alla riduzione dell'impatto umano sulle risorse naturali, anche grazie al parametro dell'impronta ecologica che consente di standardizzare e valutare gli indicatori (Global Footprint Network). In questo scenario, i piani di produzione industriale spingono inevitabilmente verso processi più sostenibili dal punto di vista ambientale.

Tra i più diffusi nella produzione di alimenti e latticini, vi è il processo di fermentazione. La fermentazione è un processo anaerobico in cui avviene l'estrazione di energia da carboidrati mediante enzimi o microrganismi, generalmente associato alla produzione di anidride carbonica. Il processo, rimasto ancorato a metodi tradizionali, è carente di un controllo specifico sui tempi, i consumi energetici e i relativi impatti ambientali (Olajire A. A., 2020).

Le colture di lievito sono impiegate per diverse aree di produzione industriale, dall'alimentare alla farmaceutica. È un campo di ricerca e investimento in rapido sviluppo, nonostante alcuni problemi da superare che concernono ad esempio gli organismi geneticamente modificati, la gestione delle colture e la loro sostenibilità economica (Usher et al., 2014). In particolare miglioramenti sono necessari per rendere i sistemi di coltura più economici, strettamente monitorati e più produttivi (Xu et al., 2009).

Nuove soluzioni possono emergere esplorando campi del sapere più distanti: sono stati condotti studi incentrati sulla bioacustica, che hanno evidenziato interessanti correlazioni tra irraggiamento sonoro e attività enzimatiche (Mawson et al., 2010). Questi studi multidisciplinari considerano aspetti della fisica, dell'ingegneria e della biologia, studiando l'effetto delle onde sonore sulla vita e sulla biochimica degli organismi bersaglio.

È stato dimostrato che, in base alle caratteristiche dell'onda sonora e alle proprietà dell'organismo bersaglio, esiste un'ampia gamma di effetti esercitati dall'irradiazione sonora. La vibrazione sonora sembra trasformarsi da stimolo meccanico a segnale cellulare e metabolico, così da influenzare la vita a diversi livelli. Il meccanismo proposto di trasduzione del segnale prevede l'attivazione di meccano-recettori cellulari (French e Torkkeli, 2009), che causano la depolarizzazione della membrana, la generazione del potenziale d'azione e l'induzione del metabolismo secondario.

La maggior parte degli studi di bioacustica si concentrano sulle piante superiori, riportando la capacità del suono di indurre varie risposte fisiologiche come: variazione dei livelli di fitormoni, alterazione della capacità fotosintetica, induzione di stati di stress abiotici con conseguente innalzamento dei livelli di metaboliti secondari (Jung et al., 2018, Appel e Cocroft, 2014). Questi lavori indicano che specifiche onde sonore possono influenzare e persino aumentare il tasso di crescita e la bioproduzione di metaboliti attivi di interesse commerciale. Inoltre, la scoperta di cluster di geni sensibili al suono come il cluster ald (Jeong et al., 2007), apre la strada all'utilizzo di ingegneria genetica mirata per ottenere un miglioramento della resa totale, della crescita e di metaboliti commercialmente rilevanti.



Fino ad ora, pochi ma incoraggianti studi in letteratura, esplorano gli effetti sonori su lieviti e dimostrando una riduzione nel tempo di fermentazione (Choi et al., 2015); questo meccanismo è supportato dalla presenza di proteine mecano-sensibili nella membrana plasmatica del lievito che possono mediare una via di risposta sonora (Gosh et al., 2016, Aggio et al., 2011). Inoltre, un aspetto fondamentale da esplorare quando si somministra l'irradiazione è l'accoppiamento con il ciclo di vita del lievito, questo aspetto deve essere considerato, al fine di ottenere un effetto stimolante ed evitare un effetto inibitorio (Huezo et al., 2019).

### ***Descrizione del Progetto***

Ci proponiamo di realizzare un sonobioreattore innovativo basato su uno studio teorico di Chisti (2003), che sfrutti un generatore acustico e un sistema di trasduttori.

Questo apparato offrirà una piattaforma di ricerca affidabile per valutare diverse frequenze sonore su colture di lievito e per trovare con precisione la banda di onde sonore per l'ottimizzazione delle condizioni di fermentazione e tempi di irradiazione ottimali per il miglioramento della resa. Questi dati saranno validati e utilizzati per sviluppare un nuovo sistema di coltivazione del lievito che sia più sostenibile in termini economici e ambientali. La validazione di questa nuova metodologia, proposta e sviluppata dalla startup innovativa Yeastime, che supporterà trasversalmente il progetto, richiede il suo confronto con quelle attualmente impiegate per i processi fermentativi, per le quali un prezioso contributo verrà dal nostro Partner Industriale.

L'applicazione integrata di un sistema autenticato e di un protocollo su misura si tradurrà in: stimolazione del ciclo di vita del lievito, la diminuzione del tempo di fermentazione e l'aumento della resa dei metaboliti generatori di aromi (concentrandosi sulla via schichimica), mediante l'attivazione della beta-d-glicosidasi mediante ultrasuoni a bassa energia (Sun et al., 2019).

Questo trasferimento tecnologico si tradurrà in una maggiore capacità fermentativa e quindi nel miglioramento di un processo impiegato a livello mondiale, rendendolo energeticamente ed ecologicamente più sostenibile.

### ***Materiali e metodi***

- Le colture di lievito saranno monitorate con misure di densità ottica mediante spettrofotometria e misurazione del peso secco mediante filtrazione del campione.

- La caratterizzazione dei ceppi genetici sarà effettuata mediante estrazione del DNA con il kit di purificazione del DNA, quindi amplificando l'rRNA 18S. Il sequenziamento dei frammenti amplificati avverrà tramite un service di sequenziamento esterno, ricostruzione tramite BLAST e mediante allineamento tramite ClustalW.

- L'analisi biochimica del metabolismo cellulare sarà effettuata mediante gas cromatografia-spettrometria di massa (GC-MS).



- L'ingegneria genetica dei ceppi sarà ottenuta mediante trasfezione plasmidica e la presenza dell'inserzione genica sarà controllata mediante PCR.
- Per l'irradiazione ultrasonica, il bioreattore sarà dotato di un sistema generatore-trasduttore acustico. Il sistema verrà infine scalato su reattori industriali.

### **Attività previste e flusso di lavoro**

#### 1° anno

- Ingegnerizzazione del sonobioreattore
- Caratterizzazione genetica dei ceppi di lievito
- Studio degli effetti di diversi stimoli sonori sulle colture
- Parametrazione analitica della velocità di fermentazione

#### 2° anno

- Affinamento del miglioramento del processo
- Ingegneria genetica del lievito incentrata sul cluster *ald*
- Valutazione dei livelli di mRNA indotti dal suono
- Analisi del pathway shikimico
- Analisi dei livelli di fenoli/isoflavonoidi/terpeni

#### 3° anno

- Ottimizzazione dei processi energetici e metabolici e upscale su fermentatori industriali
- Studio del meccanismo di trasduzione del segnale cellulare indotto dal suono
- Studio del meccanismo evolutivo di risposta allo stimolo sonoro

### **Impatto previsto**

L'impatto atteso di questa attività di ricerca include la riduzione del costo energetico del processo di fermentazione, in termini di tempo e impatto ambientale, attraverso l'ottimizzazione del processo. Infatti, grazie all'introduzione del parametro acustico nel bioreattore, è possibile ottenere un miglioramento della velocità e della qualità del processo di fermentazione.

L'ingegnerizzazione di un sonobioreattore efficace darà vita a uno strumento innovativo per la coltura di cellule liquide. Questo apre potenzialmente a diversi processi di bioproduzione, dalle alghe a batteri o colture di cellule vegetali, e il suo



impatto su applicazioni su larga scala. Inoltre, per affrontare a pieno l'innovativo campo di studio della bioacustica, questo studio include l'esplorazione del meccanismo evolutivo del fattore "suono" per quanto riguarda la biologia del lievito. Inoltre questa ricerca mira a colmare il divario esistente tra le istituzioni che richiedono un'impronta ecologica inferiore e le industrie che richiedono un tasso di produzione più elevato offrendo una piattaforma ottimizzata che esplora nuovi meccanismi di stimolazione della produzione biologica.

### ***Obiettivi formativi***

Il progetto di ricerca consentirà al dottorando di acquisire conoscenze sul ciclo di vita del lievito, sul suo coinvolgimento nel processo di fermentazione e sulla biologia degli effetti sonori sia a livello metabolico che genetico. Inoltre, un approccio multidisciplinare consentirà anche di acquisire e produrre conoscenze sul processo di fabbricazione e sull'influenza di vari parametri sulla resa del prodotto.

### ***Attinenza del progetto all'area indicata (green)***

Come scritto sopra il progetto è pienamente allineato con diversi obiettivi dell'azione "verde" (Azione IV.5) in particolare per quanto riguarda processi produttivi più sostenibili, risparmio energetico, trasferimento tecnologico di conoscenze sulle piccole imprese che beneficeranno dei risultati del progetto.

**Azienda privata** coinvolta nazionale o straniera in cui si prevede di far svolgere il periodo obbligatorio da 6 a 12 mesi previsto dal Decreto Ministeriale: Birificio Birradamare s.r.l. via Falzarego, 8 - 00045, Fiumicino, Roma, Italia

### ***Bibliografia***

Aggio, R. B. M., et al. *Metabolomics* 2011; 8(4):670-678

Appel, H. M. and Cocroft, R. B. *Oecologia* 2014; 175(4):1257-66

Chisti, Y., *Trends Biotechnol.* 2003; 21(2):89-93

Choi et al., *J. Inst. Brew.* 2015; 121(4): 510-517

French, A.S. and Torkkeli, P.H., *Encyclopedia of Neuroscience*, 2009

Gosh, R., et al. *Scientific Rep.* 2016; 6, 33370

Huezo et al., *Fermentation* 2019; 5(1):1-16

Jeong, M., et al. *Mol. Breeding*; 2007; 21(2):217-226

Jung, J., et al. (2018). *Front Plant Sci* 30(9):25

Mawson, R., et al., *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing* 2010; 369-404



**TOR VERGATA**  
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA

**Direzione II - Ricerca, Terza Missione,  
Procedure Elettorali**

Divisione I - Ricerca Nazionale

Ripartizione III - Scuola di Dottorato

Olajire A. A., Journal of Cleaner Production. 2020; 256, 102817

Sun et al., Food Sci Nutr. 2019; 7(6):2043-2049

The European Green Deal. 2019

Usher, P. K., et al. Biofuels 2014; 5(3), 331-349

Xu, W., et al., Eng. Life Sci. 2009; 9(3), 178-189

**Firma**

Paolo Morozzi d'Accia