

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI

CAMPUS DI CESENA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN

SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

TITOLO DELLA TESI

**“Recupero e valorizzazione di scarti e sottoprodotti agro-alimentari
utilizzando il lievito non convenzionale *Yarrowia lipolytica*”**

Tesi in

29588 Microbiologia avanzata e predittiva (c.i.) – 29594 Microbiologia delle fermentazioni

Relatore: Chiar.ma Prof.ssa Rosalba Lanciotti

Candidata: Cristina d’Alessandro

Correlatori: Dott.Lorenzo Siroli

Matricola N° 948646

Dott. Davide Gottardi

Anno accademico/ 2021-2022

Sessione unica

INDICE	pag.
1. INTRODUZIONE	1
2. FISIOLOGIA, ESIGENZE NUTRIZIONALI E MECCANISMI ENZIMATICI	2
3. POSSIBILI APPLICAZIONI INDUSTRIALI DI <i>YARROWIA LIPOLYTICA</i>	3
3.1. Metaboliti e prodotti di interesse alimentare	3
3.1.1. Proteine da singola cellula, (<i>Single cell proteins</i> ,SCP)	4
3.1.2. Oli da singola cellula, (<i>Single cell oil</i> ,SCO)	5
3.1.3. Acidi organici	6
3.1.4. Lattoni	7
3.1.5. Polioli	8
3.1.6. Enzimi	9
3.1.7. Nanoparticelle	10
3.2. Riduzione di inquinanti	10
4. APPLICAZIONE DI CEPPI SELVATICI DI <i>YARROWIA LIPOLYTICA</i> NEGLI SCARTI E SOTTOPRODOTTI DELL'INDUSTRIA AGRO-ALIMENTARE	11
4.1. Industria dell'olio vegetale	12
4.2. Industria lattiero-casearia	16
4.3. Lavorazione frutta e verdura	19
4.4. Prodotti e grassi animali	21
4.5. Pesce e frutti di mare	22
4.6. Glicerolo	24
5. CEPPI INGEGNERIZZATI DI <i>YARROWIA LIPOLYTICA</i>	28
5.1. Per l'utilizzo di substrati alternativi	
5.1.1. Utilizzo di melasso	29
5.1.2. Utilizzo di polissaccaridi complessi	29
5.2. Per la produzione di nuove molecole	31
5.2.1. Produzione di terpeni	31
5.2.2. Produzione di polichetidi	33
5.3. Svantaggi e vantaggi dell'ingegneria genetica	34
6. CONCLUSIONI	34
7. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	36

“Stay hungry, stay foolish”

1. INTRODUZIONE

I sottoprodotti generati dall'industria alimentare rappresentano un crescente problema in tutto il mondo, non solo per quanto riguarda la loro gestione, ma anche nel contesto della sostenibilità ambientale. La scarsa disponibilità di risorse e l'elevata produzione di rifiuti ha portato ricercatori e industrie ad interrogarsi su come valorizzare i sottoprodotti agricoli e agroindustriali, all'interno di un contesto di economia circolare. Un terzo del cibo prodotto per il consumo umano viene perso o sprecato a livello globale. Si tratta di circa 1,3 miliardi di tonnellate di prodotti alimentari persi o sprecati lungo tutta la catena di approvvigionamento, dalla produzione fino al consumo (FAO 2019).

Negli Stati Uniti, circa il 40% di tutto il cibo prodotto non viene consumato, e circa il 95% del cibo scartato come rifiuto finisce nelle discariche. Nel 2014 sono stati generati oltre 38 milioni di tonnellate di rifiuti alimentari, e solo il 5% ha seguito la via del compostaggio invece che finire in discariche e inceneritori (Food Waste | The Nutrition Source | Harvard T.H. Chan School of Public Health n.d.). Inoltre, la decomposizione dei rifiuti alimentari produce metano, un forte gas serra che contribuisce al riscaldamento globale.

Pertanto, un uso efficiente dei rifiuti e dei sottoprodotti potrebbe influenzare positivamente sia l'economia che l'ambiente. Ad esempio, i rifiuti alimentari potrebbero essere potenzialmente trasformati e valorizzati mediante processi biotecnologici in nuovi prodotti o ingredienti ad alto valore aggiunto. Con l'espressione "valorizzazione dei sottoprodotti" si intende la ricerca, per questi residui di lavorazione, di nuovi impieghi in ambiti diversi. Ad esempio possono essere applicati come substrati per la crescita microbica. La selezione dei microrganismi più appropriati per questi processi è fondamentale. Tra i microrganismi che possono contribuire al recupero di scarti e sottoprodotti alimentari c'è il lievito *Yarrowia lipolytica*. Infatti, negli ultimi 10 anni c'è stato un incremento esponenziale della ricerca riguardante le applicazioni di questo lievito nel recupero di rifiuti e sottoprodotti. Sebbene gli isolati di *Y. lipolytica* possano adattarsi bene in ambienti avversi, diversi autori hanno anche proposto di creare ceppi ingegnerizzati per aumentarne l'efficienza o le potenzialità biotecnologiche.

Questa tesi si pone come obiettivo quello di descrivere le principali potenzialità industriali di *Y. lipolytica* e le sue possibili applicazioni nella filiera agro-alimentare per valorizzare scarti e sottoprodotti generati.

2. FISIOLOGIA, ESIGENZE NUTRIZIONALI E MECCANISMI ENZIMATICI

Yarrowia lipolytica è una specie di lievito ascomiceto dimorfico, non patogeno. Presenta specifiche caratteristiche fisiologiche, metaboliche e genetiche, che lo differenziano dal lievito modello *Saccharomyces cerevisiae* (Nicaud 2012). Esso è ritenuto generalmente sicuro (GRAS) per le produzioni industriali dall'American Food and Drug Administration (FDA), in quanto non patogeno e non pericoloso per la salute del consumatore. Inoltre, l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare ha conferito alle biomasse inattivate di *Y. lipolytica* lo status di "novel food" e quindi possono essere consumate per l'alimentazione umana e animale come fonte proteica (EFSA NDA et al. 2019).

Y. lipolytica può essere isolata da matrici alimentari, quali yogurt, kefir, salsa di soia, margarina rancida, insalata di carne e gamberi, ma anche da ambienti diversi quali suolo, suolo inquinato da petrolio, fiumi, laghi e acqua di mare. Per crescere in questi diversi ecosistemi, il lievito ha sviluppato la capacità di consumare diversi tipi di substrato (sia idrofili che idrofobici), e di crescere in condizioni chimico-fisiche molto varie (es. pH da 2,5 a 8,0 e temperature da 2 a 37 °C).

Y. lipolytica può crescere su una vasta gamma di fonti di carbonio. Tra gli zuccheri può consumare esosi, come glucosio, fruttosio, mannosio e galattosio. In particolare, il glucosio rappresenta il substrato preferito per tutti gli isolati testati fino ad oggi. Il saccarosio e il lattosio, invece, non possono essere utilizzati dai ceppi selvatici, ad eccezione di un ceppo isolato dal suolo (*Y. lipolytica* B9) che è risultato essere lattosio-positivo. Questo non è sorprendente, data l'elevata variabilità fenotipica dei ceppi. Anche il galattosio può essere consumato da *Y. lipolytica* W29 ma solo in presenza di glucosio a concentrazioni superiori allo 0,4%.

Un altro substrato utilizzato da *Y. lipolytica* è il glicerolo. Quando invece glicerolo e glucosio non sono presenti, il lievito può utilizzare etanolo, oltre che

acido acetico, propionico, butirrico, malico, succinico, citrico e lattico. Come già accennato in precedenza, oltre al consumo di carboidrati, la caratteristica principale di *Y. lipolytica* è quella di utilizzare alcani, acidi grassi e triacilgliceroli come unica fonte energetica. Pertanto, oli vegetali, esteri grassi, acidi grassi liberi puri, grassi animali, e oli di pesce possono essere utilizzati come substrati.

Fondamentali sono anche le fonti di azoto. La loro presenza e disponibilità nel mezzo influenzano i processi metabolici e quindi anche i metaboliti prodotti (Mansour et al. 2008). Ad esempio, condizioni limitate di azoto sono considerati ottimali per la produzione di acido citrico o l'accumulo di lipidi quando nel mezzo sono presenti glucosio o glicerolo. Tuttavia, alcuni ceppi producono lipidi anche quando l'azoto è ancora presente (o poco dopo la sua privazione), mentre consumano i lipidi immagazzinati quando raggiungono condizioni di azoto limitato (Filippousi et al. 2019).

Infine, un'altra caratteristica che contraddistingue *Y. lipolytica* è la capacità di produrre e rilasciare enzimi attraverso un pathway secretorio molto attivo. Tra gli enzimi industrialmente di interesse si ricordano le lipasi e proteasi extracellulari che permettono al lievito di crescere su diversi substrati. Tuttavia, il lievito possiede anche altri enzimi minori, alcuni dei quali non ancora completamente sfruttati, come chitinasi, fosfatasi e inulinasi. Dato il suo potenziale secretorio, *Y. lipolytica* è stata sfruttata ed ingegnerizzata per studiare e produrre proteine ed enzimi eterologhi. (Park et al. 2014, Patrignani et al. 2020, Zinjarde et al. 2014).

3. POSSIBILI APPLICAZIONI INDUSTRIALI DI *YARROWIA LIPOLYTICA*

3.1. Produzione di metaboliti e prodotti di interesse alimentare

L'importanza di *Yarrowia lipolytica* in campo industriale è nota fin dal secolo scorso (Groenewald et al. 2014). Tra gli anni '50 e '70 la British Petroleum Company (BP, Londra) ha utilizzato *Y. lipolytica* per produrre proteine da singola cellula (SCP) facendo crescere il lievito su substrati di petrolio greggio. Negli anni '70, invece, Pfizer Inc. (New York City, NY, USA) ha sfruttato *Y. lipolytica* per la produzione industriale di acido citrico. Questa tecnologia è stata riacquistata negli anni '90 da Archer Daniels Midland Company (ADM,

Chicago, IL, USA) che ancora, per quanto ne sappiamo, produce acido citrico da *Y. lipolytica* utilizzando principalmente olio di mais o di colza come substrato (Groenewald et al. 2014, Bankar et al. 2009, Sibirny et al. 2014). Altre applicazioni dei ceppi di *Y. lipolytica* a livello industriale tuttora in atto comprendono: produzione di eritritolo (Baoling bao Biology Co., Yucheng, Shandong, Cina); ottenimento di oli da singola cellula (SCO) per produrre panna vegetale (Cultivated Bioscience, Wädenswil, Svizzera); produzione di biomassa da usare come mangime prebiotico per animali da fattoria e da compagnia (Skotan SA, Chorzów, Polonia) (Mamaev & Zvyagilskaya 2021).

Altre potenziali applicazioni dei ceppi di *Y. lipolytica* di tipo selvatico includono il loro uso come agenti di biocontrollo e biofertilizzanti ecologici in agricoltura, o per l'immunostimolazione in acqua coltura di gamberi e pesci (Mamaev & Zvyagilskaya 2021). Di seguito verranno descritti brevemente i principali metaboliti e prodotti di interesse industriale che si possono ottenere durante la crescita di *Y. lipolytica*.

3.1.1. Proteine da singola cellula (SCP) e biomassa

Tradizionalmente, l'applicazione biotecnologica più diffusa di *Y. lipolytica* si è concentrata sulla produzione di proteine da singola cellula, dall'inglese *single cell proteins* (SCP) (Papanikolaou & Aggelis 2010). Uno dei fattori più importanti che influenzano il valore nutritivo del lievito è il suo contenuto proteico. Infatti, la biomassa sgrassata di *Y. lipolytica* può contenere circa il 30-40% (p/p) di proteine, con tutti gli amminoacidi essenziali presenti in quantità significative. In particolare, è stato stimato che la concentrazione di lisina è la stessa di quella trovata nelle uova. Per questo motivo le SCP estratte da biomasse ottenute come processo autonomo o come sottoprodotti di altre produzioni biotecnologiche (lipidi microbici, acido citrico, etc.) sono state proposte come fonte proteica ecologica per l'alimentazione animale (Patsios et al. 2020).

Inoltre, nel 2019, l'EFSA ha dichiarato l'intera biomassa di *Y. lipolytica* un "Novel Food" per l'uso umano ai sensi del Regolamento (UE) 2015/2283 sugli integratori alimentari (EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA) et al. 2019). Infine, le biomasse vive di *Y. lipolytica* sono state proposte anche come co-starter alternativi per la produzione di salami e formaggi (Rosalba Lanciotti et al. 2005, Gottardi et al. 2021, Patrignani et al. 2007).

3.1.2. Oli da singola cellula (SCO)

Gli oli microbici o da singola cellula, dall'inglese *Single cell oil* (SCO), sono particolari oli prodotti da microrganismi definiti "oleaginosi". Tali microrganismi, infatti, hanno la capacità di convertire ed accumulare lipidi, fino al 70-80 % del loro peso secco, partendo da composti di origine naturale (Ratledge & Wynn 2002, Papanikolaou & Aggelis 2010). *Yarrowia lipolytica*, essendo un lievito oleaginoso, è capace di produrre ed accumulare lipidi. Tuttavia, tra le specie appartenenti a questo gruppo, essa non è la più efficiente. In effetti, ceppi selvatici riescono a produrre un massimo di 20 % di SCO rispetto al peso secco cellulare se coltivato su zuccheri, o percentuali più elevate (43 %) se coltivati su substrati idrofobici. La produzione dei lipidi avviene attraverso due vie: *de novo* ed *ex novo*. Nella via *de novo* la produzione di lipidi si verifica quando *Y. lipolytica* viene coltivata su zuccheri o composti simili (es. glicerolo). In questo caso, i lipidi sono sintetizzati durante il metabolismo secondario, eseguito di solito quando il mezzo ha un elevato rapporto carbonio/azoto (C/N) o se sono presenti concentrazioni di azoto limitate (Lopes et al. 2018, Papanikolaou & Aggelis 2010). La fonte azotata sbilanciata innesca una cascata di eventi biochimici con il conseguente accumulo e rilascio di citrato dai mitocondri nel citosol. Qui viene scisso dall'ATP-citrato liasi in acetil-CoA che verrà poi utilizzato per la sintesi degli acidi grassi (Papanikolaou & Aggelis 2010). Bellou, Triantaphyllidou, Mizerakis, and Aggelis (2016) hanno riportato che una limitazione di fonti di azoto e di magnesio favorisce un livello di accumulo lipidico più elevato rispetto alla presenza di una sola delle due componenti (dal 13,6 % al 38,5 %) (Bellou et al. 2016). Tuttavia, la limitazione dell'azoto in presenza di alti valori di C/N sembra non essere sufficiente a garantire un'elevata produzione di lipidi. Infatti, in alcuni studi, i lipidi sono stati prodotti già durante la prima fase di crescita, nonostante la presenza di azoto e glicerolo grezzo come unica fonte di carbonio. Questo ha suggerito che altri fattori, come il controllo del pH del mezzo, possano condizionare l'accumulo di lipidi. Quando i materiali idrofobici (grassi, oli) sono la principale fonte di carbonio ed energia, i lipidi sono prodotti *ex novo*. In questo caso, la loro produzione rappresenta il principale processo anabolico della cellula. Di solito, *Y. lipolytica* incorpora rapidamente acidi grassi insaturi (es. acido oleico) per

esigenze di crescita e produzione di acido organico, mentre gli acidi grassi saturi (come l'acido stearico) vengono incorporati e utilizzati lentamente sia per esigenze di crescita che per la produzione di SCO (Papanikolaou & Aggelis 2010).

Gli SCO accumulati in *Y. lipolytica* sono composti principalmente da trigliceridi (TAG) e in minor misura da acidi grassi liberi, lipidi neutri, steroli e frazioni polari. Gli acidi grassi accumulati più rappresentativi sono generalmente l'acido oleico, palmitico e linoleico. Tuttavia, si possono ottenere SCO su misura modulando parametri di crescita o substrati. Ad esempio, le cellule che crescono su oli o residui dell'industria petrolifera generano SCO ricchi in acido oleico, mentre quelli prodotti su stearina sono ricchi in acidi grassi saturi. Infine, i lipidi con una composizione simile al burro di cacao sono stati ottenuti utilizzando una miscela di olio di colza idrolizzato e stearina (50:50) come substrato (Papanikolaou & Aggelis 2011).

3.1.3 Acidi organici

Gli acidi organici sono molecole molto interessanti per diversi settori industriali come quello agroalimentare, chimico e farmaceutico. A tale proposito, *Y. lipolytica* è un lievito capace di secernere grandi quantità di acidi organici in condizioni di crescita limitanti o in condizioni sbilanciate di substrati carboniosi. I principali acidi organici prodotti da *Y. lipolytica* sono: acido citrico, acido isocitrico, acido succinico, e acido itaconico (Gottardi et al., 2021).

L'acido citrico (CA) è un acido organico debole presente negli agrumi. È anche un intermedio del ciclo di Krebs ed è presente nei microrganismi aerobi. CA è uno dei metaboliti più interessanti per via delle sue applicazioni come aromatizzante, acidificante, antiossidante e conservante (Fickers et al. 2020). La sua produzione mondiale nel 2020 è stata stimata a due milioni di tonnellate, con la Cina come principale produttore. Circa il 70% di questo acido viene usato nell'industria alimentare, il 20 % nella produzione di detersivi in polvere, e il restante 10 % viene utilizzato nelle industrie farmaceutiche e chimiche (Carsanba et al. 2019). Storicamente, *Aspergillus niger* è stato utilizzato per la produzione industriale dell'acido citrico. Anche *Y. lipolytica* è un buon produttore di CA. Il processo produttivo viene influenzato dalla fonte di carbonio, dal contenuto di azoto, dal rapporto carbonio/azoto (C/N) presente nel

mezzo di crescita e da altre condizioni quali pH e temperatura. Un basso contenuto di azoto (0,1- 0,4 g/L) (Gonçalves et al. 2014) è stato considerato fondamentale per la produzione di CA, mentre altri autori hanno evidenziato l'importanza di un rapporto C/N elevato. Poiché questi parametri sono simili a quelli richiesti per la produzione di SCO, alcuni ceppi possono produrre entrambi i composti contemporaneamente (Dobrowolski et al. 2016). Oltre alla disponibilità di substrati, la sintesi di CA è influenzata dal pH esterno. Valori superiori a 4,5 tendono a favorirne la produzione (Papanikolaou et al. 2017). Lo svantaggio principale nell'utilizzare *Y. lipolytica* per la produzione di CA è la sua propensione a produrre contemporaneamente elevate quantità di acido isocitrico (iCA). In particolare, si è visto che quando le cellule vengono coltivate su carboidrati o glicerolo, l'iCA può arrivare fino al 16% del CA prodotto, mentre questa proporzione potrebbe rappresentare quasi il 50% su substrati gluconeogenici (Fickers et al. 2020).

Altri acidi organici di interesse alimentare, farmaceutico e mangimistico prodotti seppur in modo minore da *Y. lipolytica* sono l'acido α -chetoglutarico (KGA) e l'acido piruvico (PA) (Li et al. 2001, Otto et al. 2011). Carenza di tiamina, pH basso e mezzi esausti contribuiscono alla contemporanea secrezione di KGA e PA a seguito di un'alterazione del ciclo di Krebs. Al contrario, i substrati che seguono la β -ossidazione (es. olio di colza) non consentono l'accumulo di PA (Rywińska et al. 2020). La possibilità di ottenere solo KGA è stata studiata anche cercando di migliorare il processo di separazione dei due acidi (Lei et al. 2019), o evitando la produzione di PA variando le condizioni di crescita (Krzysztof et al. 2018, Morgunov et al. 2013).

3.1.4. Lattoni

Tra i metaboliti prodotti da *Y. lipolytica* di maggiore interesse nel campo alimentare ci sono i lattoni. Essi sono costituenti naturali degli oli essenziali e dei composti organici volatili dei vegetali capaci di impattare il profilo aromatico dell'alimento conferendo un aroma "fruttato". Tra i lattoni prodotti da *Y. lipolytica* il più interessante è il γ -decalattone, prodotto dall'acido ricinoleico, che ha un caratteristico aroma di pesca. Questo è stato approvato dalla FDA come additivo alimentare. La β -ossidazione perossisomiale è la via responsabile per la bioconversione del lattone in *Y. lipolytica*.

3.1.5. Polioli

I polioli sono glucidi con molecola simile ai monosaccaridi, ma con una funzione ossidrilica al posto di quella aldeidica o chetonica. I polioli sono presenti in natura o sintetizzati chimicamente e hanno diverse proprietà, tra cui quella di avere un basso apporto calorico ed un buono potere dolcificante. Vengono prodotti da piante, funghi, lieviti e batteri per contrastare condizioni di stress, come la presenza di stress osmotico.

Y. lipolytica produce principalmente mannitolo ed eritritolo, quest'ultimo in risposta allo stress osmotico. L'eritritolo e il mannitolo sono due importanti polioli utilizzati come additivi alimentari per le loro proprietà, come esaltatori di sapidità, dolcificanti e umettanti (Grembecka 2015). Le condizioni di crescita che favoriscono la produzione di polioli da *Y. lipolytica* sono l'alto rapporto C/N, gli elevati livelli di zuccheri (elevata osmolarità), il pH basso (3–3,5) e la basso ossigeno (Papanikolaou et al. 2017). La risposta dei lieviti è specifica per ogni ceppo. Infatti, Egermeier e colleghi (2017) hanno mostrato come dopo 48 h di crescita in glicerolo a pH 3,5, 15 ceppi su 20 testati producevano principalmente mannitolo (max 30 g/L), eritritolo e arabitolo (Egermeier et al. 2017). Gli altri cinque ceppi, oltre ai polioli, producevano quantità elevate di CA (28,9 g/L). Aumentando il pH a 5,5 per 72h veniva favorita la produzione di CA, che per alcuni ceppi raggiungeva valori di 40 g/L. Tuttavia, gli stessi 15 ceppi sopra menzionati, a parte una quantità leggermente superiore di CA, continuavano a produrre polioli. Questi 15 ceppi erano tutti isolati da prodotti lattiero-caseari mentre tra i restanti c'erano ceppi di laboratorio come W29, NRRLYB-423 e H222, isolati rispettivamente da liquami, impianti di lavorazione del mais e suolo. Pertanto, le condizioni di coltura influenzano la produzione di metaboliti ma molto dipende anche dal ceppo utilizzato. Per quanto riguarda la proporzione di polioli, l'eritritolo è solitamente il più abbondante (Tomaszewska et al. 2012) mentre, a seconda del ceppo, il mannitolo potrebbe essere dominante (circa 80–88%) (André et al. 2009). Utilizzando il mutante MK1, Mirończuk e colleghi (2015) hanno riportato una produzione di eritritolo fino a 225 g/L utilizzando come substrato il glicerolo (Mirończuk et al. 2015). Rispetto ai mutanti, i ceppi selvatici producono meno polioli (Liu et al. 2020, Mirończuk et al. 2015, Rymowicz et al. 2009). Ad esempio, partendo dal

glicerolo grezzo, il mutante *Y. lipolytica* Wratistavia K1 produce più eritritolo rispetto al ceppo selvatico A-15 (80 e 65 g/L, rispettivamente) (Tomaszewska et al. 2012). Tuttavia, l'isolato di tipo selvatico produce simultaneamente concentrazioni più elevate di mannitolo rispetto al ceppo ricombinante (rispettivamente 14 vs 4 g/L) quando la concentrazione di NaCl del mezzo di crescita viene variata. Ciò mostra la specificità e la maggiore efficienza dei ceppi ingegnerizzati ma una minore flessibilità per adattarsi ai cambiamenti ambientali. Come discusso per la produzione di CA, anche le condizioni di crescita e il processo produttivo influiscono sulla resa finale di polioli (Mirończuk et al. 2014, Papanikolaou et al. 2017, Rakicka et al. 2017). Infatti, è stato riportato che i polioli possono essere completamente riconsumati dal microrganismo dopo l'esaurimento del glicerolo esclusivamente per il fabbisogno energetico di mantenimento (André et al. 2009). Questo è un aspetto importante da considerare per definire i migliori parametri di lavoro.

3.1.6. Enzimi

Y. lipolytica ha una via secretoria molto efficiente che permette di rilasciare proteine ed enzimi fuori dalla cellula. Le lipasi e le proteasi, rilasciate per recuperare i nutrienti necessari a sostenerne la crescita, sono le più studiate per le loro applicazioni industriali. La recente indagine sul genoma ha rivelato 25 presunte lipasi. Quelle isolate e caratterizzate sono enzimi ad azione extracellulare (Lip2), intracellulare (Lip1, Lip3 e Lip6) o di membrana (Lip7, Lip8) (Brígida et al. 2014, Kumari & Gupta 2012). Una delle caratteristiche di questi enzimi è la loro specificità. È stato riportato che Lip2 agisce su trigliceridi costituiti da C8:0 (tricaprilina) e trigliceridi contenenti acidi grassi monoinsaturi (C18:1) come trioleina, ma anche su esteri metilici di C12, C14 e C16. Invece, Lip7 e Lip8 preferiscono rispettivamente gli esteri del C8 e C12 e quelli del C8 e C10 (Fickers et al. 2011). Un'altra caratteristica importante di queste lipasi è la capacità di lavorare in uno spettro ampio di temperature, da 4 a 55 °C (Brígida et al. 2014, Fickers et al. 2011, Parfene et al. 2011). Se da un lato substrati ricchi in lipidi favoriscono la produzione di lipasi, quelli ricchi in proteine possono favorire il rilascio di proteasi (Vong et al. 2016, Yalcin et al. 2009). Le due principali proteasi di *Y. lipolytica* sono la proteasi extracellulare acida (AXP) e la proteasi extracellulare alcalina (AEP) (Lopes et al. 2016). Anche in questo

caso è stato riportato che gli enzimi sono attivi in un ampio intervallo di temperature, anche a quelle più basse (6 °C) (Gottardi 2013). Tra le proteine prodotte, l'1–2% appartiene all'AEP; quindi, oltre 1 g/L di AEP potrebbe essere prodotto a densità cellulari elevate (Matoba et al. 1988). La produzione di questi enzimi a partire da substrati di basso valore e a basso costo rappresenta un vantaggio dal punto di vista economico e sostenibile. Se per le lipasi questi studi sono ancora in corso, per le proteasi l'argomento non è ben approfondito.

3.1.7 Nanoparticelle

Tra le ricerche più all'avanguardia che sfruttano le potenzialità di *Yarrowia lipolytica* ci sono quelle volte a produrre nanoparticelle metalliche (Reed & Alper 2018). Comuemente queste nanoparticelle vengono sintetizzate attraverso trattamenti chimici (Schmidt 2001) o biologici (Hernandez-Adame et al. 2019, Das et al. 2017) di soluzioni contenenti metalli. Infatti, l'incubazione delle cellule di *Y. lipolytica* con L-DOPA determina la formazione di un pigmento marrone scuro con una propensione a ridurre il nitrato d'argento e l'acido cloroaurico in nanostrutture di 7 nm d'argento e d'oro, rispettivamente. In particolare, le particelle d'argento ottenute attraverso questo processo hanno mostrato attività antimicotica contro le spore di *Aspergillus*. (Apte, Girme, Bankar, et al. 2013, Apte, Girme, Nair, et al. 2013). Le nanoparticelle prodotte con *Y. lipolytica* hanno trovato ulteriore utilità anche nell'acquacoltura. La biomassa del lievito arricchita con nanoparticelle di selenio, formatosi a seguito di incubazione con selenite di sodio, ha migliorato i tassi di sopravvivenza e la salute generale delle larve del crostaceo *Artemia salina* quando utilizzato come mangime (Hamza et al. 2017).

3.2 Riduzione di agenti inquinanti e biorisanamento

Dalla trasformazione degli alimenti, dai processi agricoli e dalle industrie chimiche vengono prodotti grandi volumi di rifiuti contenenti composti inquinanti. Questi rifiuti, essendo di natura organica, possono essere consumati e rimossi dai microrganismi con la produzione, in alcuni casi di nuove molecole a più elevato valore. L'adozione di questa strategia presenta un duplice vantaggio, ossia: i rifiuti vengono smaltiti efficacemente e, allo stesso tempo, si ottiene un prodotto ad alto valore aggiunto. A tal riguardo, diversi ceppi di *Y.*

lipolytica sono stati utilizzati per il trattamento delle acque reflue ottenuti da vari processi industriali. Comunemente la domanda chimica di ossigeno (COD) e la domanda biochimica di ossigeno (BOD) sono utilizzate per quantificare la quantità di inquinanti ossidabili presenti nelle acque reflue. Solitamente, per essere smaltiti negli impianti fognari questi scarti dovrebbero avere valori di COD e BOD rispettivamente inferiori a 125 e 25 mg/L, secondo l'impianto europeo delle acque reflue Standard per gli effluenti (UE 91/271/CEE). *Y. lipolytica* ATCC 20255 è stato applicato per il trattamento delle acque reflue di frantoio (De Felice et al. 1997, Scioli & Felice 1993). Questo ceppo ha permesso una riduzione dell'80% del COD entro 24 h. Anche Lanciotti et al. (2005) hanno valutato la capacità di diversi ceppi di *Y. lipolytica* di crescere in acque reflue del frantoio e di ridurre successivamente i livelli di COD (R. Lanciotti et al. 2005). In particolare il ceppo PO1 riduceva i livelli di COD del 41,22%. In un'altra indagine, il ceppo selvatico W29 è stato efficace nel trattare acque reflue di frantoio riducendo i livelli di COD dell'80% e il contenuto di fenoli totali del 70% (Lopes et al. 2009). Anche gli effluenti della produzione di olio di palma sono stati trattati con successo con *Y. lipolytica*. In questo caso il ceppo NCIM 3589 ha determinato una diminuzione del 95% dei valori di COD entro 48h. (Oswal et al. 2002). Infine, *Y. lipolytica* è stata impiegata per il trattamento e la modifica anche di alcuni rifiuti solidi. Ad esempio, *Yarrowia lipolytica* TISTR 5151 è risultata essere promettente come lievito per la biovalorizzazione dei rifiuti industriali e la produzione di lipidi e lipasi (Louhasakul et al. 2020). Sempre in ambito di biorisanamento, *Y. lipolytica* può produrre biotensioattivi come *yansan*, *rufisan* e BS-I. Si tratta di composti organici anfifili che agiscono come detersivi, agenti bagnanti, emulsionanti, agenti schiumogeni e disperdenti, capaci di accelerare la biodisponibilità e la rimozione di sostanze chimiche contaminate dal petrolio (Zinjarde et al. 2014).

4. APPLICAZIONE DI CEPPI SELVATICI DI *Y. LIPOLYTICA* NEGLI SCARTI E SOTTOPRODOTTI DELL'INDUSTRIA AGRO-ALIMENTARE

L'interesse per lo sfruttamento di scarti e sottoprodotti agroindustriali a basso costo come substrati di crescita per *Y. lipolytica* è aumentata negli ultimi anni. Gli studi si sono concentrati principalmente sullo sfruttamento di scarti di natura

idrofobica (oli vegetali e grassi animali) o prevalentemente idrofilica (frutta, verdura, latticini e altro). Di seguito verranno descritti i principali sottoprodotti e scarti dell'industria agro-alimentare, il loro possibile recupero e la loro valorizzazione attraverso l'impiego di ceppi selvatici di *Y. lipolytica*.

4.1 Industria dell'olio vegetale

Secondo l'ultimo rapporto dell'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OCSE) e l'Organizzazione per l'Alimentazione e l'Agricoltura (FAO) delle Nazioni Unite, la produzione globale di olio vegetale dovrebbe espandersi dai 189,9 milioni di tonnellate del 2017 a 219,8 milioni di tonnellate nel 2026 (Darvishi et al. 2019). Di questi, il 37,6% deriva dalla lavorazione dell'olio di palma e palmisti, il 30% dalla lavorazione di semi di soia e il restante 32,5% da quelle di colza, girasole, arachidi e oli d'oliva (*USDA Foreign Agricultural Service* n.d.). L'olio di palma è un olio vegetale commestibile ottenuto dal mesocarpo del frutto delle palme da olio (Colombo et al. 2017). L'effluente della lavorazione dell'olio di palma (*Palm Oil Mill Effluent*, POME) rappresenta una possibile fonte di inquinamento delle acque. Attualmente, dalla lavorazione di ogni tonnellata di olio di palma vengono generate 0,65 tonnellate di POME (Louhasakul et al. 2016). POME contiene principalmente rifiuti lignocellulosici oltre a carboidrati e olio. I valori COD e BOD variano molto in base al periodo di produzione, ma possono essere compresi tra 70-87 e 32-85 g/L, rispettivamente (Poh et al. 2020). A tal riguardo, il ceppo di *Y. lipolytica* NCIM 3589, isolato da fondali marini, è stato applicato su POME senza aggiunta di ulteriori nutrienti (Oswal et al. 2002). Dopo 48 h, il ceppo riduceva COD e BOD rispettivamente di circa il 95 e 77%. Louhasakul et al. (2016) hanno testato quattro diversi ceppi di *Y. lipolytica* (Tabella 1) su POME centrifugato, autoclavato e integrato con solfato di ammonio (Louhasakul et al. 2016). In questo caso, dopo 72 ore di incubazione, il COD era stato ridotto fino al 72,9 %, con il ceppo TISTR 5151 che produceva contemporaneamente lipidi (28,8 %) e lipasi (3353 U/L). Dato che lavorare con sottoprodotti poco processati favorisce la sostenibilità e riduce i costi, gli stessi autori (Louhasakul et al. 2020) hanno poi valutato la capacità di *Y. lipolytica* di superare i contaminanti microbici e persistere in POME non sterile. In questo caso, il ceppo TISTR 5151 ,riduceva i valori di COD dell'80 %, e produceva 60 % di

SCO. Per garantire tali rese, le acque reflue erano state diluite e addizionate con fonti azotate. Gli SCO prodotti erano ricchi di acidi grassi insaturi (C18:2, 36,42%; C18:1, 16,49%; C16:1, 10,53%).

Un altro scarto, molto importante per l'area mediterranea, proviene dai frantoi. Da essi, ogni anno, vengono prodotti 30 milioni di m³ di acque reflue (D'Annibale et al. 2006). La composizione delle acque reflue del frantoio (*oil mill wastewater*, OMW) dipende dal tipo di olive, dal sistema di coltivazione e dal processo di produzione (Lopes et al. 2009). Di solito contiene "acque di vegetazione" delle olive, acque di lavorazione, polpa di oliva e olio, oltre a componenti aggiuntivi come zuccheri, polifenoli, polialcoli, fosfati, pectine e metalli. Gli OMW hanno valori BOD e COD elevati, compresi rispettivamente tra 12-63 e 80-200 g/L (Al-Malah et al. 2000). Scioli e De Felice (1993) sono stati i primi a riportare la capacità di *Y. lipolytica* di ridurre il valore COD di OMW (146 g/L) dell'80 % entro 24 h (Scioli & Felice 1993). Tuttavia, in questo studio, OMW era stato integrato con vitamine ed estratto di lievito. Invece, (R. Lanciotti et al. 2005), hanno utilizzato OMW non trattato e non diluito con 62 isolati di *Y. lipolytica*. In questo caso, la riduzione massima del COD raggiungeva solo il 43% con il ceppo PO1, associato però ad una riduzione dei polifenoli (18%) e alla produzione di CA e lipasi (4,2 g/L e 925 U, rispettivamente). La minore efficienza osservata rispetto ad altri studi evidenzia che l'utilizzo di effluenti di olio tal quale può talvolta essere un fattore limitante. Questo spiega perché, nella maggior parte dei lavori, ai sottoprodotti si sono aggiunti altri substrati di crescita come glucosio (Papanikolaou et al. 2008) o il solfato di ammonio, da soli o con Tween 80 (Lopes et al. 2009).

Un altro tipo di scarto, che in Europa viene prodotto nell'ordine di 1 milione di tonnellate annue, è dato dagli oli da cucina esausti dopo il loro uso in case, hotel, ristoranti e catering (*waste cooking oils*, WCO). Utilizzando *Y. lipolytica* W29 su questo substrato, Lopes et al. (2019) hanno prodotto lipasi (12000 U/L) e lipidi, principalmente contenenti acido linoleico (71%) e oleico (21%) (Lopes et al. 2019). I principali lavori che riguardano la valorizzazione degli scarti e sottoprodotti dell'industria olearia mediante l'impiego di ceppi selvatici di *Y. lipolytica*, sono riportati in tabella 1.

Tabella 1. Rassegna dei principali scarti e sottoprodotti delle industrie di oli vegetali valorizzati con *Y. lipolytica*, i ceppi wild type utilizzati, i principali

risultati ottenuti e la referenza da cui sono stati presi. Abbreviazioni: OMW, acque reflue del frantoio; POME, acque reflue di frantoio di palma; WCO, olio da cucina di scarto; CA, acido citrico; KGA, acido α -chetoglutarico; PA, acido piruvico; SCO, olio unicellulare (% p/p, biomassa in peso secco), COD, domanda chimica di ossigeno; BOD, domanda biochimica di ossigeno.

Scarti e Sottoprodotti	Ceppi	Risultati Finali Ottenuti	Articolo relativo
OMW	ATCC 20255	Riduzione di COD (80%)	De Felice et al (1997)
OMW	W29 e IMUFRJ 50682	Produzione di lipasi (70U/L) – riduzione di COD (80%) e fenoli (70%)	Lopes et al (2009)
OMW	62 ceppi wild type (con le migliori prestazioni: PO1, Y17, B16, C11 e Y9)	Riduzione di COD (1,47–43%), polifenoli (fino al 22%) - Produzione di CA (fino a 5,2 g/L) e lipasi (35–2315 U)	Lanciotti, Vannini, et al. (2005)
OMW	CBS 2073, W29 e IMUFRJ 50682	Riduzione del COD (29–52%) e produzione di lipasi (320–1041 U/L)	Gonçalves, et al. 2009
OMW	W29 (ATCC 20460), ACA-YC 5028, ACA-YC 5033	Produzione di CA (0,9–18,9 g/L), lipidi (3–51%)	Sarris, Galiotou-Panayotou, Koutinas, Komatis, and Papanikolaou(2011)
OMW	ACA-YC 5033	Produzione di CA (0,4–51,9 g/L), SCO (5–45%) - riduzione	Sarris et al. (2017)

		di fenoli (~51%) e colori (~58%)	
OMW	ACA-DC 50109	Produzione di CA (28,9 g/L) e riduzione di composti fenolici (15%) e colore	Papanikolaou, Fakas, et al. (2008)
POME	TISTR 5054, TISTR 5212, TISTR 5621, TISTR 5151	Riduzione del COD (45,8–93,4%) - produzione di lipasi (61–4081 U/L), biomassa (2,9–7,2 g/L) e SCO (20,2–28,8%), a seconda del ceppo e del pH	Louhasakul et al. (2016)
POME	TISTR 5151	Riduzione del COD (53,7–63,5%) - produzione di biomassa (6,9 g/L) e lipidi (53,0%)	Louhasakul et al. (2019)
POME	NCIM 3589	Riduzione di COD (95%) e BOD (77%)	Oswal et al. (2002)
Prodotti per la macinazione a umido del mais	W29	Produzione di CA (35 g/L)	Cavallo et al. (2020)
Prodotti per la lavorazione dell'olio di colza	20 isolati, tra cui A10	Produzione di KGA (72 g/L), PA (48,1 g/L), biomassa (35,7 g/L) e SCO (13,2%)	Cybulski et al. (2018)
Olio di colza	VKM Y-2373* e mutante	Produzione di CA (~80 g/L), ICA (~70	Kamzolova, Lunina, and Morgunov (2011)

		g/L), lipasi (~17 U/mg)	
Insalata di olio e grasso dalle acque reflue alimentari	W29	Riduzione di olio e COD (oltre l'80%)	Wu et al. (2009)
Acque reflue della raffineria di olio vegetale	CBS6303	Riduzione del COD (80%) - produzione di SCO (60,1%) e biomassa (18,3 g/L)	Darvishi et al. (2019)
WCO	W29	Produzione di lipasi (12000 U/L), biomassa (6,2 g/L) e SCO (48,3%)	Lopes et al. (2019)
WCO	NCIM 3229, NCIM 3450, NCIM 3472, NCIM 3589, NCIM 3590	Produzione di biomassa (5,0–7,9 g/L) e SCO (22–45%)	Katre et al. (2012)
WCO	CECT 1240 (ATCC 18942)	Riduzione del COD (~90%)	Domínguez et al. (2010)
Residuo di raffineria di olio di semi di soia	UCP 0988	Produzione di biotensioattivi	Rufino et al. (2011)

4.2 Industria lattiero-casearia

Si stima che la produzione mondiale di siero di latte sia di circa 190 milioni di tonnellate/anno (Ryan & Walsh 2016) e solo il 50% di questa quantità viene riutilizzata. Il resto viene considerato come acque reflue. Tuttavia, a causa degli elevati valori di BOD e COD, rispettivamente 27–60 g/l e 50–102 g/l, lo smaltimento del siero rappresenta un serio problema sia dal punto di vista

economico che ambientale (Yadav et al. 2015). Allo stesso tempo, la necessità di pretrattamenti per stabilizzare e immagazzinare tale sottoprodotto prima della lavorazione rende difficile e costosa la sua valorizzazione su scala industriale. Al giorno d'oggi, il siero di latte in eccesso viene talvolta rilasciato nei campi, con i conseguenti effetti negativi dovuti all'alto contenuto di NaCl, o utilizzato nella mangimistica animale. Pertanto, il recupero delle componenti del siero di latte e il loro riutilizzo può essere vantaggioso non solo per l'ambiente ma anche nel contesto di un'economia sostenibile. Il siero di latte contiene più della metà dei solidi presenti nel latte intero originario, costituiti principalmente da lattosio, proteine, lipidi e sali minerali, più altri composti poco rappresentati (acido lattico, citrico e urico, urea e vitamine del gruppo B) (Ryan & Walsh 2016). Per questo motivo, il siero di latte rappresenta una materia prima economica e nutrizionalmente ricca da cui è possibile recuperare composti preziosi e da cui è possibile generare nuovi prodotti e ridurre gli inquinanti. Gli studi che riguardano l'applicazione di *Y. lipolytica* nei sottoprodotti lattiero-caseari non sono molti (Tabella 2). Questo dipende dal fatto che il siero è un sottoprodotto complesso e variabile a causa del processo di lavorazione utilizzato per ottenere il formaggio e il tipo di latte di partenza. Alcuni ceppi di *Y. lipolytica* sono stati testati per la produzione di biomassa utilizzando siero di ricotta. Sebbene *Yarrowia lipolytica* non fosse la specie più efficiente, i ceppi testati permettevano comunque di ottenere 1,1–1,6 g/L di biomassa e 25–33% di lipidi entro 72 ore (Carota et al. 2017). In un altro lavoro, Yalcin et al. (2009) hanno utilizzato siero di latte pastorizzato, integrato con glucosio o fruttosio, per produrre CA (Yalcin et al. 2009). L'integrazione di fruttosio ha contrastato la bassa specificità di *Y. lipolytica* per il lattosio e gli alti livelli di proteine, favorendo a sua volta l'aumento del rapporto C/N. In questo modo si sono ottenuti 49,2 g/L di CA. Nell'ambito del progetto europeo INGREEN si stanno producendo biomasse di ceppi selezionati di *Y. lipolytica* per applicazioni nel settore alimentare, sfruttando come substrato il siero di Caciotta, Squacquerone e Ricotta (Bains 2020). Per la produzione di lipidi, Taskin et al. (2015) hanno utilizzato siero di latte deproteinizzato come substrato per il ceppo selvatico B9, che è capace di consumare lattosio (Taskin et al. 2015). Nelle migliori condizioni di coltura (pH 5,5, 120 h, 15 °C), i ricercatori hanno ottenuto 57,9% di SCO, composto principalmente da acido oleico (18:1), acido cis-10-eptadecenoico

(C17:1), acido palmitoleico (16:1) e acido palmitico (16:0). Lo stesso ceppo ha prodotto anche 33,3 g/L di CA in un siero di latte non sterilizzato e parzialmente deproteinizzato addizionato con lattosio (20 g/L) e alginato di sodio (2%) a 20 °C, pH 5,5 per 120 h (Arslan et al. 2016). Un'ultima applicazione in questo settore riguarda l'utilizzo di enzimi di *Y. lipolytica* ATCC 9773 per ridurre i contaminanti grassi (Tarón Dunoyer et al. 2020). I principali lavori che riguardano la valorizzazione di scarti e sottoprodotti dell'industria lattiero-casearia mediante l'uso di ceppi selvatici di *Y. lipolytica*, sono riportati in tabella 2.

Tabella 2. Rassegna dei più recenti sottoprodotti delle industrie casearie valorizzati con *Y. lipolytica*, i ceppi wild type utilizzati, i principali risultati ottenuti e la referenza da cui sono stati presi. abbreviazioni: CA, acido citrico; COD, domanda chimica di ossigeno; BOD, domanda biochimica di ossigeno; SCO, olio unicellulare (% p/p, biomassa in peso secco).

Scarti E Sottoprodotti	Ceppi	Risultati Finali Ottenuti	
Siero di latte deproteinizzato	B9	Produzione di biomassa (7,4 g/L) e SCO (57,9%)	Taskin et al. (2015)
Siero di latte con fruttosio	59	Produzione di CA (49,2 g/L)	Yalcin et al. (2009)
Rifiuti lattiero-caseari	ATCC 9773	Riduzione di grasso (82,9%), COD (44,3%) e BOD (43,3%)	Taron Dunoyer et al. (2020)
Siero di latte parzialmente deproteinizzato	B9	Produzione di CA (33,3 g/L)	Arslan et al. (2016)
Siero di ricotta	NRRL YB-423, NRRL Y-1095,	Produzione di biomassa (1,1–1,6 g/L) e SCO (25–33%)	Carota et al. (2017)

	NRRL Y-7208		
Siero di latte acque reflue	MFW5	Produzione di biotensioattivi	Yilmaz et al. (2009)

4.3 Lavorazione frutta e verdura

La raccolta, la lavorazione, l'imballaggio, la distribuzione e il consumo di frutta e verdura causano una perdita di prodotto del 30-40%. Questo raggiunge il 50% nei Paesi con accesso limitato a tecnologie industriali avanzate. India, Filippine, Cina e Stati Uniti d'America generano un totale di circa 55 milioni di tonnellate di scarti (Wadhwa & Bakshi 2013), mentre in Europa si stima che essi si aggiri intorno a 88 milioni di tonnellate (Stenmarck et al. 2016). Gran parte di questi rifiuti viene scaricata nelle discariche o nei fiumi, causando rischi per l'ambiente. Alternative a tali metodi di smaltimento riguardano il loro riutilizzo come mangimi o la loro trasformazione per produrre ed estrarre molecole o composti ad elevato valore aggiunto (Wadhwa & Bakshi 2013). La buccia d'arancia e banana, e la polpa d'arancia sono stati applicati come unica fonte di carbonio per produrre SCO utilizzando cinque ceppi di *Y. lipolytica* (Katre et al. 2012). Tuttavia, anche se si sono raggiunti buone quantità di biomassa, le rese di lipidi sono state relativamente basse (2–9%). Pereira et al. (2019), hanno studiato la produzione di lipasi da *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 utilizzando scarti di mango come substrato (da S. Pereira et al. 2019). Il tegumento di mango (1 g/L) è stato integrato con estratto di lievito (2 g/L) consentendo la produzione di circa 2500 U/L di lipasi dopo 17 ore in un reattore in scala 4-L. Anche l'aggiunta di estratto di lievito (0,34%) è risultata fondamentale per la produzione di CA da rifiuti di ananas. In condizioni ottimali *Y. lipolytica* NCIM 3589 ha prodotto 202,3 g di CA per ogni kg di scarto di ananas essiccato, utilizzando la fermentazione allo stato solido (Imandi et al. 2008). La produzione di CA è stata studiata anche nel mosto d'uva, un substrato che, data la sua componente zuccherina, non ha richiesto l'aggiunta di ulteriori ingredienti. In questo caso, il ceppo selvatico *Y. lipolytica* 59 è stato in grado di produrre quantità non trascurabili di CA (32,1 g/L) (Yalcin et al. 2009). Lo sfruttamento di *Y. lipolytica* è andato anche oltre la produzione di singoli composti a valore aggiunto. Ad esempio, Vong et al. (2016) hanno applicato *Y. lipolytica* NCYC 2904 per una fermentazione allo

stato solido di okara, un sottoprodotto insolubile ottenuto durante la produzione di latte di soia e tofu (Vong et al. 2016). Il lievito è cresciuto bene in tale matrice durante un'incubazione a 30 °C per 5 giorni. Questo ha favorito il rilascio significativo di amminoacidi liberi (soprattutto glutammato) e di metilchetoni a catena corta, responsabili del gusto umami e del sapore simile al formaggio. Inoltre, hanno osservato una maggiore attività antiossidante. In questo modo l'applicazione di *Y. lipolytica* ha valorizzato un sottoprodotto trasformandolo in un alimento nutriente e più appetibile. I lavori più recenti che hanno riguardato la valorizzazione di scarti e sottoprodotti ortofrutticoli mediante l'ausilio di ceppi selvaggi di *Y. lipolytica* sono riassunti in tabella 3.

Tabella 3. . Rassegna dei principali scarti e sottoprodotti ortofrutticoli valorizzati con *Y. lipolytica*, i ceppi wild type utilizzati, i principali risultati ottenuti e la referenza da cui sono stati presi. . Abbreviazioni: CA, acido citrico; SCO, olio unicellulare (% p/p, biomassa in peso secco).

Scarti E Sottoprodotti	Ceppi	Risultati Ottenuti	Finali
Okara (sottoprodotto della soia)	NCYC 2904	Produzione di succinato (33,7 g/kg), glutammato (3,3 g/kg), metilchetoni a catena corta e composti antiossidanti	Vong et al. (2016)
Mosto d'uva Tegumento di mango con estratto di lievito	59 e NBRC 1658 IMUFRJ 50682	Produzione di CA (32,1 g/L) Produzione di lipasi (3500 U/L)	Yalcin et al. (2009) Pereira, Fontes-Sant'Ana, & Amaral (2019)
Scorza di arancia e banana, polpa d'arancia e baccello	NCIM 3229, NCIM 3450, NCIM 3472, NCIM 3589 e NCIM 3590	Produzione di SCO (2–9%)	Katre et al. (2012)

Rifiuti di ananas	NCIM 3589	Produzione di CA (202,35 g/kg)	Imandi et al. (2008)
Crusca d'orzo, noce triturrata	CECT 1240	Produzione di lipasi (21–23000 U/L)	Dominguez, Costas, Longo, and Sanromàn (2003)

4.4 Prodotti e grassi animali

Con un valore di mercato relativamente basso, la valorizzazione degli scarti e sottoprodotti dell'industria della carne può avere un notevole potenziale economico. Una delle principali applicazioni di *Y. lipolytica* in questi tipi di prodotti è quella di modificare la composizione dei grassi in oli pregiati, compreso l'equivalente del burro di cacao e acidi grassi polinsaturi. È possibile ottenere una produzione lipidica su misura modificando substrati o condizioni di coltura (Papanikolaou & Aggelis 2010). Ad esempio, l'uso del grasso di montone come substrato ha permesso di produrre SCO ricchi in acido oleico (Xiong et al. 2015). L'aggiunta di stearato di metile come co-substrato ha favorito la produzione di un equivalente del burro di cacao. Lopes et al. (2018) hanno anche testato l'effetto delle condizioni di coltura sulla produzione di lipidi, lipasi e CA nel lardo di maiale (Lopes et al. 2018). Variando quattro parametri (pH, concentrazione di substrato, concentrazione di gomma arabica e velocità di trasferimento di ossigeno) hanno ottenuto tre diversi profili di SCO: 1) quelli con rapporti simili di acidi grassi saturi e insaturi, principalmente acido palmitico e oleico (48 e 42%, rispettivamente); 2) quelli con più acidi grassi insaturi, principalmente acido oleico e linoleico (rispettivamente 50 e 22%); 3) quelli con più acidi grassi saturi, principalmente acido palmitico e stearico (rispettivamente 35 e 21%). Oltre alle variazioni dei parametri di crescita e dei substrati, i ceppi di *Y. lipolytica* possiedono un'elevata variabilità interindividuale per quanto riguarda l'efficienza metabolica e le molecole rilasciate. Patrignani, Vannini, Gardini, Guerzoni e Lanciotti (2011a) hanno riportato che 35 ceppi diversi producevano profili ceppo specifici in termini di acidi grassi rilasciati, quando coltivati su grasso di maiale (Patrignani et al. 2011). All'interno di ogni ceppo, le condizioni fisico-chimiche (cioè temperatura, attività dell'acqua e livello di

inoculo) sono state fondamentali per modulare il rilascio di acidi grassi liberi e la loro ulteriore trasformazione in composti aromatici (Patrignani et al. 2011) . Invece, l'uso del sego di pollo come unica fonte di carbonio è stato applicato per la sintesi di tensioattivi microbici. I lavori scientifici più recenti riguardanti scarti e sottoprodotti di carne valorizzati con *Y. lipolytica*, i ceppi selvatici applicati e i prodotti ottenuti sono riassunti in tabella 4.

4.5 Pesce e frutti di mare

A livello globale, ogni anno vengono scartate 20 milioni di tonnellate di rifiuti, pari al 25% della produzione totale di pescato marittimo (Caruso 2015). In Giappone, dove i frutti di mare sono consumati a un livello pro capite elevato, la quantità di rifiuti ittici è stimata annualmente in circa 2 milioni di tonnellate, mentre in Europa è di 5,2 milioni di tonnellate all'anno (Caruso 2015, Fickers et al. 2011). I rifiuti industriali ittici sono costituiti principalmente da visceri, teste, lisce e pesci troppo piccoli per essere lavorati. Il loro impiego nella preparazione di farine di pesce è limitato dall'alto contenuto lipidico e dal basso contenuto proteico. Alcuni ricercatori hanno cercato di aumentare il valore di questo sottoprodotto utilizzando *Y. lipolytica* per la riduzione di lipidi (Tabella 4) (Yano et al. 2008). Tra i ceppi testati, *Y. lipolytica* NBRC-10073 ha mostrato la massima efficienza nel ridurre i lipidi rispettivamente del 29 e del 46% in uno stato solido o in un processo di miscelazione intermittente. Durante la fermentazione, 41,5 g di lipidi grezzi in 1 kg di carne macinata sono stati ridotti a 22,4 g e l'ossidazione dei lipidi è stata relativamente soppressa. Katre et al. (2012) hanno testato cinque ceppi di *Y. lipolytica* per produrre SCO utilizzando rifiuti di pesce o gusci di gamberi come unica fonte di carbonio ed energia (Katre et al. 2012). A causa della composizione dei substrati, è stato prodotto un massimo del 4% di SCO sul guscio dei gamberi, mentre il 14% di SCO è stato raggiunto sugli scarti di pesce. I principali scarti e sottoprodotti ittici/frutti di mare valorizzati con *Y. lipolytica*, i ceppi selvaggi applicati e metaboliti ottenuti sono riportati in tabella 4.

Tabella 4. Rassegna dei principali scarti e sottoprodotti ittici/frutti di mare e carne valorizzati con *Y. lipolytica*, i ceppi wild type utilizzati, i principali risultati ottenuti e la referenza da cui sono stati presi. Aabbreviazioni: SCO, single cell oil (% w/w, dry weight biomass); CA, citric acid.

Scarti E Sottoprodotti	Ceppi	Risultati Ottenuti	Finali
Olio esausto di pesce	KKP 379	Produzione di SCO (22,7%)	Fabiszewska et al. (2021)
Rifiuti di pesce	NBRC-10073	Riduzione dei lipidi (46%)	Yano et al. (2008)
Gusci di gamberi e scarti di pesce	NCIM 3229, NCIM 3450, NCIM 3472, NCIM 3589 e NCIM 3590	Produzione di SCO (2–14%)	Katre et al. (2012)
Grasso di montone	CICC1778	Produzione di biomassa (14,1 g/L), lipidi (32,6%)	Xiong et al. (2015)
Lardo di maiale	W29	produzione di SCO (57,9%), lipasi (560 U/L) e CA (9,2 g/L)	Lopes et al. (2012)
Rifiuti di pollo	NCIM 3229, NCIM 3450, NCIM 3472, NCIM 3589 e NCIM 3590	Produzione di SCO (3–6%)	Katre et al. (2012)
Grasso di maiale	35 diversi isolati	Produzione di lipidi	Patrignani et al (2011a)
Grasso di maiale	Y16A	Acidi grassi liberi e composti volatili	Patrignani et al. (2011b)
Sego di pollo	MTCC 9520	Produzione di biotensioattivo	Radha et al. (2020)

Derivato del sego	ACA-DC 50109 (LGAM S(7)1)	Produzione di biomassa (~16,0 g/L), SCO (52%) e lipasi (2,5 IU/mL) in pallone – produzione di biomassa (30,5 g/L), SCO (7–16%) e lipasi (0,9 UI/mL) nel reattore	Papanikolaou et al. (2007)
-------------------	---------------------------	--	----------------------------

4.6 Glicerolo

Il glicerolo grezzo è sicuramente uno sottoprodotto più abbondanti ottenuti della lavorazione di oli vegetali per la produzione di biodiesel (Rywińska et al. 2013). Tuttavia, elevate quantità di acqua contenente glicerolo possono essere generate anche da unità di produzione di bioetanolo e/o bevande alcoliche (Sarris & Papanikolaou 2015). Insieme al glucosio, il glicerolo è stato studiato come uno dei principali substrati utilizzati da *Y. lipolytica* per produrre CA, polioli e SCO (Tabella 5). Questo aspetto è stato ampiamente descritto da (Rywińska et al. 2013). La maggior parte delle recenti pubblicazioni si è concentrata sull'ottimizzazione e il potenziamento dei processi. Magdouli, Guedri, Rouissi, Brar e Blais (2020) hanno aggiunto biotina, leucina e acido citrico su glicerolo grezzo per ottenere circa il 63% di lipidi su biomassa (Magdouli et al. 2020). Altri studi recenti sull'uso del glicerolo grezzo si sono concentrati sulla combinazione di questo sottoprodotto con altri scarti e sottoprodotti dell'industria alimentare (Sarris et al. 2019). Ad esempio, i rifiuti di crostacei sono stati utilizzati come fonte di azoto con glicerolo grezzo per aumentare la produzione di lipasi da 25 a 38 U/L (Magdouli et al. 2017). Miscele di glicerolo grezzo e acque reflue petrolifere sono state anche testate per la produzione di CA (37,4 g/L), mannitolo (13,1 g/L), arabitolo (3,1 g/L) e lipidi (16% su DCW) (Sarris et al. 2019). Lo scopo principale della produzione di miscele è quello di diluire i potenziali composti inibitori presenti nel glicerolo grezzo. Negli ultimi anni, infatti, diversi ricercatori hanno studiato l'effetto di queste impurità sull'efficienza di crescita (Kumar et al. 2020), e quindi anche sulla produzione

di biomassa e lipidi (Kumar et al. 2020). Ad esempio, una maggiore produttività della biomassa (0,21 g/L/h e 0,54 g/L/h, rispettivamente) e resa lipidica (0,21 e 0,124 g/g glicerolo, rispettivamente) sono state ottenute nel glicerolo grezzo purificato rispetto all'uso del prodotto non purificato. Si tratta di importanti risultati che possono poi essere sfruttati in ambito mangimistico e alimentare, cosa ancora oggi molto limitata per la presenza di composti pericolosi. I lavori più recenti riguardanti il glicerolo valorizzato con *Y. lipolytica*, e i metaboliti e composti ottenuti sono riportati in tabella 5.

Tabella 5. Rassegna dei più recenti lavori di riaggraffatura del glicerolo grezzo o grezzo valorizzato con *Y. lipolytica*, i ceppi wild type utilizzati, i principali risultati ottenuti e la referenza da cui sono stati presi Abbreviazioni: VFA, acidi grassi volatili; CA, acido citrico; SCO, olio unicellulare (% p/p, peso secco biomassa), Man, mannitolo; Ara, arabitolo; Ery, eritritolo; Glol, glicerolo.

Scarti E Sottoprodotti	Ceppi	Risultati Ottenuti	Finali
Glicerolo grezzo	ACA-YC 5029	Produzione di biomassa (11,80 g/L), SCO (10,6%), CA (30,8 g/L), Ery (15,6 g/L) utilizzando ~75 g/L Glol	Sarris, Sampani, Rapti, and Papanikolaou (2019)
Glicerolo grezzo con OMW	ACA-DC 5029	Produzione di CA (37,4 g/L), Man (13,1 g/L), Ara (3,1 g/L), Ery (13,5 g/L) e SCO (16%) - riduzione dei composti fenolici (10%) e colore (30%) utilizzando ~70 g/L Glol e diversi	Sarris, Rapti, Papafotis, Koutinas, and Papanikolaou (2019)

		concentrazioni di OMW	
Glicerolo grezzo	Diversi tipi selvatici (A-1, A-2-4, A-3, A-6, A-15*) e mutanti	Produzione di biomassa (15,9 g/L), Ery (65 g/L), Arb (3,5 g/L), Man (14,9 g/L) utilizzando ~150 g/L Glol con diverse concentrazioni di NaCl	Tomaszewska et al. (2012)
Glicerolo grezzo	LFMB 19, LFMB 20 e ACA-YC 5033	Produzione di CA (50,1 g/L) e SCO (30,7%) utilizzando ~70 g/L Gl. Man (6 g/L) è stato prodotto utilizzando ~30 g/L Glol da LFMB 20	André et al. (2009)
Glicerolo grezzo	NCIM 3589	Produzione di CA (77,3 g/L) utilizzando ~54,4 g/L Glol	Imandi, Bandaru, Somalanka, and Garapati (2007)
Glicerolo puro e grezzo	27 isolati (NRRL YB-423 con le migliori prestazioni)	produzione di CA (~22,2 g/L)	Levinson et al. (2007)
Mezzi di scarto a base di glicerolo	ACA YC 5029, ACA YC 5030	Produzione di Man (28,9–32,1 g/L), Ery (33,6–35,5 g/L) in pallone usando ~100–120 g/L Glol,	Papanikolaou et al. (2017)

		solo CA (39,0 g/L) nel bioreattore usando ~100 g/L Glol	
Glicerolo grezzo	ACA-DC 50109 (LGAM S(7)1)	Produzione di CA (62,5 g/L), SCO (6–14%) utilizzando ~164 g/L Gl	Papanikolaou, Fakas, et al. (2008)
Glicerolo grezzo	ACA-DC 5033 e LFMB Y19	Produzione massima di biomassa secca (7,0 g/L), CA (16 g/L), Man (11 g/l), Ery (7,4 g/l), Ara (2,4 g/l) e SCO (47,9%)	Sarantou et al. (2021)
Glicerolo grezzo	SM7	Produzione di SCO (63%) utilizzando ~830 g/L Glol	Magdouli et al. (2020)
Glicerolo grezzo con scarti di crostacei	SM7	Utilizzo della produzione di SCO (35%) e lipasi (25–38 U/L). ~40 g/L Glol	Magdouli et al. (2017)
Glicerolo grezzo purificato	CIELO7	Produzione di SCO (37%), CA (5,4 g/L) utilizzando ~25 g/L Glol	Kumar, Yellapu, Tyagi, and Drogui (2020)
Glicerolo grezzo	ACA-DC 50109, LFMB Y-20, LMBF Y-21, LMBF Y-46, LMBF	Produzione di CA (27,8 g/L), Man (12,9 g/L), SCO (18,8%) utilizzando ~45 g/L Glol	Diamantopoulou et al. (2020)

	Y-47 e ATCC 20460		
Glicerolo grezzo	SKY7	Produzione di biomassa (18 g/L), SCO (45,5%) utilizzando ~20 g/L Glol	Kuttiraja et al. (2018)
Glicerolo grezzo	A-101 e mutanti	Produzione Ery (6,1 g/L), Uomo (5,5 g/L), CA (66,8 g/L) utilizzando ~150 g/L Glol	Rywinska, Rymowicz, Zarowska, and Skrzypinski (2010)
Glicerolo e materie grasse	A-101	Produzione di vitamine del gruppo B per 100 g di biomassa secca (tiamina 1,3 mg, riboflavina 5,3 mg, piridossina 4,9 mg, biotina 20,0 mg e acido folico 249 mg)	Jach et al. (2021)

5. CEPPI INGEGNERIZZATI DI *YARROWIA LIPOLYTICA*

Negli ultimi anni, i ceppi selvaggi più performanti sono stati anche geneticamente modificati per migliorarne le funzionalità e rese finali, superando i loro limiti naturali. Da un lato, alcuni ceppi sono stati progettati per aumentare l'utilizzo del substrato, dall'altro per migliorare la produzione di metaboliti. Ad esempio, Celinska, Nicaud e Bialas (2021) hanno esaminato diverse strategie di ingegneria genetica per ottenere ceppi in grado di idrolizzare in maniera efficiente amido, cellulosa, xilano e inulina (Celińska et al. 2021). Inoltre, Mano, Liu, Hammond, Currie e Stephanopoulos (2020) hanno creato un ceppo in grado

di secernere la β -galattosidasi per idrolizzare il lattosio nel siero di latte (Mano et al. 2020). Questa modifica, insieme alla produzione di omega-3 e alla sovraespressione dei geni della via di Leloir, ha portato a un ceppo derivato da W29 con prestazioni migliori in termini di titolo lipidico rispetto al ceppo di tipo selvatico B9, capace di consumare lattosio, su siero di latte non trattato. Dall'altra parte, sono stati sviluppati ceppi ricombinanti per produrre nuovi composti, solitamente non prodotti da *Y. lipolytica*, come carotenoidi (Bruder et al. 2020, Worland et al. 2020) e limonene (Pang et al. 2019). Altre possibili molecole ottenute da ceppi ingegnerizzati sono i polichetidi e i metaboliti derivati da amminoacidi aromatici (Miller & Alper 2019, Palmer et al. 2020). Di seguito verranno descritti i principali nuovi substrati utilizzabili e molecole prodotte da ceppi ingegnerizzati per valorizzare scarti e sottoprodotti dell'industria alimentare.

5.1. Utilizzo di scarti alternativi

5.1.1. Sfruttamento di melasso

Il melasso è un prodotto di scarto agroindustriale, ottenuto durante la produzione di zucchero di canna o da barbabietola (Akbas & Stark 2016) che contiene principalmente saccarosio (fino al 55%), oltre a composti inorganici e sali. Tuttavia la sua ulteriore purificazione non è redditizia. L'utilizzo del melasso da parte di *Y. lipolytica* è limitato dato che manca di attività invertasica e quindi non può utilizzare il saccarosio come fonte di carbonio. Al contrario, è noto che *Saccharomyces cerevisiae* esprime un'invertasi (gene *SUC2*) che permette al lievito di produrre etanolo (Xu et al. 2014). Per questo motivo, si è cercato di clonare il gene *SUC2* di *S. cerevisiae* nel genoma di *Y. lipolytica* (Nicaud et al. 1989). L'Università di Breslavia (Polonia) ha prodotto un ceppo ingegnerizzato di *Yarrowia lipolytica* (Wratislavia K1) che sovraesprime sia il gene *SUC2* di *S. cerevisiae* sia il gene nativo *GUT1* in modo tale da permettere il consumo di saccarosio e una rapida assimilazione del glicerolo. Utilizzando come substrato del melasso industriale grezzo e glicerolo grezzo il ceppo ingegnerizzato ha prodotto $100,65 \pm 3,75$ g/l di polioli quali, eritritolo e mannitolo, con una produttività di $1,09 \pm 0,9$ g/lh e una resa di $0,67 \pm 0,2$ g/g.

5.1.2. Utilizzo di polisaccaridi complessi

Yarrowia lipolytica è nota per la capacità di sovrapprodurre proteine extracellulari (Theron et al. 2020) a causa della sua sviluppata via secretoria (Celińska & Nicaud 2019). Tale caratteristica rende *Y. lipolytica* una piattaforma privilegiata per ampliare il profilo idrolitico del lievito e utilizzare altre fonti di carbonio solitamente poco o non assimilabili, come amido, cellulosa, xilano e inulina.

L'amido è uno dei polisaccaridi più importanti in natura, è composto da monomeri di glucosio uniti con legami α -glicosidici (α -1,4), ramificazioni in α -1,6. Si estrae da varie materie prime come mais, patate, grano e altre fonti (Celińska et al. 2020). L'uso dell'amido per produrre biocarburanti, come il bioetanolo, è già una tecnologia consolidata (Gray et al. 2006). Inoltre, i rifiuti alimentari ricchi di amido e i sottoprodotti generati da impianti di panetteria, pasticceria e macinazione del grano, emergono come potenziale materia prima per la sintesi di molecole ad alto valore aggiunto (Tsakona et al. 2014, Tsakona et al. 2019). Ad oggi non sono stati riportati ceppi di *Y. lipolytica* con attività amilolitica. D'altra parte, in base ai dati di letteratura, i geni delle α -amilasi del riso (*Oryza sativa*) risultano i primi ad essere stati clonati in *Y. lipolytica* (Park et al. 1997). Inizialmente, lo scopo del clonaggio delle amilasi era quello di studiare la sintesi proteica eterologa in *Y. lipolytica* e di utilizzare l'attività amilolitica come reporter enzimatico facile da seguire (Park et al. 1997, Dulermo et al. 2017). Tuttavia, le informazioni ottenute da quella ricerca hanno poi permesso un suo impiego come biocatalizzatore consolidato che cresce su amido grezzo (Ledesma-Amaro et al. 2015). Combinando l' α -amilasi del riso con la glucoamilasi di *Aspergillus niger*, gli autori hanno poi costruito il primo ceppo di *Y. lipolytica* in grado di crescere sull'amido. Il valore aggiunto di tale approccio permetteva di utilizzare l'amido nativo non pretrattato.

La cellulosa è il principale costituente della biomassa lignocellulosica, essendo un componente strutturale di base della parete cellulare delle piante. La stragrande maggioranza dei preparati cellulotici è composta da enzimi ottenuti da *Trichoderma reesei*. Studi dettagliati condotti su questo insieme di proteine enzimatiche hanno rivelato diversi fattori chiave che sono stati poi clonati in *Y. lipolytica*. È interessante notare come il genoma di *Y. lipolytica* possiede già diversi elementi che permetterebbero di intervenire in questo processo metabolico. Ad esempio, sono presenti i geni dormienti per il consumo di cellobiosio e xilosio (Guo et al. 2015, Ryu et al. 2016) che possono essere attivati

in seguito a ripetute subculture in terreni contenenti tali zuccheri (Ryu et al. 2016). Tuttavia, diversi studi di ingegneria genetica hanno permesso di migliorare la crescita del lievito su questi substrati. Ad esempio, Schwartz et al. (2018), hanno utilizzato il sistema CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) per favorire l'espressione del gene dormiente della β -glucosidasi producendo un ceppo capace di crescere meglio sul cellobiosio (Schwartz et al. 2018). Per quanto riguarda le molecole più complesse, come gli xilani, non ci sono dati che indichino la capacità di *Y. lipolytica* di consumarli (Duquesne et al. 2014).

Infine, per il consumo di inulina, un polisaccaride costituito da monomeri di fruttosio presente come sostanza di riserva nelle radici e nei tuberi delle piante, Liu et al. (2010) hanno clonato l'inulinasi (INU1) di *Kluyveromyces marxianus* in *Y. lipolytica* (Liu et al. 2010). In particolare, il loro lavoro si concentrava sull'utilizzo di un ceppo selvatico, ovvero *Y. lipolytica* SWJ-1b, capace di produrre efficientemente CA. La produzione dell'enzima INU1 sulla superficie cellulare ha generato un ceppo capace di crescere sull'inulina del topinambur, consumare il substrato a velocità elevate e produrre 77.9 g/l di acido citrico (Liu et al. 2010) e 1,0 g di lipidi (Zhao et al. 2010). Nel 2013, il medesimo gruppo di ricercatori, ha ulteriormente modificato lo stesso ceppo per ottimizzare la produzione di CA dall'inulina; tuttavia, le modifiche erano correlate al ciclo TCA e al miglioramento dell'utilizzo del substrato (Liu et al. 2013). Rakicka et al. (2019), invece, si sono focalizzati non tanto sull'ottenimento di ceppi capaci di consumare inulina ma piuttosto su lieviti capaci di rilasciare la maggior quantità di inulinasi possibile, da utilizzare poi come preparati enzimatici in processi biotecnologici (Rakicka et al. 2019).

5.2 Produzione di metaboliti alternativi

5.2.1. Terpeni

Y. lipolytica è stata propriamente ingegnerizzata per la produzione di terpeni perché la sua via endogena del mevalonato citosolico può dare origine a geranyl difosfato (GPP), farnesil difosfato (FPP) e geranylgeranyl difosfato (GGPP), che sono i substrati diretti per la biosintesi rispettivamente di monoterpeni, sesquiterpeni e diterpeni. Ad oggi, diversi terpeni vegetali sono stati prodotti con successo in questo lievito ingegnerizzato. Questi includono principalmente i

monoterpeni limonene (Cao et al. 2016, Pang et al. 2019) e linalolo (Cao et al. 2017), sesquiterpene farnesene bisabolene (Zhao et al. 2021, Yinghang Liu et al. 2019), il triterpene acido betulinico (Jin et al. 2019), il tetraterpene β -carotene (Gao et al. 2017, Larroude et al. 2018) e licopene (Matthäus et al. 2014, Schwartz et al. 2017). Degni di nota sono due lavori che hanno sfruttato i ceppi ingegnerizzati per produrre terpeni da scarti alimentari. Nel primo caso, Pang et al (2019) hanno prodotto limonene mediante *Y. lipolytica*. Il limonene è un monoterpene che si trova nella buccia degli agrumi e in diverse erbe officinali, come menta e rosmarino. Data la sua origine, esso si ritrova anche negli oli essenziali di agrumi e piante officinali e quindi in cosmetici, quando aggiunti. Svolge un ruolo fondamentale anche negli alimenti come additivo alimentare. Nel lavoro citato, (Pang et al. 2019) hanno introdotto la d-limonene sintasi eterologa di *Citrus limon* e la l-limonene sintasi di *Mentha spicata* in *Y. lipolytica* per produrre limonene. Questo primo tentativo e la crescita in terreno YPD (estratto di lievito, peptone e destrosio) permetteva di ottenere solo 0,124 mg/L di d-limonene e 0,126 mg/L di l-limonene. Successivamente hanno valutato l'effetto di dieci geni coinvolti nella via isoprenoide dipendente dal mevalonato nella resa di limonene e hanno visto che la sovraespressione dell'idrossimetilglutaril-CoA reduttasi (HMGR) determinava una titolazione di d-limonene e l-limonene dell'ordine rispettivamente di 0,256 mg/L e 0,316 mg/L. A questo punto hanno ottimizzato il processo produttivo utilizzando sistemi fed-batch in agitazione permettendo di raggiungere fino a 11,705 mg/L (0,443 mg/g) e 11,088 mg /L (0,385 mg/g), rispettivamente di d- e l-limonene, con i ceppi ingegnerizzati Po1g KdHR e Po1g KIHR. Infine, hanno impiegato gli stessi ceppi per recuperare l'olio da cucina esausto ed ottenere limonene. Anche se le rese si riducevano (2,514 mg/L e 2,723 mg/L per d- e l-limonene) rispetto a quelle massimali raggiunte, gli autori sono riusciti a valorizzare un prodotto di scarto e a produrre composti ad alto valore industriale.

Un approccio simile è stato portato avanti da Zhao et al. (2021) per la produzione di bisabolene.

Il bisabolene è il più semplice sesquiterpene monociclico e anche un composto bioattivo che esiste comunemente negli oli essenziali vegetali naturali. Tradizionalmente, il bisabolene è ampiamente utilizzato come composto aromatico e di fragranza di alto valore in molte industrie perché ha un aroma

fruttato e balsamico molto gradevole (Wang et al. 2017). Ad esempio, il β -bisabolene ha un odore simile all'olio di sesamo e quindi può essere usato come aromatizzante alimentare. Inoltre, ha potenzialità antinfiammatorie e antitumorali (Jouet al., 2016). Attualmente la produzione industriale di bisabolene è ottenuta principalmente mediante estrazione diretta dai tessuti vegetali. Tuttavia, questo metodo presenta molti svantaggi, come materia prima limitata, bassa resa del prodotto e fasi di separazione complicate. Zhao et al. (2021) hanno introdotto in *Y. lipolytica* la α -bisabolene sintasi di *Abies grandis*, la β -bisabolene sintasi di *Zingiber officinale* e la γ -bisabolene sintasi di *Helianthus annuus*. Successivamente, hanno sovraespresso i geni endogeni della via del mevalonato, introdotto pompe di efflusso eterologhe e testato la capacità produttiva di bisabolene a partire da olio da cucina esausto. I ceppi più performanti hanno permesso di produrre valori di 973,1 mg/l, 68,2 mg/l e 20,2 mg/l rispettivamente per α -, β -, e γ -bisabolene. Pur rappresentando un ottimo traguardo, l'ingegnerizzazione effettuata necessita di ulteriori processi di ottimizzazione che garantiscano di raggiungere livelli tali da essere impiegati per la commercializzazione e l'industrializzazione su larga scala.

5.2.3. Polichetidi

I polichetidi sono una famiglia strutturalmente e funzionalmente diversificata di metaboliti che possiedono qualità farmacologiche importanti tra cui proprietà antitumorali e ipocolesterolemizzanti, oltre a quelle antibiotiche e insetticide (Palmer & Alper 2019, Daley et al. 2017, Maschio et al. 2019). La produzione di queste molecole attraverso la chimica e i biocatalizzatori è limitata in termini di resa e titolo. Dato lo scarso recupero dei polichetidi naturali isolati da piante, funghi e batteri (Robinson 1991, Cardenas & Da Silva 2016, Cardenas & Da Silva 2014, Saunders et al. 2015, Tang et al. 2013) così come la loro difficile sintesi a causa di molteplici centri stereogenici e complessi sistemi ad anello, si è cercato di ingegnerizzare *Y. lipolytica* per produrli. In particolare, sono state apportate 3 sostanziali modifiche: 1) si sono introdotte copie multiple del gene *g2ps1* che codifica per la 2-pirone sintasi di *Gerbera hybrida*; 2) si è sovraespresso il percorso di bypass del piruvato che converte il piruvato prima in acetaldeide poi in acetato e infine in acetil-CoA; e 3) si è sovraespresso il gene che codifica per l'acetil-CoA carbossilasi (ACC1). In questo modo il ceppo

ingegnerizzato ha prodotto quasi 36 g/L di acido triacetico lattone (TAL). Il TAL prodotto è stato poi estratto e convertito in un nuovo materiale polimerico, il poli[(epicloridrina)-co(lattone dell'acido epossitriacetico)] (Markham et al. 2018). In altri studi, il TAL prodotto da *Y. lipolytica* è stato convertito con buone rese (96%) nell'antibiotico pogostone (Yu et al. 2018). Sfruttando la capacità di *Y. lipolytica* di consumare acidi organici per la crescita, i ricercatori hanno recentemente dimostrato la produzione di TAL a 4,8 g/L (resa 32%) da acido acetico come unica fonte di carbonio (Huan Liu et al. 2019)

5.3 Svantaggi e vantaggi dell'ingegneria genetica

Alcuni degli strumenti più utilizzati per l'ingegneria di *Yarrowia lipolytica* sembrano oggi più promettenti rispetto al passato (Larroude et al. 2020). Tuttavia, nonostante queste grandi potenzialità, le applicazioni industriali dei ceppi ingegnerizzati direttamente negli alimenti possono essere più complicate. Oltre ad essere meno robusti e meno flessibili dei ceppi di tipo selvatico, i microrganismi geneticamente modificati (MOGM) richiedono dati di valutazione del rischio aggiuntivi, incentrati sui cambiamenti introdotti (intenzionali e non) durante il loro sviluppo (EFSA NDA et al. 2019).

Ciò deve essere eseguito nonostante lo stato di “presunzione qualificata di sicurezza” posseduto da *Y. lipolytica* (Hazards et al. et al. 2018).

Inoltre, non importa quanto sia efficace la modifica effettuata, il marketing degli MOGM può essere influenzato dalla scarsa accettazione da parte dei consumatori (in particolare nell'UE) e dalle restrizioni normative per il loro utilizzo (Plavec & Berlec 2020).

6. CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi si inserisce nel contesto del recupero e valorizzazione di scarti e sottoprodotti agroalimentare utilizzando processi biotecnologici. I rifiuti e i sottoprodotti agroalimentari in tutto il mondo vengono costantemente prodotti in grande quantità. A volte il loro smaltimento diretto non è consentito dalla legge e in altri casi è troppo costoso. Allo stesso tempo questi scarti contengono ancora composti che possono essere utilizzati e/o valorizzati dai microrganismi. *Y. lipolytica*, ad esempio, è un affascinante microrganismo con un'intriseo potenziale industriale per produrre enzimi (lipasi e proteasi), proteine ed oli da

singola cellula (SCP e SCO), polioli, acidi organici e sostanze aromatiche. Negli ultimi anni si è cercato di sfruttare le grandi potenzialità di questo lievito anche per il trattamento e la valorizzazione di scarti e sottoprodotti dell'industria agro-alimentare. Come mostrato in questo elaborato, *Y. lipolytica* può crescere su vari tipi di substrato, sia di natura idrofila che idrofoba, e, pertanto, può essere sfruttata per valorizzare numerosi tipi di scarti, se adeguatamente formulati con un giusto rapporto di C/N, minerali e sostanze nutritive o con corretti livelli di pH e ossigenazione. L'ampia variabilità e adattabilità riscontrata all'interno di questa specie può favorire la selezione di ceppi specifici per i processi che si vogliono sviluppare. Infatti gli isolati selvatici possono avere morfologie diverse e metabolismi completamente diversi. Questo dipende dall'origine del microorganismo, dal substrato disponibile e dalle condizioni di coltura. Pertanto, un'ampia caratterizzazione dei diversi ceppi e l'ottimizzazione delle loro prestazioni in relazione alla sostenibilità del processo possono essere importanti per sfruttare appieno il potenziale di *Y. lipolytica*. Ciò può rappresentare uno strumento fondamentale per valorizzare le sostanze organiche presenti negli scarti e sottoprodotti agro-alimentari o per la produzione di nuove molecole a più alto valore aggiunto. In questo contesto, *Y. lipolytica* rappresenta un'alternativa sostenibile e sicura per il recupero di rifiuti, scarti e sottoprodotti dell'industria alimentare, favorendo così la conservazione delle risorse del pianeta e il raggiungimento dei 17 ambiziosi obiettivi dell'Agenda 2030 dell'ONU.

7. BIBLIOGRAFIA

Akbas, MY & Stark, BC 2016, 'Recent trends in bioethanol production from food processing byproducts', *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, vol. 43, no. 11, pp. 1593–1609.

Al-Malah, K, Azzam, MOJ, & Abu-Lail, NI 2000, 'Olive mills effluent (OME) wastewater post-treatment using activated clay', *Separation and Purification Technology*, vol. 20, no. 2, pp. 225–234.

André, A et al. 2009, 'Biotechnological conversion of bio-diesel-derived crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* strains', *Engineering in Life Sciences*, vol. 9, pp. 468–478.

Apte, M, Girme, G, Bankar, A, et al. 2013, '3, 4-dihydroxy-L-phenylalanine-derived melanin from *Yarrowia lipolytica* mediates the synthesis of silver and gold nanostructures', *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 11, p. 2.

Apte, M, Girme, G, Nair, R, et al. 2013, 'Melanin mediated synthesis of gold nanoparticles by *Yarrowia lipolytica*', *Materials Letters*, vol. 95, pp. 149–152.

Arslan, NP, Aydogan, MN, & Taskin, M 2016, 'Citric acid production from partly deproteinized whey under non-sterile culture conditions using immobilized cells of lactose—positive and cold-adapted *Yarrowia lipolytica* B9', *Journal of Biotechnology*, vol. 231, pp. 32–39.

Bains, N 2020, *INGREEN Project at the EFFoST2020 Online conference – INGREEN*, viewed 7 March 2022, <<https://ingreenproject.eu/ingreen-project-at-the-effost2020-online-conference/>>.

Bankar, AV, Kumar, AR, & Zinjarde, SS 2009, 'Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*', *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 84, no. 5, pp. 847–865.

Bellou, S et al. 2016, 'High lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* cultivated under double limitation of nitrogen and magnesium', *Journal of Biotechnology*, vol. 234, pp. 116–126.

Brígida, AIS et al. 2014, 'Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst', *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 101, pp. 148–158.

Bruder, S et al. 2020, 'Evaluation of a *Yarrowia lipolytica* Strain Collection for Its Lipid and Carotenoid Production Capabilities', *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 122, no. 1, p. 1900172.

Cao, X et al. 2016, 'Metabolic engineering of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for limonene overproduction', *Biotechnology for Biofuels*, vol. 9, p. 214.

Cao, XH et al. 2017, 'Enhancing linalool production by engineering oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*.' *Bioresource technology*.

Cardenas, J & Da Silva, NA 2014, 'Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of triacetic acid lactone', *Metabolic Engineering*, vol. 25, pp. 194–203.

Cardenas, J & Da Silva, NA 2016, 'Engineering cofactor and transport mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced acetyl-CoA and polyketide biosynthesis', *Metabolic Engineering*, vol. 36, pp. 80–89.

Carota, E et al. 2017, 'A sustainable use of Ricotta Cheese Whey for microbial biodiesel production', *The Science of the Total Environment*, vol. 584–585, pp. 554–560.

Carsanba, E et al. 2019, 'Citric Acid Production by *Yarrowia lipolytica*', in A Sibirny (ed.), *Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application*, Springer International Publishing, Cham, pp.91–117, viewed 7 March 2022, <https://doi.org/10.1007/978-3-030-21110-3_4>.

Caruso, G 2015, 'Fishery Wastes and By-products: A Resource to Be Valorised', *Journal of Fisheries Sciences com*, vol. 9, pp. 80–83.

Celińska, E et al. 2020, 'Optimization of *Yarrowia lipolytica*-based consolidated biocatalyst through synthetic biology approach: transcription units and signal peptides shuffling', *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 104, no. 13, pp. 5845–5859.

Celińska, E & Nicaud, J-M 2019, 'Filamentous fungi-like secretory pathway strayed in a yeast system: peculiarities of *Yarrowia lipolytica* secretory pathway underlying its extraordinary performance', *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 103, no. 1, pp. 39–52.

Celińska, E, Nicaud, J-M, & Białas, W 2021, 'Hydrolytic secretome engineering in *Yarrowia lipolytica* for consolidated bioprocessing on polysaccharide resources: review on starch, cellulose, xylan, and inulin', *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 105, no. 3, pp. 975–989.

Colombo, C et al. 2017, 'Macauba: A promising tropical palm for the production of vegetable oil', *OCL*, vol. 25.

Daley, DK, Brown, KJ, & Badal, S. 2017, 'Chapter 20 - Fungal Metabolites', in Simone Badal & R Delgoda (eds.), *Pharmacognosy*, Academic Press, Boston, pp.413–421, viewed 7 March 2022, <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128021040000202>>.

D'Annibale, A et al. 2006, 'Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production', *Bioresource Technology*, vol. 97, no. 15, pp. 1828–1833.

Darvishi, F, Salmani, N, & Hosseini, B 2019, 'Biovalorization of vegetable oil refinery wastewater into value-added compounds by *Yarrowia lipolytica*', *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 94, no. 9, pp. 2961–2968.

Das, RK et al. 2017, 'Biological synthesis of metallic nanoparticles: plants, animals and microbial aspects', *Nanotechnology for Environmental Engineering*, vol. 2, no. 1, p. 18.

De Felice, B, Pontecorvo, G, & Carfagna, M 1997, 'Degradation of waste waters from olive oil mills by *Yarrowia lipolytica* ATCC 20255 and *Pseudomonas putida*', *Acta Biotechnologica*, vol. 17, no. 3, pp. 231–239.

Dobrowolski, A et al. 2016, 'Efficient conversion of crude glycerol from various industrial wastes into single cell oil by yeast *Yarrowia lipolytica*', *Bioresource Technology*, vol. 207, pp. 237–243.

Dulermo, R et al. 2017, 'Using a vector pool containing variable-strength promoters to optimize protein production in *Yarrowia lipolytica*', *Microbial Cell Factories*, vol. 16, no. 1, p. 31.

Duquesne, S et al. 2014, 'Construction of a Highly Active Xylanase Displaying Oleaginous Yeast: Comparison of Anchoring Systems', *PLOS ONE*, vol. 9, no. 4, p. e95128.

EFSA NDA et al. 2019, 'Safety of *Yarrowia lipolytica* yeast biomass as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283', *EFSA journal. European Food Safety Authority*, vol. 17, no. 2, p. e05594.

EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA) et al. 2019, 'Safety of *Yarrowia lipolytica* yeast biomass as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283', *EFSA Journal*, vol. 17, no. 2, p. e05594.

Egermeier, M et al. 2017, 'Metabolic Flexibility of *Yarrowia lipolytica* Growing on Glycerol', *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, p. 49.

FAO 2019 n.d., viewed 7 March 2022, <https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=The%20State%20of%20Food%20and%20Agriculture%202019.%20Moving%20forward%20on%20food%20loss%20and%20waste%20reduction&author=FAO&publication_year=2019>.

Fickers, P, Cheng, H, & Sze Ki Lin, C 2020, 'Sugar Alcohols and Organic Acids Synthesis in *Yarrowia lipolytica*: Where Are We?', *Microorganisms*, vol. 8, no. 4, p. E574.

Fickers, P, Marty, A, & Nicaud, JM 2011, 'The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications', *Biotechnology Advances*, vol. 29, no. 6, pp. 632–644.

Filippousi, R et al. 2019, 'Isolation, identification and screening of yeasts towards their ability to assimilate biodiesel-derived crude glycerol: microbial production of polyols, endopolysaccharides and lipid', *Journal of Applied Microbiology*, vol. 127, no. 4, pp. 1080–1100.

Food Waste | The Nutrition Source | Harvard T.H. Chan School of Public Health n.d., viewed 7 March 2022, <<https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/sustainability/food-waste/>>.

Gao, S et al. 2017, 'Production of β -carotene by expressing a heterologous multifunctional carotene synthase in *Yarrowia lipolytica*', *Biotechnology Letters*.

Gonçalves, F a. G, Colen, G, & Takahashi, JA 2014, 'Yarrowia lipolytica and its multiple applications in the biotechnological industry', *TheScientificWorldJournal*, vol. 2014, p. 476207.

Gottardi, D et al. 2021, 'Recovery and valorization of agri-food wastes and by-products using the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*', *Trends in Food Science & Technology*, vol. 115, pp. 74–86.

Gottardi, D <1983> 2013, *Production of bioactive peptides through sequential action of Yarrowia lipolytica proteases and chemical glycation* Doctoral Thesis, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, viewed 7 March 2022, <<https://amsdottorato.unibo.it/5718/>>.

Gray, KA, Zhao, L, & Emptage, M 2006, 'Bioethanol', *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 10, no. 2, pp. 141–146.

Grembecka, M 2015, 'Sugar alcohols—their role in the modern world of sweeteners: a review', *European Food Research and Technology*, vol. 241, no. 1, pp. 1–14.

Groenewald, M et al. 2014, 'Yarrowia lipolytica: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential', *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 40, no. 3, pp. 187–206.

Guo, Z et al. 2015, 'Development of cellobiose-degrading ability in *Yarrowia lipolytica* strain by overexpression of endogenous genes', *Biotechnology for Biofuels*, vol. 8, no. 1, p. 109.

Hamza, F et al. 2017, 'Selenium nanoparticle-enriched biomass of *Yarrowia lipolytica* enhances growth and survival of *Artemia salina*', *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 106, pp. 48–54.

Hazards et al., A et al. 2018, 'Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 8: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2018', *EFSA Journal*, vol. 16, no. 7, p. e05315.

Hernandez-Adame, L et al. 2019, 'Biosynthesis of β -d-glucan-gold nanoparticles, cytotoxicity and oxidative stress in mouse splenocytes', *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 134, pp. 379–389.

Imandi, SB et al. 2008, 'Application of statistical experimental designs for the optimization of medium constituents for the production of citric acid from pineapple waste', *Bioresource Technology*, vol. 99, no. 10, pp. 4445–4450.

Jin, C-C et al. 2019, 'Boosting the biosynthesis of betulonic acid and related triterpenoids in *Yarrowia lipolytica* via multimodular metabolic engineering', *Microbial Cell Factories*.

Katre, G et al. 2012, 'Evaluation of single cell oil (SCO) from a tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 as a potential feedstock for biodiesel', *AMB Express*, vol. 2, no. 1, p. 36.

- Krzysztof, C et al. 2018, 'The bioconversion of waste products from rapeseed processing into keto acids by *Yarrowia lipolytica*', *Industrial Crops and Products*, vol. 119, pp. 102–110.
- Kumar, LR et al. 2020, 'Purified crude glycerol by acid treatment allows to improve lipid productivity by *Yarrowia lipolytica* SKY7', *Process Biochemistry*, vol. 96, pp. 165–173.
- Kumari, A & Gupta, R 2012, 'Extracellular expression and characterization of thermostable lipases, LIP8, LIP14 and LIP18, from *Yarrowia lipolytica*', *Biotechnology Letters*, vol. 34, no. 9, pp. 1733–1739.
- Lanciotti, Rosalba et al. 2005, 'Evaluation of the ability of *Yarrowia lipolytica* to impart strain-dependent characteristics to cheese when used as a ripening adjunct', *International Journal of Dairy Technology*, vol. 58, no. 2, pp. 89–99.
- Lanciotti, R. et al. 2005, 'Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater', *Bioresource Technology*, vol. 96, no. 3, pp. 317–322.
- Larroude, M et al. 2018, 'A synthetic biology approach to transform *Yarrowia lipolytica* into a competitive biotechnological producer of β -carotene', *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 115, no. 2, pp. 464–472.
- Larroude, M et al. 2020, 'A set of *Yarrowia lipolytica* CRISPR/Cas9 vectors for exploiting wild-type strain diversity', *Biotechnology Letters*, vol. 42, no. 5, pp. 773–785.
- Ledesma-Amaro, R, Dulermo, T, & Nicaud, JM 2015, 'Engineering *Yarrowia lipolytica* to produce biodiesel from raw starch', *Biotechnology for Biofuels*, vol. 8, no. 1, p. 148.
- Lei, Q et al. 2019, 'Efficient separation of α -ketoglutarate from *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 culture broth by converting pyruvate to l-tyrosine', *Bioresource Technology*, vol. 292, p. 121897.
- Li, Y, Chen, J, & Lun, S-Y 2001, 'Biotechnological production of pyruvic acid', *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 57, no. 4, pp. 451–459.
- Liu, Huan et al. 2019, 'Engineering acetyl-CoA metabolic shortcut for eco-friendly production of polyketides triacetic acid lactone in *Yarrowia lipolytica*', , p. 614131, viewed 7 March 2022, <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/614131v1>>.
- Liu, X et al. 2020, 'Enhanced erythritol production by a Snf1-deficient *Yarrowia lipolytica* strain under nitrogen-enriched fermentation condition', *Food and Bioprocess Processing*, vol. 119, pp. 306–316.
- Liu, X-Y et al. 2010, 'Inulin hydrolysis and citric acid production from inulin using the surface-engineered *Yarrowia lipolytica* displaying inulinase', *Metabolic Engineering*, vol. 12, no. 5, pp. 469–476.
- Liu, X-Y et al. 2013, 'Both Decrease in ACL1 Gene Expression and Increase in ICL1 Gene Expression in Marine-Derived Yeast *Yarrowia lipolytica* Expressing INU1 Gene Enhance Citric Acid Production from Inulin', *Marine Biotechnology*, vol. 15, no. 1, pp. 26–36.
- Liu, Yinghang et al. 2019, 'Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for production of α -farnesene', *Biotechnology for Biofuels*.

Lopes, M et al. 2009, 'The use of olive mill wastewater by wild type *Yarrowia lipolytica* strains: medium supplementation and surfactant presence effect', *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 84, no. 4, pp. 533–537.

Lopes, M et al. 2018, 'Microbial lipids and added value metabolites production by *Yarrowia lipolytica* from pork lard', *Journal of Biotechnology*, vol. 265, pp. 76–85.

Lopes, M et al. 2019, 'Waste Cooking Oils as Feedstock for Lipase and Lipid-Rich Biomass Production', *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 121, no. 1, p. 1800188.

Lopes, VRO et al. 2016, 'NITROGEN SOURCES ON TPOMW VALORIZATION THROUGH SOLID STATE FERMENTATION PERFORMED BY *Yarrowia lipolytica*', *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, vol. 33, pp. 261–270.

Louhasakul, Y et al. 2020, 'Metagenomic insights into bioaugmentation and biovalorization of oily industrial wastes by lipolytic oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* during successive batch fermentation', *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 67, no. 6, pp. 1020–1029.

Louhasakul, Y, Cheirsilp, B, & Prasertsan, P 2016, 'Valorization of Palm Oil Mill Effluent into Lipid and Cell-Bound Lipase by Marine Yeast *Yarrowia lipolytica* and Their Application in Biodiesel Production', *Waste and Biomass Valorization*, vol. 7, no. 3, pp. 417–426.

Magdouli, S et al. 2017, 'Valorization of raw glycerol and crustacean waste into value added products by *Yarrowia lipolytica*', *Bioresource Technology*, vol. 243, pp. 57–68.

Magdouli, S et al. 2020, 'Sync between leucine, biotin and citric acid to improve lipid production by *Yarrowia lipolytica* on crude glycerol-based media', *Biomass and Bioenergy*, vol. 142, p. 105764.

Mamaev, D & Zvyagilskaya, R 2021, '*Yarrowia lipolytica*: a multitasking yeast species of ecological significance', *FEMS yeast research*, vol. 21, no. 2, p. foab008.

Mano, J et al. 2020, 'Engineering *Yarrowia lipolytica* for the utilization of acid whey', *Metabolic Engineering*, vol. 57, pp. 43–50.

Mansour, S, Beckerich, JM, & Bonnarme, P 2008, 'Lactate and amino acid catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica*', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, no. 21, pp. 6505–6512.

Markham, KA et al. 2018, 'Rewiring *Yarrowia lipolytica* toward triacetic acid lactone for materials generation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 115, no. 9, pp. 2096–2101.

Maschio, L et al. 2019, 'Cloning, expression, and purification of intact polyketide synthase modules', *Methods in Enzymology*, vol. 617, pp. 63–82.

Matoba, S et al. 1988, 'Intracellular precursors and secretion of alkaline extracellular protease of *Yarrowia lipolytica*', *Molecular and Cellular Biology*, vol. 8, no. 11, pp. 4904–4916.

- Matthäus, F et al. 2014, 'Production of lycopene in the non-carotenoid-producing yeast *Yarrowia lipolytica*', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 80, no. 5, pp. 1660–1669.
- Miller, KK & Alper, HS 2019, 'Yarrowia lipolytica: more than an oleaginous workhorse', *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 103, no. 23, pp. 9251–9262.
- Mirończuk, AM et al. 2014, 'Enhanced production of erythritol by *Yarrowia lipolytica* on glycerol in repeated batch cultures', *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, vol. 41, no. 1, pp. 57–64.
- Mirończuk, AM et al. 2015, 'Newly isolated mutant of *Yarrowia lipolytica* MK1 as a proper host for efficient erythritol biosynthesis from glycerol', *Process Biochemistry*, vol. 50, no. 1, pp. 61–68.
- Morgunov, IG, Kamzolova, SV, & Samoilenko, VA 2013, 'Enhanced α -ketoglutaric acid production and recovery in *Yarrowia lipolytica* yeast by effective pH controlling', *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 97, no. 19, pp. 8711–8718.
- Nicaud, J-M 2012, 'Yarrowia lipolytica', *Yeast (Chichester, England)*, vol. 29, no. 10, pp. 409–418.
- Nicaud, JM, Fabre, E, & Gaillardin, C 1989, 'Expression of invertase activity in *Yarrowia lipolytica* and its use as a selective marker', *Current Genetics*, vol. 16, no. 4, pp. 253–260.
- Oswal, N et al. 2002, 'Palm oil mill effluent treatment by a tropical marine yeast', *Bioresource Technology*, vol. 85, no. 1, pp. 35–37.
- Otto, C, Yovkova, V, & Barth, G 2011, 'Overproduction and secretion of α -ketoglutaric acid by microorganisms', *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 92, no. 4, pp. 689–695.
- Palmer, CM et al. 2020, 'Engineering 4-coumaroyl-CoA derived polyketide production in *Yarrowia lipolytica* through a β -oxidation mediated strategy', *Metabolic Engineering*, vol. 57, pp. 174–181.
- Palmer, CM & Alper, HS 2019, 'Expanding the Chemical Palette of Industrial Microbes: Metabolic Engineering for Type III PKS-Derived Polyketides', *Biotechnology Journal*, vol. 14, no. 1, p. e1700463.
- Pang, Y et al. 2019, 'Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* to produce limonene from waste cooking oil', *Biotechnology for Biofuels*, vol. 12, no. 1, p. 241.
- Papanikolaou, S et al. 2008, 'Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media', *Bioresource Technology*, vol. 99, no. 7, pp. 2419–2428.
- Papanikolaou, S et al. 2017, 'Production of secondary metabolites through glycerol fermentation under carbon-excess conditions by the yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Rhodospiridium toruloides*', *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 119, no. 9, p. 1600507.

- Papanikolaou, S & Aggelis, G 2010, 'Yarrowia lipolytica: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids', *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 112, no. 6, pp. 639–654.
- Papanikolaou, S & Aggelis, G 2011, 'Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production', *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 113, no. 8, pp. 1031–1051.
- Parfene, G et al. 2011, 'Lipolytic activity of lipases from different strains of Yarrowia lipolytica in hydrolysed vegetable fats at low temperature and water activity', *Romanian Biotechnological Letters*, vol. 16, no. 6, pp. 46–52.
- Park, CS et al. 1997, 'Expression, Secretion, and Processing of Rice α -Amylase in the Yeast Yarrowia lipolytica*', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 11, pp. 6876–6881.
- Park, J-N et al. 2014, 'Functional characterization of extracellular chitinase encoded by the YICTS1 gene in a dimorphic yeast Yarrowia lipolytica', *Journal of Microbiology*, vol. 52, no. 4, pp. 284–291.
- Patrignani, F et al. 2007, 'Role of surface-inoculated Debaryomyces hansenii and Yarrowia lipolytica strains in dried fermented sausage manufacture. Part 1: Evaluation of their effects on microbial evolution, lipolytic and proteolytic patterns.', *Meat science*.
- Patrignani, F et al. 2011, 'Variability of the lipolytic activity in Yarrowia lipolytica strains in pork fat', *Meat Science*, vol. 88, no. 4, pp. 689–693.
- Patrignani, F et al. 2020, 'Potential of Yarrowia lipolytica and Debaryomyces hansenii strains to produce high quality food ingredients based on cricket powder', *LWT*, vol. 119, p. 108866.
- Patsios, SI et al. 2020, 'Sustainable Animal Feed Protein through the Cultivation of YARROWIA Lipolytica on Agro-Industrial Wastes and by-Products', *Sustainability*, vol. 12, no. 4, p. 1398.
- Plavec, TV & Berlec, A 2020, 'Safety Aspects of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria', *Microorganisms*, vol. 8, no. 2, p. 297.
- Poh, PE et al. 2020, *Waste Management in the Palm Oil Industry: Plantation and Milling Processes*.
- Rakicka, M et al. 2017, 'Polyol production from waste materials by genetically modified Yarrowia lipolytica', *Bioresource Technology*, vol. 243, pp. 393–399.
- Rakicka, M et al. 2019, 'Production of high titer of citric acid from inulin', *BMC Biotechnology*, vol. 19, no. 1, p. 11.
- Ratledge, C & Wynn, JP 2002, 'The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms', *Advances in Applied Microbiology*, vol. 51, pp. 1–51.

- Reed, KB & Alper, HS 2018, 'Expanding beyond canonical metabolism: Interfacing alternative elements, synthetic biology, and metabolic engineering', *Synthetic and Systems Biotechnology*, vol. 3, no. 1, pp. 20–33.
- Robinson, JA 1991, 'Polyketide synthase complexes: their structure and function in antibiotic biosynthesis', *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, vol. 332, no. 1263, pp. 107–114.
- Ryan, MP & Walsh, G 2016, 'The biotechnological potential of whey', *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, vol. 15, no. 3, pp. 479–498.
- Rymowicz, W, Rywińska, A, & Marcinkiewicz, M 2009, 'High-yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica*', *Biotechnology Letters*, vol. 31, no. 3, pp. 377–380.
- Ryu, S, Hipp, J, & Trinh, CT 2016, 'Activating and Elucidating Metabolism of Complex Sugars in *Yarrowia lipolytica*', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 82, no. 4, pp. 1334–1345.
- Rywińska, A et al. 2013, 'Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications', *Biomass and Bioenergy*, vol. 48, pp. 148–166.
- Rywińska, A et al. 2020, 'Alpha-Ketoglutaric Acid Production from a Mixture of Glycerol and Rapeseed Oil by *Yarrowia lipolytica* Using Different Substrate Feeding Strategies', *Sustainability*, vol. 12, no. 15, p. 6109.
- da S. Pereira, A, Fontes-Sant'Ana, GC, & Amaral, PFF 2019, 'Mango agro-industrial wastes for lipase production from *Yarrowia lipolytica* and the potential of the fermented solid as a biocatalyst', *Food and Bioprocess Processing*, vol. 115, pp. 68–77.
- Sarris, D et al. 2019, 'Production of Added-Value Chemical Compounds through Bioconversions of Olive-Mill Wastewaters Blended with Crude Glycerol by a *Yarrowia lipolytica* Strain', *Molecules*, vol. 24, no. 2, p. 222.
- Sarris, D & Papanikolaou, S 2015, 'Biotechnological production of ethanol: Biochemistry, processes and technologies', *Engineering in Life Sciences*, vol. 16, p. n/a-n/a.
- Saunders, LP et al. 2015, 'Triacetic acid lactone production in industrial *Saccharomyces* yeast strains', *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, vol. 42, no. 5, pp. 711–721.
- Schmidt, H 2001, 'Nanoparticles by chemical synthesis, processing to materials and innovative applications', *Applied Organometallic Chemistry*, vol. 15, no. 5, pp. 331–343.
- Schwartz, C et al. 2018, 'Multiplexed CRISPR Activation of Cryptic Sugar Metabolism Enables *Yarrowia lipolytica* Growth on Cellobiose', *Biotechnology Journal*, vol. 13, no. 9, p. 1700584.
- Schwartz, CM et al. 2017, 'Host and Pathway Engineering for Enhanced Lycopene Biosynthesis in *Yarrowia lipolytica*', *Front. Microbiol.*

- Scioli, C & Felice, B 1993, 'Impiego di ceppi di lievito nella depurazione dei reflui dell'industria olearia (Acque di vegetazione)', *undefined*, viewed 7 March 2022, <<https://www.semanticscholar.org/paper/Impiego-di-ceppi-di-lievito-nella-depurazione-dei-Scioli-Felice/c882493694c6443953a27d2db1e779efeac78cb>>.
- Sibirny, A, Madzak, K, & Fickers, P 2014, 'Genetic engineering of non-conventional yeast for the production of valuable Compounds', viewed 7 March 2022, <<https://orbi.uliege.be/handle/2268/257270>>.
- Stenmarck, ??sa et al. 2016, *Estimates of European food waste levels*, viewed 7 March 2022, <<http://edepot.wur.nl/378674>>.
- Tang, S-Y et al. 2013, 'Screening for enhanced triacetic acid lactone production by recombinant Escherichia coli expressing a designed triacetic acid lactone reporter', *Journal of the American Chemical Society*, vol. 135, no. 27, pp. 10099–10103.
- Tarón Dunoyer, A, Cuello, R, & Perez, R 2020, 'Biodegradation of dairy wastes using crude enzymatic extract of Yarrowia lipolytica ATCC 9773', *Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, vol. 15, p. 1.
- Taskin, M et al. 2015, 'Microbial lipid production by cold-adapted oleaginous yeast Yarrowia lipolytica B9 in non-sterile whey medium', *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, vol. 9, no. 5, pp. 595–605.
- Theron, CW et al. 2020, 'Comprehensive comparison of Yarrowia lipolytica and Pichia pastoris for production of Candida antarctica lipase B', *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, p. 1741.
- Tomaszewska, L, Rywińska, A, & Gładkowski, W 2012, 'Production of erythritol and mannitol by Yarrowia lipolytica yeast in media containing glycerol', *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, vol. 39, no. 9, pp. 1333–1343.
- Tsakona, S et al. 2014, 'Formulation of fermentation media from flour-rich waste streams for microbial lipid production by Lipomyces starkeyi', *Journal of Biotechnology*, vol. 189, pp. 36–45.
- Tsakona, S et al. 2019, 'Development of a Circular Oriented Bioprocess for Microbial Oil Production Using Diversified Mixed Confectionery Side-Streams', *Foods*, vol. 8, no. 8, p. 300.
- USDA Foreign Agricultural Service n.d., *USDA Foreign Agricultural Service*, viewed 7 March 2022, <<https://www.fas.usda.gov/data-analysis/scheduled-reports-2017>>.
- Vong, WC, Au yang, KLC, & Liu, S-Q 2016, 'Okara (soybean residue) biotransformation by yeast Yarrowia lipolytica', *International Journal of Food Microbiology*, vol. 235, pp. 1–9.
- Wadhwa, M & Bakshi, MPS 2013, 'Utilization of fruit and vegetable wastes as livestock feed and as substrates for generation of other value-added products'.
- Wang, C et al. 2017, 'Metabolic engineering and synthetic biology approaches driving isoprenoid production in Escherichia coli.', *Bioresource technology*.

Worland, AM et al. 2020, 'Analysis of *Yarrowia lipolytica* growth, catabolism, and terpenoid biosynthesis during utilization of lipid-derived feedstock', *Metabolic Engineering Communications*, vol. 11, p. e00130.

Xiong, D et al. 2015, 'Conversion of mutton fat to cocoa butter equivalent by increasing the unsaturated fatty acids at the Sn-2 position of triacylglycerol through fermentation by *Yarrowia lipolytica*', *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, vol. 11, no. 2, pp. 57–65.

Xu, W et al. 2014, 'Continuous ethanol production from sugarcane molasses using a new designed combined bioreactor system by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*.', *Biotechnology and applied biochemistry*, vol. 61.

Yadav, JSS et al. 2015, 'Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides', *Biotechnology Advances*, vol. 33, no. 6, Part 1, pp. 756–774.

Yalcin, SK, Bozdemir, MT, & Ozbas, ZY 2009, 'Utilization of Whey and Grape Must for Citric Acid Production by Two *Yarrowia lipolytica* Strains', *Food Biotechnology*, vol. 23, no. 3, pp. 266–283.

Yano, Y, Oikawa, H, & Satomi, M 2008, 'Reduction of lipids in fish meal prepared from fish waste by a yeast *Yarrowia lipolytica*', *International Journal of Food Microbiology*, vol. 121, no. 3, pp. 302–307.

Yu, J et al. 2018, 'Bioengineering triacetic acid lactone production in *Yarrowia lipolytica* for pogostone synthesis', *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 115, no. 9, pp. 2383–2388.

Zhao, C-H et al. 2010, 'Expression of inulinase gene in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* and single cell oil production from inulin-containing materials', *Metabolic Engineering*, vol. 12, no. 6, pp. 510–517.

Zhao, Yakun et al. 2021, 'High-efficiency production of bisabolene from waste cooking oil by metabolically engineered *Yarrowia lipolytica*', *Microbial Biotechnology*, vol. 14, no. 6, pp. 2497–2513.

Zinjarde, S et al. 2014, '*Yarrowia lipolytica* and pollutants: Interactions and applications', *Biotechnology Advances*, vol. 32, no. 5, pp. 920–933.

