

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI
VITERBO**

DIPARTIMENTO DI

Agriculture, Forestry, Nature and Energy (DAFNE)

DOTTORATO DI RICERCA IN

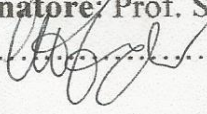
BIOTECNOLOGIE VEGETALI - XXIV Ciclo

**APPLICAZIONE DEL MELASSO DA BARBABIETOLA COME
SUBSTRATO ALTERNATIVO ALLA CRESCITA ED
ALL'ACCUMULO DI PIGMENTI
ANTIOSSIDANTI/NUTRACEUTICI DI *Haematococcus pluvialis***

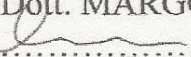
sigla del settore scientifico-disciplinare

BIO/04

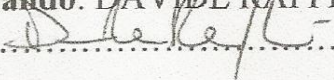
Coordinatore: Prof. STEFANIA MASCI

Firma


Tutor: Dott. MARGONELLI ANDREA

Firma


Dottorando: DAVIDE RAFFI

Firma


INDICE

Introduzione	1
FICOLOGIA E TECNICHE DI COLTIVAZIONE	5
Biologia e classificazione: le Microalghe	5
Specie di interesse nutraceutico	6
Apporto di nutrienti e condizioni di crescita	8
Nutrient Starvation per aumentare la produzione di metaboliti secondari	9
Sistemi di coltivazione di massa	10
I vivai circolari all'aperto	12
Fotobioreattori	13
Barriere allo scale-up	15
CASO DI STUDIO: <i>Haematococcus pluvialis</i>	18
Descrizione di <i>Haematococcus pluvialis</i>	18
Funzioni biologiche dei carotenoidi prodotti da <i>H. pluvialis</i>	20
Carotenogenesi in <i>H. pluvialis</i>	24
Il melasso da barbabietola come substrato di crescita	26
<u>SCOPO DELLA TESI</u>	29
<u>MATERIALI E METODI</u>	
Costituzione delle colture cellulari di <i>H. pluvialis</i>	31
Costituzione delle colture cellulari con melasso da barbabietola e sali inorganici	32
Trattamento campioni per estrazione dei pigmenti	33
Determinazione cromatografica del contenuto di pigmenti	36
<u>RISULTATI</u>	
Allestimento delle colture cellulari di <i>H. pluvialis</i>	39

Estrazione dei pigmenti	49
Determinazione dei pigmenti con analisi HPLC	50
Confronto economico tra BG11 e melasso da barbabietola	51
<u>CONCLUSIONI</u>	55
<u>RINGRAZIAMENTI</u>	57
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	58

LISTA DELLE TABELLE PRESENTI NEL TESTO

Tabella 1: confronto qualitativo tra sistemi di coltivazioni “aperti” e “chiusi”.

Tabella 2: confronto quantitativo tra sistemi di coltivazioni “aperti” e “chiusi”.

Tabella 3: produttività di alcuni sistemi di crescita sperimentali.

Tabella 4: composizione substrato BG11.

Tabella 5: riassunto delle prove con melasso da barbabietola e Sali inorganici.

Tabella 6: tare delle eppendorf prima della liofilizzazione dei campioni.

Tabella 7: pesi netti dei campioni liofilizzati.

Tabella 8: tempi di ritenzione degli standard impiegati nell’analisi HPLC.

Tabella 9: pesi lordi e netti delle prove condotte.

Tabella 10: riassunto dei dati di quantificazione dei pigmenti estratti dalle varie di *H. pluvialis*.

Tabella 11: confronto tra le medie dei dati di quantificazione di HP1 in BG11 e le prove con melasso 2.0 g/l.

Tabella 12: costo €/kg ed €/g dei reagenti per BG11.

Tabella 13: totale costi per 1.0 litro e per 1000 litri di BG11.

Tabella 14: totale costi per 1.0 litro e per 1000 litri di substrato con 2.0 g/l di melasso, 1.0 g/l rispettivamente di nitrato di sodio e solfato di magnesio eptaidrato.

LISTA DELLE FIGURE PRESENTI NEL TESTO

Figura 1: rappresentazione schematica di un vivaio circolare aperto.

Figura 2: diverse impostazioni di fotobioreattori.

Figura 3: a) schema di pompaggio della CO₂ in controcorrente alla crescita algale; **b)** schema di un fotobioreattore triangolare.

Figura 4: *H. pluvialis* osservato al microscopio durante gli esperimenti.

Figura 5: modello schematico della via biosintetica dell'astaxantina in *H. pluvialis*

Figura 6: aspetto e consistenza del melasso da barbabietola.

Figura 7: sx) conta cellule automatico TC10 Biorad. **dx)** microscopio ottico usato per fotografare le colture.

Figura 8: sx) strumento HPLC usato per le analisi; **dx)** colonna usata per la separazione cromatografica.

Figura 9: confronto tra le varie curve di crescita di *H. pluvialis*.

Figura 10: cellule di *H. pluvialis* in BG 11.

Figura 11: cellule di *H. pluvialis* in 0.1 g/l di melasso, 1.0 g/l di nitrato di sodio e di magnesio solfato eptaidrato.

Figura 12: cellule di *H. pluvialis* in 0.3 g/l di melasso, 1.0 g/l di nitrato di sodio e di magnesio solfato eptaidrato.

Figura 13: cellule di *H. pluvialis* in 0.5 g/l di melasso, 1.0 g/l di nitrato di sodio e di magnesio solfato eptaidrato.

Figura 14: cellule di *H. pluvialis* in 0.8 g/l di melasso, 1.0 g/l di nitrato di sodio e di magnesio solfato eptaidrato.

Figura 15: cellule di *H. pluvialis* in 1.0 g/l di melasso, 1.0 g/l di nitrato di sodio e di magnesio solfato eptaidrato.

Figura 16: cellule di *H. pluvialis* in 1.3 g/l di melasso, 1.0 g/l di nitrato di sodio e di magnesio solfato eptaidrato.

Figura 17: cellule di *H. pluvialis* in 1.5 g/l di melasso, 1.0 g/l di nitrato di sodio e di magnesio solfato eptaidrato.

Figura 18: cellule di *H. pluvialis* in 2.0 g/l di melasso, 1.0 g/l di nitrato di sodio e di magnesio solfato eptaidrato.

Figura 19: confronto tra le medie dei pigmenti estratti dalle colture in BG11 e in 2.0 g/l di melasso da barbabietola, 1.0 g/l rispettivamente di NaNO_3 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. ASTA: astaxantina; VIOLA: violaxantina; ANTERA: anteraxantina; ZEA: zeaxantina.

INTRODUZIONE

Introduzione

Anche se la coltivazione massiva sia di alghe pluricellulari sia di microalghe monocellulari, entrambi organismi fotosintetizzanti, ha trovato le attenzioni della ricerca in Germania durante la II guerra mondiale, in particolare intorno alle specie microalgali unicellulari (Becker, 2004), la prima e più classica pubblicazione del settore circa la sperimentazione di un impianto pilota dedicato alla coltivazione di *Chlorella* venne dal Carnegie Institution di Washington (Burlew, 1953)

Gli sforzi della ricerca hanno portato all'estrazione di proteine ed altri metaboliti attivi, nonostante che alcune criticità, come l'elevato costo di produzione della biomassa, abbiano frenato l'utilizzo di microalghe per questi scopi. Queste criticità hanno ristretto il campo di utilizzazione delle microalghe solo a settori ristretti di mercato quali la produzione di metaboliti secondari, quella del pigmento astaxantina, riservata all'allevamento dei salmoni per le sue proprietà di colorante, la produzione di additivi alimentari naturali ed, in misura minore, la produzione di acidi grassi polinsaturi e proteine.

Nel frattempo alcune alghe pluricellulari, hanno consolidato il loro utilizzo in alcuni mercati, prevalentemente in Asia ove se ne è concentrata la coltivazione. Per esempio, l'alga *Nori*, utilizzata come alimento per la realizzazione di pietanze locali, vanta una produzione di biomassa di oltre 500.000 ton/anno in Giappone e Korea.

Recentemente si è sviluppato un forte interesse sull'impiego di microalghe unicellulari grazie alle nuove sfide energetiche ed ambientali. Sia lo sviluppo di tecniche di conversione dell'energia adatte all'impiego efficiente di biomasse, sia l'attenzione verso nuove fonti di energia alternative a quelle fossili, hanno rinnovato gli sforzi della ricerca circa l'impiego di tale risorsa.

Ulteriore interesse è stato l'impiego di alcune specie di microalghe per produrre biocarburanti, sostituendosi alla classica estrazione petrolifera, più costosa e di più forte impatto ambientale. Dalla letteratura emerge un'intensificazione degli sforzi della ricerca

proprio in tale direzione, anche grazie alle recentissime indicazioni fornite da Department of Energy (DoE) statunitense nel Luglio 2009. Particolare attenzione verso questa nuova fonte di energia deriva, inoltre, dalla emanazione negli USA dell'Atto del Congresso Americano relativo alle nuove politiche energetiche degli Stati Uniti (EISA, *Energy Independence and Security Act*, 2007). La legge contiene la promozione dell'uso di carburanti da fonti rinnovabili col fine di ridurre la dipendenza dalle importazioni di combustibili derivanti da fonti fossili. L'EISA intensifica, inoltre, l'attenzione e la rilevanza delle nuove fonti di energia non solo come essenziali per uno sviluppo economico sostenibile, ma anche quali fondamento per la sicurezza della nazione. E' tuttavia improbabile che gli aggressivi target fissati dal dispositivo possano compiersi mediante la sola produzione di biofuels da raccolti tradizionali (Tyson *et al*, 2004). L'aver intuito questa impossibilità ha spinto gli USA ad esplorare la possibilità dell'impiego di alghe a scopi energetici, ma orientando la ricerca principalmente verso la produzione di biodiesel. La necessità di competere direttamente con i prodotti petroliferi destinati all'autotrazione limita lo sviluppo della tecnologia verso un impiego industriale (almeno nella fase pilota o dimostrativa), poiché presuppone elevati costi di investimento per lo sviluppo di queste nuove tecnologie. Occorre osservare, inoltre che, seppur al momento prevalga il filone di ricerca dell'impiego di microalghe per biocarburanti, non sono da trascurare le molteplici altre destinazioni d'uso della biomassa algale, in particolare la produzione di energia elettrica. Nel recente report intitolato *National Algal Biofuel Roadmap* lo stesso DoE segnala i fattori chiave di successo dell'impiego di microalghe a fini energetici (Eere, 2009).

Gli elementi che hanno spinto la ricerca verso l'utilizzo delle microalghe a fini energetici, e non solo, possono essere riportati nei seguenti punti:

1. alta produttività per unità di area coltivata di biomassa e di lipidi convertibili a biocarburanti (Chisti, 2007) ed alta efficienza della conversione della luce solare durante la fotosintesi. Nelle comuni

biomasse agrarie l'utilizzazione della luce risulta essere inferiore all'1% (McKendry, 2002), mentre nel caso delle microalghe sono sperimentati valori fino al 5%, con punte ottenibili fino al 7% nella coltivazione in fotobioreattori, nei quali è possibile il controllo dei fenomeni inibitori della crescita quali, ad esempio, la fotorespirazione. Ne consegue una più efficiente utilizzazione del territorio cui si somma una più intensa produzione di biocarburanti per superficie coltivata, dipendente dalla combinazione di superiore produttività e contenuto di lipidi rispetto alla biomassa di derivazione agraria, come colture energetiche di mais, sorgo o triticale, oppure matrici ligno-cellulosiche destinate alla combustione diretta.

2. Non competitività rispetto al food market. L'intensificazione dell'impiego di raccolti per l'estrazione sia di lipidi a fini energetici sia di metaboliti secondari ha recentemente provocato l'impennata dei costi di tali materie prime destinate ai soli usi alimentari.

Considerando, inoltre, l'impatto sugli ecosistemi della riconversione di foreste, praterie, torbiere, savane a coltivazioni a fini energetici, è opportuno tenere conto del costo, in termini di emissioni che questa implica: in particolare è stato calcolato un paradossale Biofuel Carbon Debt per le colture che prevedano la conversione dei terreni agricoli (Fargione *et al.*, 2008). Tale preoccupante elemento di competitività rispetto alle fonti tradizionali di alimenti potrebbe essere ovviato dalla coltivazione di alghe, organismi capaci di crescere in un ampio range di condizioni operative ed ambienti, compresi quelli inadatti alle tipiche coltivazioni agricole (Clarens *et al.*, 2010).

3. Utilizzo di terreni altrimenti non produttivi e non coltivabili. Oltre che a non risultare competitive con il mercato alimentare, le alghe si prestano alla coltivazione in territori altrimenti desertici, deserti e/o comunque improduttivi, nonché in mare aperto. Tale capacità, oltre che rappresentare una qualità positiva nella coltivazione intensiva di alghe a fini sia energetici sia alimentari, risulta peraltro funzionale alla sostenibilità sia ambientale, che economica di eventuali impianti dedicati. Simili unità produttive

avrebbero sia un' impronta sul territorio significativa, dato che un impianto per la crescita algale potrebbe occupare centinaia se non migliaia di ettari, sia requisiti di investimento importanti, dato che tali sistemi tecnologici potrebbero essere installati in aree inutilizzabili per altri fini; l'estrema variabilità delle specie algali rende la loro coltivazione possibile in molteplici ambienti acquatici, dalle acque dolci, a quelle salate, ai reflui urbani e zootecnici. Tale caratteristica semplifica il problema della gestione dell'acque (consentendone un meno complesso riciclo) e riduce l'impatto sui sistemi acquatici e sulla disponibilità di risorse idriche.

4. Produzione di coprodotti ad alto valore aggiunto. L'impiego delle alghe si è consolidato nell'ambito della estrazione di metaboliti ovvero nella produzione di prodotti per la nutraceutica e l'acquacoltura. Alcune particolari specie, si prestano alla produzione di tali risorse che possono trovare sempre maggiori impieghi benefici sul mercato. La biomassa algale potrebbe essere anche destinabile alla alimentazione umana ed animale ed i suoi residui derivanti dalla lavorazione della biomassa cruda possono trovare spazio quali biofertilizzanti, il che offre un ulteriore contributo al bilancio economico dell'utilizzo di biomassa algale, rendendola potenzialmente ancora più competitiva. L'estrazione di metaboliti e coprodotti, per il loro elevato valore aggiunto, può costituire una via per l'abbattimento dei costi di produzione in una iniziale fase di sviluppo della tecnologia.

5. Contenimento delle emissioni di CO₂ come tutte le biomasse. Anche le alghe, come tutti gli organismi fotosintetici, impiegano anidride carbonica per i processi biochimici tipici della fotosintesi; il gas viene immagazzinato dalle cellule algali e successivamente rilasciato nella loro conversione ad energia, con l'effetto di un ciclo ad emissioni virtualmente nulle. La CO₂ ha, inoltre, un effetto migliorativo sulla produttività della biomassa, pertanto le coltivazioni possono costituire una ragionevole soluzione di abbattimento delle emissioni prodotte da impianti a combustibili fossili; integrabilità in altri processi, quali impianti di trattamento delle

acque, di allevamento intensivo e di produzione di energia elettrica. L'integrazione della coltivazione in altri processi può apportare benefici in termini di efficienza energetica ed impatto ambientale sia a questi che alla coltivazione e conversione dell'energia da alghe. Soluzioni integrate possono, infine, agevolare lo sviluppo delle tecnologie e dei sistemi che ne rendano economico ed efficace l'impiego.

FICOLOGIA E TECNICHE DI COLTIVAZIONE

Biologia e classificazione: le Microalghe (Becker, 1994)

Le microalghe sono organismi eucaristici unicellulari, contenenti clorofilla quale pigmento fotosintetico. La loro struttura è sostanzialmente funzionale a tale processo biochimico e presenta un cloroplasto, un nucleo, mitocondri e vacuoli, che consentono loro di adattarsi facilmente a diversi ecosistemi adattandosi ad un largo spettro di salinità, temperatura e pH. Gli organismi procarioti (cianobatteri) sono privi degli organi cellulari al contrario degli organismi eucarioti che ne sono dotati. Mentre i cianobatteri non producono tipicamente interessanti quantità di lipidi e di composti attivi, gli organismi eucarioti, invece, di cui fanno parte le microalghe fotosintetizzanti, sono oggetto di importanti studi per la loro applicazione su scala industriale, sia per la produzione di lipidi per biocarburanti che per l'estrazione di metaboliti secondari. Tra le microalghe, le più note in letteratura sono *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella spp.*, *Dunaliella salina*, *Nannochloropsis spp.*, *Haematococcus pluvialis*.

Nelle alghe eucariote, la fotosintesi ha luogo nei cloroplasti in due fasi alternate, di luce e di oscurità (Geider e Osborne, 1992). La fase luminosa converte l'energia solare in ATP e NADPH (assieme alla scissione dell'acqua cui segue il rilascio di O₂) poi impiegati nella fase buia per il fissaggio della CO₂ grazie all'azione catalizzante dell'enzima ribuloso bisfosfato carbossilasi ossigenasi (RuBisCo). Ciò vale, in verità, per le classi di microalghe dotate di metabolismo autotrofo, ovvero capaci di utilizzare l'anidride carbonica atmosferica,

tuttavia esistono specie di tipo eterotrofo, capaci pertanto di utilizzare come fonte di carbonio le molecole organiche ridotte come i carboidrati, i quali per queste colture vengono apportati dall'esterno. Esistono anche specie di tipo mixotrofico, ovvero capaci di cambiare il loro metabolismo, adattandosi ad entrambi i tipi di metabolismo, sia in presenza di anidride carbonica atmosferica, sia se il carbonio organico viene fornito dall'esterno. Appartengono a tale categoria il cianobatterio *Spirulina* e l'alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. La biodiversità microalgale è estremamente estesa e si stima l'esistenza di oltre 10 milioni di specie, classificate in regni (procariote ed eucariote), divisioni e classi. Vengono indicate come alghe verdi gli organismi eucariotici fotosintetizzanti e cianobatteri gli organismi procariotici; in entrambi i regni si trovano organismi di interesse per l'impiego sia a fini energetici sia per l'estrazione di metaboliti secondari utilizzati per l'integrazione della dieta umana e per l'acquacoltura.

Specie di interesse nutraceutico

La “nutraceutica” è lo studio di alimenti che hanno una funzione benefica sulla salute umana. Il termine è stato coniato dal Dr. DeFelice nel 1989.

La biomassa secca di microalghe è una fonte ricca di proteine, β -carotene, acidi nucleici e una fonte molto ricca di acido gamma linoleico (Spolaore *et al.*, 2006). Ad oggi, le microalghe vengono usate con successo per migliorare la risposta immunitaria delle persone affette da cancro, AIDS, coliti e diabete (De e Devasagayam, 2006).

Il genere *Spirulina* si trova in molti laghi e stagni di acqua dolce. È stata consumata per migliaia di anni dalle popolazioni del Centro America (Maya ed Aztechi), dell'Africa e dai popoli orientali. *Spirulina* è una microalga blu – verde e deve il suo colore alla presenza in concentrazione simile di due pigmenti: la clorofilla (verde) e la ficocianina (blu) nella sua struttura cellulare. È inoltre una fonte ricca di altri nutrienti, inclusi i complessi della vitamina B, β -

carotene, vitamina E, carotenoidi, manganese, zinco, rame, ferro, selenio e acido gamma linoleico, un acido grasso essenziale. *Spirulina* è considerata come il “cibo del futuro” proprio perché riesce ad accumulare elevate quantità di composti nutraceutici, ovvero principi attivi con proprietà curative di comprovata e riconosciuta efficacia. Un esempio: *Spirulina* contiene dal 65 al 71% di proteine complete rispetto al peso secco, con un perfetto bilanciamento in amminoacidi essenziali. *Spirulina* è inoltre una delle poche microalghe in cui si può ritrovare la vitamina B12, tipica dei tessuti animali (Kumudha et al., 2010).

Il genere *Chlorella* è una microalga verde che contiene vitamine naturali, microelementi e fibre e presenta la più alta concentrazione di acidi nucleici di tutte le sostanze alimentari (Gors et al., 2009). Contiene inoltre un'elevata concentrazione di clorofilla (fino a 10 volte in più di *Spirulina*), ed è proprio grazie a questa elevata concentrazione che i ricercatori attribuiscono l'effetto antiossidante di *Chlorella*. La letteratura scientifica indica che la biomassa secca di *Chlorella* può essere un coadiuvante nella cura dei sintomi di numerosi tipi di malattie, compreso il diabete (Jong-Yuh e Mei-Fen, 2004), la cirrosi epatica (Wu et al., 2005), le epatiti, le infezioni virali e batteriche, le ulcere peptiche e le anemie (Halperin et al., 2003). *Chlorella* è considerata un agente detossificante di prima classe, capace di rimuovere l'alcool dal fegato ed anche metalli pesanti come cadmio e mercurio, certi pesticidi, erbicidi e policlorobifenili (PCBs) dai tessuti del corpo. *Chlorella* può anche assorbire tossine dall'intestino, aiutando a ristabilire la flora batterica.

Dunaliella salina è una microalga marina verde conosciuta per il suo accumulo di carotenoidi (Loeblich, 1982). Alcuni ricercatori hanno valutato la capacità della biomassa secca di questa alga di proteggere contro lo stress ossidativo in maniera significativa contro la tossicità indotta dal tetracloruro di carbonio (Wen Hsu et al., 2008). L'effetto protettivo era maggiore di quello del β -carotene. Il trattamento con la sola polvere di *Dunaliella*, ha ristabilito i livelli di

catalasi, superossido dismutasi e perossidasi che erano diminuiti con il trattamento con tetracloruro di carbonio in ratti da laboratorio.

Apporto di nutrienti e condizioni di crescita

La coltivazione isolata di una determinata specie (e quindi anche la stabilità e la conservazione della coltivazione) dipende dal mantenimento di un ambiente di crescita funzionale alla specie. Ciò si traduce essenzialmente nella necessità di controllare la qualità del brodo di coltivazione e l'apporto di nutrienti. Le modifiche che intercorrono nel tempo, a seguito dell'esaurimento delle risorse presenti nel brodo di crescita, con la produzione di nuova biomassa, oppure a causa della contaminazione da agenti esterni, mettono a repentaglio l'efficacia della coltivazione. I requisiti primari sono l'apporto di fonti di carbonio, fosforo, azoto; quindi potassio, magnesio, ferro e manganese in tracce. Le alghe eterotrofe richiedono fonti esterne di carbonio, quali ad esempio il glucosio.

L'assorbimento di carbonio avviene tradizionalmente dalla CO₂ in atmosfera (autotrofia), seppur anche fumi di combustione e carbonati di sodio possano essere fonti utilizzabili. La maggior parte delle microalghe possono tollerare concentrazioni di CO₂ insufflata all'interno della coltura fino a 150.000 ppm (contro i 360 ppm nell'aria). Uno studio recente (Bilanovic *et al.*, 2009) ha analizzato, sulla base di dati raccolti da 10 specie testate, la combinazione ottimale di azoto ed anidride carbonica per la coltivazione di microalghe concludendo che:

- le alghe di acqua dolce presentano massimi di produttività in corrispondenza di concentrazioni di azoto presente nel brodo di coltura nel range tra i 285 e i 427 mg/l e di CO₂ fino al 15% (con casi tolleranti fino al 70%);
- le microalghe marine crescono sotto qualsiasi concentrazione di azoto (da 4 a 20 mg/l, ottimo 4 mg/l) e di CO₂ disciolta (da 400 a 150.000 ppm, ottimo 3% per *Chlorella*, fino a 15% per altre alghe marine col risultato di una produttività superiore). Sono veicoli efficaci di azoto i sali di ammonio, nitrati e l'urea, mentre gli NOx e

l' N_2 dell'aria non sono biodisponibili. Il fosforo può essere introdotto nella forma di sali di fosfato in eccesso rispetto al rapporto stechiometrico dal momento che gli anioni del fosforo tendono a legarsi con gli ioni metallici. L'importanza del silicio è, invece, ristretta a ristretti gruppi di microalghe, tra le quali le diatomee.

Ulteriori fattori che condizionano la crescita sono riportati nel lavoro di Suh e Li (2003):

- l'approvvigionamento di energia luminosa: la quantità di biomassa che può essere prodotta cresce con l'intensità della luce fino ad un punto, detto di saturazione, oltre il quale la crescita crolla (fotoinibizione o fotosaturazione o foto-ossidazione);
- miscelazione: una leggera turbolenza mantiene le microalghe in sospensione, migliorando l'efficienza di utilizzazione della luce, lo scambio dei gas e la distribuzione dei nutrienti eliminando inoltre la stratificazione termica;
- rimozione di ossigeno: molte specie non tollerano l'esposizione a livelli di concentrazione di O_2 (prodotto dalla respirazione durante la notte o nelle regioni oscure) superiori alla saturazione a condizioni atmosferiche (7,5 mg/l); lo stripping con aria è una soluzione applicabile ai fotobioreattori;
- il controllo di temperatura: l'evaporazione naturale consente di controllare la temperatura all'interno dei sistemi di coltura aperti (open ponds), tuttavia nei fotobioreattori sono necessari sistemi di controllo della temperatura interna della coltura, che può variare dai 10 ai 30°C.

Nutrient Starvation per aumentare la produzione di metaboliti secondari

E' ben noto, a seguito di numerose evidenze sperimentali (Griffiths e Harrison 2009; Sheehan *et al.*, 1998; Tedesco e Duerr, 1989; Tornabene e Burris, 1983), che la condizione di scarso approvvigionamento di determinati nutrienti induce una superiore produzione di metaboliti secondari nelle microalghe. Le ragioni biochimiche di tale effetto sono oggetto di indagine, seppur la produzione di questi composti in condizioni di stress nutritivo sia

spiegabile come una azione difensiva attuata dalla cellula algale. La limitazione di fonti di nutrienti può pertanto massimizzare la produttività di metaboliti attivi, tuttavia a discapito della produzione di biomassa. Questa tecnica di crescita è conosciuta come “ Nutrient Starvation”.

Sistemi di coltivazione di massa

Le tecniche di coltivazione di microalghe, anche se possono presentare configurazioni e design di processo differenti, sono sostanzialmente due: quella in ambiente aperto in cosiddetti “open” o “raceway ponds”, ovvero sistemi all’aperto dove la movimentazione delle microalghe è fatta insufflando aria dal basso, come gli “open ponds”, oppure dove il materiale biologico è mosso da una ruota che spinge la coltura nella vasca, come nei “raceway ponds”, oppure in ambiente chiuso, ovvero all’interno dei cosiddetti fotobioreattori. Un confronto qualitativo e quantitativo è dato dalla Tabella 1 e dalla Tabella 2. Vi è, tuttavia, incertezza in letteratura circa le direzioni (Chaumont 1993) che prenderanno le coltivazioni su larga scala. In alcuni casi i sistemi chiusi, con preferenza verso alcune varianti (ad esempio i sistemi elicoidali) sono indicati come ideali, sia per la movimentazione del brodo di coltivazione, sia per la loro intrinseca capacità di offrire un sistema facilmente controllabile e soprattutto protetto da agenti esterni (in particolare organismi predatori o contaminatori). Nonostante queste argomentazioni a favore, l’esperienza (Ben-Amotz, 2008) ha mostrato sistemi di fotobioreattori del tutto fallimentari lasciando spazio all’affermazione della produzione a fini commerciali per soli sistemi aperti. Alcuni dati circa la produttività di alcuni sistemi sperimentali sono riportati nella Tabella 3.

Caratteristica	sistema aperto	sistema chiuso
rapporto S/V	alto (4-10 volte il s. chiuso)	ridotto
specie algali	ristretto	flessibile
criterio selezione specie	competizione di altre	resistenza
densità della popolazione	contenuta	concentrata ¹
efficienza della raccolta	bassa	facilitata
periodo coltivazione	limitato	esteso
contaminazione	possibile	improbabile
efficienza uso N/P	bassa	regolabile
perdite di acqua	evaporazione costante	prevenute
utilizzo luce	povera	ottimizzabile
gas transfer	povero	controllabile
controllo Temperatura	per evaporazione	da implementare
costi importanti	mixing e controllo O ₂	controllo T
scalabilità	facile	onerosa ²
investimento	ridotto	capital intensive

Tabella 1: confronto qualitativo tra sistemi di coltivazioni “aperti” e “chiusi”.
Fonte: “Produzione di energia ed elettricità da alghe”, A. Mazzitelli (tesi).

Variabile	sistema chiuso	sistema aperto
Produttività volumetrica (kg m ⁻³ d ⁻¹)	1,535	0,117
Produttività superficiale (kg m ⁻² d ⁻¹)	0,048	0,035
Concentrazione biomassa (kg m ⁻³)	4	0,14
Area richiesta (m ²)	5.681	7.828
Consumo CO ₂ (t)	185	185
Geometria del sistema	132 tubi/unità L _{tubi} = 80m D _{tubi} = 0.06	978m ² /vivaio Larghezza = 12m Profondità = 0.3m
Numero di unità	6	8

Tabella 2: confronto quantitativo tra sistemi di coltivazioni “aperti” e “chiusi”
Fonte: “Produzione di energia ed elettricità da alghe”, A. Mazzitelli (tesi).

Tecnica	Luogo	Alga	Prod _{max} (g/m ² /day)	Prod _{max} (g/L/day)
Open pond (prof. 15 cm)	Israele	Spirulina pl.	27.0	0.18
(prof. 1cm)	Rep. Ceca	Chlorella sp.	25.0	2.50
(prof. 20cm)	Israele	-	20	-
(prof. 15cm)	Italia	-	32	-[49]
Tubi or.(d 12.3cm)	Italia	Spirulina max.	25.0	0.25
(d 2.6cm)	Italia	Spirulina sp.	27.8	-
(d 2.5cm)	Israele	Spirulina pl.	27.0	1.60
(d 2.6cm)	Spagna	Isochrysis galb.	-	0.32
(d 6.0cm)	Spagna	Phaeodactylum	-	2.02
(d 3.0cm)	Spagna	Phaeodactylum	-	2.76
(d 6.0cm)	Francia	Porphyridium cr.	25.0	0.36
Tubi incl. (d 2.5cm)	Singapore	Chlorella pyr.	72.5	2.90
(d 1.2cm)	Singapore	Chlorella pyr.	130.0	3.64
Serpentino vert. (d 2.4cm)	Australia	Tetraselmis chuii	-	1.20
Colonna vert. (d 20cm)	Spagna	Phaeodactylum	-	0.69
(d 2.6cm)	Israele	Isochrysis galb.	-	1.60
Flat plate incl. (d 10.4cm)	Israele	Spirulina pl.	33.0	0.30
(d 1.3cm)	Israele	Spirulina pl.	51.0	4.30
(d 3.2cm)	Italia	Spirulina pl.	24.0	0.80

Tabella 3: produttività di alcuni sistemi di crescita sperimentali.
Fonte: “Produzione di energia ed elettricità da alghe”, A. Mazzitelli (tesi).

I sistemi circolari all'aperto

Si tratta di canali circolari dove il brodo di coltivazione è riflussato e miscelato mediante una pala rotante in prossimità della quale è di continuo alimentata la specie di coltivazione. Una rappresentazione sintetica è mostrata nella Figura 1.

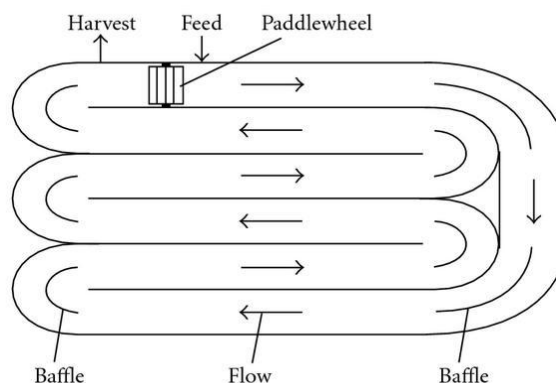


Figura 1: rappresentazione schematica di un vivaio circolare aperto.

Fonte: www.hindawi.com.

Le potenze necessarie alla movimentazione sono stimabili in 6kWh per vivai della dimensione di 1000 m², anche se una opportuna combinazione di pompe e pendenze delle vasche possono ridurre tale richiesta a 2kWh (Becker, 1994). La profondità è contenuta, tipicamente 0.3 metri, per limitare l'anaerobiosi con perdita di biomassa. E' possibile costruire vasche in cemento, oppure predisporne in plastica. Il controllo della temperatura è possibile mediante la naturale evaporazione dell'acqua, tuttavia l'efficacia di tale metodo è subordinata al mutare delle stagioni e condizionata dalla re-immissione di acqua nel vivaio. La produttività è inoltre affetta, trattandosi di un sistema aperto, dalla contaminazione da parte di specie parassite e dalla sostanziale impossibilità di regolare il contenuto di CO₂. Esiste ampia sperimentazione citata in letteratura (Chisti, 2007; Radmann *et al.*, 2007; Mata *et al.*, 2009) e la tecnica è apprezzata per i bassi costi operativi e di costruzione.

Fotobioreattori

I fotobioreattori consistono essenzialmente di un set di tubi di plastica o vetro dal diametro contenuto (0.1 – 0,2 m) per limitare le zone oscure al suo interno. La Figura 2 ne offre alcuni esempi.

I collettori solari sono orientati N/S e possibilmente inclinati per massimizzare la cattura delle radiazioni solari, ma sono possibili generalmente diverse configurazioni, orizzontali, verticali ed elicoidali. La biomassa è movimentata da pompe meccaniche o meglio da airlift pumps, pompe ad aria compressa, meno versatili, ma più delicate verso la biomassa stessa. Esistono metodi per la pulitura automatica dei tubi quando periodicamente necessaria.

L'ossigeno generato dalla fotosintesi ($10\text{g m}^{-3}\text{ min}^{-1}$ nei picchi di irradiazione) deve essere rimosso per non causare foto-ossidazione compromettendo la produttività: è pertanto necessario implementare un degassificatore per effettuare lo stripping con aria; si ritiene ragionevole un percorso massimo di 80 metri prima che la biomassa torni a questa zona di rimozione di ossigeno. Un sistema di airlift pumping è adeguato a tale scopo: l'aria è immessa alla base del tubo di risalita lungo il quale si ha lo stripping dell'ossigeno prodotto dalla fotosintesi. I gas sono liberati in testa al tubo descritto sopra, in corrispondenza del quale avviene, generalmente, il prelievo della biomassa prodotta. Alla base del tubo di discesa del brodo di coltivazione viene immessa la CO_2 in controcorrente utile alla crescita algale, con una efficienza di utilizzazione attorno all'80%. Uno schema sintetico di tale sistema è mostrato nella Figura 3a (A. Mazzitelli). Uno schema triangolare, che ha mostrato elevate produttività per via dell'inclinazione dei tubi, è mostrato nella Figura 3b (A. Mazzitelli).

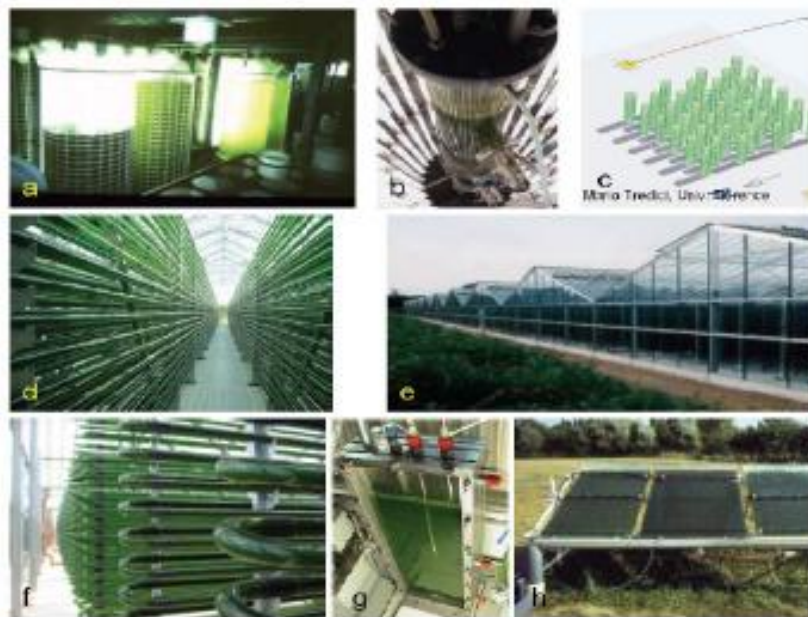


Figura 2: diverse impostazioni di fotobioreattori.

Fonte: “Produzione di energia ed elettricità da alghe”, A. Mazzitelli (tesi).

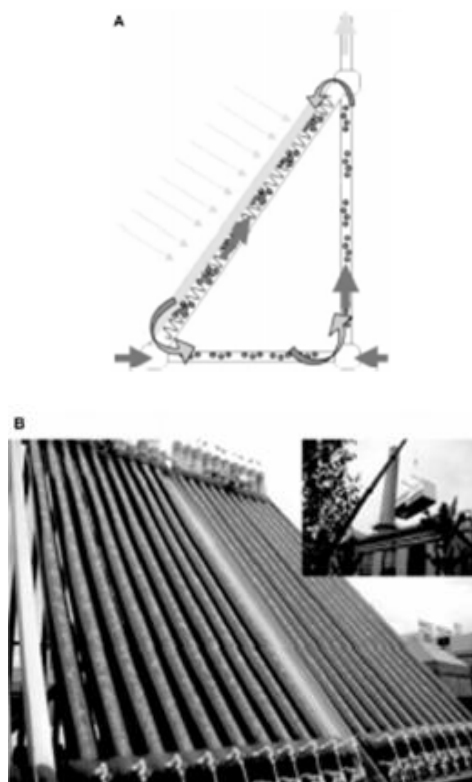


Figura 3: a) schema di pompaggio della CO₂ in controcorrente alla crescita algale; b) schema di un fotobioreattore triangolare.

Fonte: “Produzione di energia ed elettricità da alghe”, A. Mazzitelli (tesi).

Limitazioni allo scale-up

La possibilità di implementare su larga scala i metodi di coltivazione discussi presenta limiti sia tecnici che economici. Le coltivazioni dedicate alle microalghe presentano alcune limitazioni, di seguito riassunte e descritte.

Stabilità delle coltivazioni su larga scala. L'aspetto più preoccupante riguarda competitori e patogeni inquinanti delle alghe essendo questi pervasivi e poco noti (Del Campo *et al.*, 2007); l'esigenza di avere un impianto stabile e durevole può richiedere di rigettare l'impiego di soluzioni che hanno vantaggi in termini di sostenibilità, ad esempio l'uso di reflui, oppure meno onerose economicamente come i sistemi aperti. Parimenti, il ricorso a monoculture può risultare impraticabile e colture miste da progetto possono essere meglio tollerate che quelle spontanee. E' necessario pertanto comprendere quali tipi di precauzioni e contromisure sia necessario adottare per assicurare il funzionamento dell'impianto nel lungo termine.

Produttività globale del sistema. Per garantire i livelli di produzione della biomassa attesi è inevitabile predisporre il controllo delle specie coltivate, sia pre-impianto, ad esempio mediante la loro ingegnerizzazione e lo sviluppo di specie ad hoc per il tipo di impiego desiderato, sia in termini di monitoraggio durante il funzionamento. E' inoltre importante implementare sistemi che ottimizzino la produzione netta di energia, per la quale sono critici i costi (energetici) di raccolta ed il contenuto di lipidi (se il prodotto target ad esempio è il biodiesel). Tali limitazioni richiedono, tra gli strumenti utili ad affrontarle, la standardizzazione di modelli e metodi di misurazione delle caratteristiche di impianto connesse alla produttività: rese, velocità di crescita, contenuto di metaboliti. Vi è attualmente una grande dispersione di dati e metodi in letteratura risultando controproducente ad un ulteriore sviluppo della tecnologia.

Fonti di nutrienti, sostenibilità e management. L'impiego di fertilizzanti azotati può inficiare l'utilizzo delle microalghe quale alternativa energetica su larga scala. L'impiego di azoto può essere contenuto utilizzando la tecnica della limitazione dei nutrienti che ha mostrato di indurre una maggiore produzione di olio: sarà quindi necessario sviluppare sistemi che regolino la concentrazione dei nutrienti nel brodo di coltivazione in funzione della fase di crescita. L'accoppiamento a sistemi di trattamento delle acque può a sua volta ridurre l'impiego di nutrienti introducendo un vantaggio per questi stessi impianti: le alghe sono, infatti, in grado di fornire l'ossigeno utile al breakdown del materiale organico, nonché (nutrendosi) abbattere azoto, fosforo e potenzialmente anche metalli pesanti. L'applicazione di tale soluzione può tuttavia essere inficiata dalla disponibilità di simili impianti di trattamento e dalla loro vicinanza ad impianti dedicati alla coltivazione di alghe. Il riciclo dei nutrienti può essere a sua volta importante: il recupero è possibile per quelle applicazioni che prevedano la produzione di biomassa residua, quali la digestione anaerobica di alghe ovvero l'estrazione di combustibili liquidi.

Gestione dell'acqua di processo, trattamento e riciclo. Seppur la possibilità di coltivare alghe in acque non utili alle più comuni produzioni agricole costituisca uno dei maggiori vantaggi di tale soluzione energetica, la gestione dell'acqua di processo rimane un problema complesso. Produzioni industrialmente interessanti richiedono infatti una fortissima disponibilità di acqua sia per il riempimento (2000 m³ per un sistema circolare aperto di riferimento con una superficie di 1 ettaro e profondo 20 centimetri) sia per compensare le perdite da evaporazione. La movimentazione di simili quantità d'acqua può essere a sua volta onerosa e parimenti complessa può risultare la gestione degli spurghi, necessari per contrastare l'accumulo di sostanze nei vivai. L'evaporazione rappresenta un fattore critico dagli effetti contrastanti: aumenta la quantità di acqua necessaria, ma contribuisce al raffreddamento nei periodi più caldi. La

prevenzione di tale effetto naturale mediante l'impiego di fotobioreattori potrebbe tuttavia richiedere sistemi di raffreddamento più onerosi fino alla riduzione del risparmio di acqua, ad esempio per la necessità di spruzzare su di questi acqua per il controllo della temperatura. Il riciclo dell'acqua è un aspetto fondamentale per la sostenibilità dell'impianto, tuttavia il trattamento degli spurghi (ma anche dei flussi di input) per correggere la concentrazione di sostanze accumulate fino ai livelli utili alla coltivazione, può risultare essenziale. E' ragionevole pensare che impianti di larga produzione non possano fare a meno di impianti di trattamento delle acque di dimensioni importanti aggiungendo costi e complessità alla gestione del sistema produttivo.

CASO DI STUDIO: *Haematococcus pluvialis***Descrizione di *Haematococcus pluvialis***

L'alga unicellulare fotosintetizzante *Haematococcus pluvialis* Flotow (Volvocales), mostrata in Figura 4, è una microalga verde che si ritrova nei laghetti di acqua dolce delle regioni temperate. Essa presenta due stadi durante la sua crescita, contraddistinti dal passaggio dalla motilità a non motilità e dall'ingrossamento cellulare.

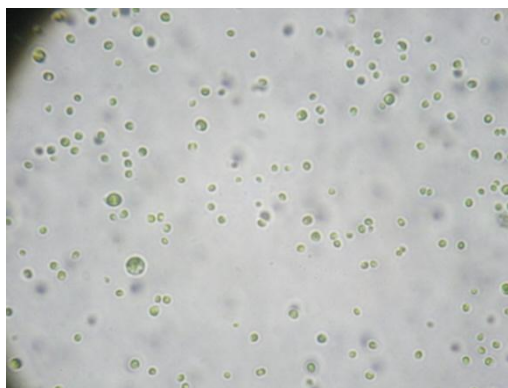


Figura 4: *H. pluvialis* osservato al microscopio durante gli esperimenti

Nella sua forma vegetativa verde l' *H. pluvialis*, presenta cellule a forma di pera con un diametro compreso tra gli 8 e i 50 μm ; la struttura cellulare è simile ad altre microalghe appartenenti al suo ordine: un cloroplasto che occupa il 50-75% del corpo cellulare con numerosi pirenoidi (corpi densi con funzione di riserva e di stoccaggio dell'enzima RuBiSco nelle microalghe fotosintetizzanti), vacuoli contrattili che sono spesso di forma irregolare e distribuiti vicini alla membrana cellulare, un nucleo e 2 flagelli (corpi filamentosi proteici che permettono la motilità della microalga in ambiente acquatico) di uguale lunghezza emergenti dalla porzione anteriore della cellula.

Nella sua forma non motile, chiamata aplanospora, la membrana cellulare subisce un'invaginazione distaccandosi dalla parete cellulare, e la cellula perde i flagelli. Quando le condizioni di crescita cambiano o diventano sfavorevoli, le cellule aumentano drasticamente il loro volume ed entrano in una fase di riposo (resting) in cui le cellule si contornano di una parete cellulare molto resistente, composta in parte da sostanze simili alle sporopollinina, una sostanza simile ad una plastica. Questo processo è chiamato incistamento.

Durante questa fase di crescita, la cellula si colora di giallo-arancione fino al rosso, dovuto all'accumulo di carotenoidi. Il crescente interesse nella coltivazione di questa alga come fonte alternativa di carotenoidi ha generato una serie di progetti di ricerca, come ad esempio il progetto “Large-scale Cultivation of *Haematococcus Pluvialis* and Product Quality Standards” della Chinese Academy of Sciences, che riguardano in gran parte l'ottimizzazione delle condizioni di crescita di grossi volumi di questo materiale biologico.

I fattori che portano all'accumulo di elevate concentrazioni di pigmenti vengono definiti come fattori “induttivi”, mentre quelli che mantengono l'alga nella sua forma vegetativa “verde” vengono definiti “non induttivi” (Boussiba, 1999).

Le condizioni induttive per l'accumulo di carotenoidi in *H. pluvialis* sono state intensamente studiate fino dagli anni '50 ma con risultati contraddittori, in particolare il ruolo della luce nella sintesi dei carotenoidi (Droop, 1955, Yong and Lee, 1991). È stato dimostrato che i pigmenti possono essere sintetizzati dall'alga in assenza di luce ma in presenza di sodio acetato come fonte di carbonio (Kobayashi *et al.*, 1992). Molte ipotesi sono state fatte per chiarire i requisiti dei nutrienti per l'accumulo di carotenoidi in *H. pluvialis*. Droop nel 1954 ha respinto l'ipotesi che il rapporto carbonio-azoto nel substrato di crescita determini il grado di formazione di carotenoidi, dimostrando che la carotenogenesi in *H. pluvialis* può essere indipendente dall'azoto libero disponibile, ma non dal supplemento di carbonio e dalla proliferazione cellulare che sembra precludere l'accumulo di carotenoidi. Nella maggior parte dei casi comunque, l'accumulo di carotenoidi era accompagnato dalla inibizione della divisione cellulare, concludendo che questo è una condizione imperativa per l'accumulo di pigmenti in questa microalga (Boussiba, 1999).

Funzioni biologiche dei carotenoidi prodotti da *H. pluvialis*

I principali carotenoidi prodotti da *H. pluvialis* possono essere ritrovati negli animali acquatici e sono presenti in moltissimi pesci come salmone, trote, gamberi, aragoste e uova di pesce (Guerin *et al.*, 2003). Nella maggior parte degli animali acquatici dove sono stati ritrovati, i carotenoidi prodotti da *H. pluvialis* hanno importanti funzioni biologiche che includono la protezione dallo stress ossidativo degli acidi grassi polinsaturi, protezione contro i danni causati dalla radiazione UV, risposta immunitaria, colorazione, con effetti connessi alla comunicazione e ai comportamenti riproduttivi. Colture commerciali di *H. pluvialis* possono accumulare fino a 30 grammi di carotenoidi per chilogrammo di biomassa secca. I carotenoidi che si ritrovano in questa microalga sono β -carotene, zeaxantina, luteina, astaxantina, i quali condividono la maggior parte delle funzioni metaboliche e fisiologiche attribuite a questa classe di composti (Guerin, 2003).

I radicali liberi, come ad esempio i radicali perossilici e idrossilici, sono specie altamente reattive dell'ossigeno, e vengono prodotte nelle cellule durante le normali reazioni metaboliche. Stress fisiologici, inquinamento atmosferico, fumo di sigaretta, esposizione ad agenti chimici o esposizione alla radiazione ultravioletta, possono scatenare la produzione di questi agenti radicalici (Papas, 1999). I radicali liberi possono danneggiare il DNA, le proteine e le membrane lipidiche. Carotenoidi assunti con la dieta possono migliorare la prevenzione e la lotta a importanti malattie. I carotenoidi sono potenti antiossidanti biologici capaci di assorbire l'energia di eccitazione dell'ossigeno singoletto all'interno della loro catena carboniosa grazie alla presenza di svariati doppi legami, molti dei quali coniugati tra di loro, portando alla degradazione della molecola carotenoide ma prevenendo il danno ad altre molecole importanti. Possono inoltre prevenire la reazione a catena che i radicali liberi provocano con la degradazione degli acidi grassi polinsaturi, e quindi prevenire la conseguente degradazione delle membrane lipidiche cellulari.

Tra i vari carotenoidi che *H. pluvialis* produce in condizioni di stress, l'astaxantina è quella che riveste l'importanza maggiore da un punto di vista biologico, dato che viene considerata dalla letteratura internazionale un ottimo agente di protezione delle membrane fosfolipidiche e di altri lipidi contro la perossidazione (Palozza e Krinsky, 1992; Naguib, 2000). L'attività antiossidante dell'astaxantina è stata dimostrata in numerosi studi. In alcuni casi, è stato osservato che l'astaxantina ha un effetto antiossidante contro i radicali liberi sette volte maggiore rispetto alla vitamina E e del β -carotene (Kurashige *et al.*, 1990; Shimidzu *et al.*, 1996).

Si ritiene che le proprietà antiossidanti dell'astaxantina abbiano un ruolo importante nella protezione contro la fotoossidazione dovuta all'esposizione della radiazione UV, contro le infiammazioni, contro l'invecchiamento e malattie correlate, o che promuova la risposta immunitaria, le funzioni epatiche e cardiache e che protegga gli occhi, soprattutto a livello della retina. L'esposizione dei tessuti e dei lipidi alla luce, specialmente alla luce ultravioletta, può portare alla produzione di ossigeno singoletto, radicali liberi e al danno fotoossidativo di tali molecole. I carotenoidi hanno un importante ruolo in natura nella protezione dei tessuti contro la radiazione UV e vengono spesso trovati nei tessuti direttamente esposti alla luce solare (Papas, 1999).

Ci sono numerose cause che portano ai problemi della vista, ma due di queste sono sicuramente la degenerazione maculare legata all'età (AMD) e la cataratta (Jacques, 1999). Entrambe queste malattie sembrano essere correlate all'ossidazione indotta dalla luce all'interno dell'occhio. Non deve sorprendere se i fattori collegati all'ossidazione siano stati mostrati in studi epidemiologici essere correlati con un elevato rischio di AMD. Un elevato supplemento di carotenoidi con la dieta, specificamente luteina e zeaxantina (dagli ortaggi a foglia verde), è associato con un ridotto rischio sia della cataratta sia della AMD. Luteina e zeaxantina, due carotenoidi intimamente correlati all'astaxantina, sono concentrati nella regione della macula dell'occhio. La struttura molecolare dell'astaxantina è molto simile a

quella di luteina e zeaxantina, ma possiede sia una maggiore attività antiossidante sia un potente effetto di protezione dalla radiazione UV (O'Connor e O'Brien, 1998). Uno studio sugli animali (Tso e Lam, 1996) ha dimostrato che l'astaxantina è capace di passare la barriera ematica e, come la luteina, di depositarsi nella retina. I fotorecettori retinali di ratti nutriti con astaxantina erano danneggiati in misura minore dalla radiazione UV e recuperavano più velocemente di animali che non erano stati nutriti con astaxantina. Concludendo, si può assumere che la deposizione di astaxantina nell'occhio potrebbe contribuire ad una protezione superiore contro la radiazione ultravioletta e l'ossidazione dei tessuti retinali, puntando così ad un potenziale uso dell'astaxantina per un buon mantenimento dell'occhio.

Nei mitocondri, le reazioni ossidative a catena generano l'energia di cui la cellula ha bisogno, ma producono un'elevata quantità di radicali liberi che devono essere neutralizzati per mantenere regolari le funzioni mitocondriali. È stato ipotizzato che il danno ossidativo cumulativo ai mitocondri è il principale motivo della senescenza cellulare, la quale è responsabile dell'invecchiamento (Gershon, 1999). È stato dimostrato che l'efficacia dell'astaxantina nella prevenzione della perossidazione in vitro dei mitocondri di cellule epatiche di ratto può arrivare fino a cento volte più elevata della vitamina E (Kurashige et al., 1990). Questo sottolinea la straordinaria capacità dell'astaxantina nell'aiutare a preservare le funzioni mitocondriali e quindi il suo potenziale ruolo contro l'invecchiamento.

Il ruolo dell'astaxantina nella protezione delle membrane cellulari deriva dalla sua abilità di proteggere sia le parti interne lipofile sia le superfici esterne idrofiliche delle membrane contro l'ossidazione (risultato dovuto alla sua struttura molecolare che irrigidisce le membrane modificando la loro permeabilità). Gli antiossidanti, ed in particolare i carotenoidi, non sono solamente essenziali per la salute cellulare perché aiutano a proteggere i compartimenti cellulari dal danno ossidativo, ma anche perché hanno un ruolo regolativo nell'espressione genica e nell'induzione della

comunicazione tra cellule (Allen e Tresini, 2000; Berttram, 1999). Anche i carotenoidi sono attivi induttori della comunicazione tra cellule, svolgendo la loro funzione negli spazi intracellulari, all'interno dei microtubuli pieni di acqua all'interfaccia tra due cellule vicine.

Un recente studio è stato condotto specificamente per esaminare gli effetti dell'integrazione nella dieta di astaxantina sulla salute dell'uomo (Mera Pharmaceuticals, 1999). In questo studio, trentatré adulti volontari sani sono stati nutriti con una dieta integrata con astaxantina per un periodo di ventinove giorni. Ciascun soggetto ha consumato giornalmente o 3,85 milligrammi di astaxantina (dose bassa) o 19,25 milligrammi (dose alta). I volontari furono sottoposti ad esami medici prima, durante e alla fine dello studio, evidenziando che non c'era nessun effetto di tossicità derivante dall'ingestione di astaxantina. Altri studi condotti dalla Mera Pharmaceuticals, supportano la conclusione che l'astaxantina estratta da *H. pluvialis* non ha nessun rischio per la salute umana ai dosaggi testati.

Un altro studio condotto dalla stessa azienda farmaceutica su consumatori di astaxantina di *H. pluvialis* commerciale ha indicato i numerosi benefici derivanti dall'integrazione della dieta con questo composto. Ai consumatori è stato chiesto di indicare tutte le condizioni per le quali sentivano una sofferenza, da una lista di condizioni di salute croniche o acute, e di ciascuna condizione di indicare se avevano osservato dei miglioramenti dovuti all'astaxantina. Inoltre, ai consumatori è stato chiesto di comparare l'efficacia dell'introduzione di astaxantina con quella di un noto prodotto antinfiammatorio commerciale.

Di ventisei comparazioni effettuate con antinfiammatori commerciali, l'astaxantina estratta da *Haematococcus* ha dimostrato di avere effetto, spesso anche un maggiore rispetto agli antinfiammatori prescritti praticamente in tutti i casi testati. Dei sessantadue confronti fatti con aspirina o ibuprofene, l'astaxantina ottenuta da *H. pluvialis* ha dimostrato di avere un effetto, spesso anche maggiore nel 75% dei casi. Concludendo, la grande percentuale delle risposte indicanti un

effetto positivo dell'integrazione della dieta con astaxantina estratta da *H. pluvialis* sulle condizioni di salute in caso di infiammazioni, fanno pensare a questo composto come ad un potenziale sostituto dei farmaci.

Carotenogenesi in *H. pluvialis*

L'inibizione della biosintesi dei carotenoidi con difenilammina (DPA) è stata osservata in batteri, funghi ed alghe. Questo fenomeno è stato osservato per primo nel batterio fotosintetico *Rhodospirillum rubrum* (Goodwin e Osman, 1953); inoltre, fu osservato un accumulo di fitoene usando 70 mM di DPA (Cohen-Bazie e Stainer, 1958).

Il modo di azione del DPA non è ancora chiaro; Boussiba (2000) ha ipotizzato che il DPA inibisca la trascrizione dei geni impiegati nel processo di carotenogenesi, la trascrizione dei relativi enzimi, o l'inattivazione di questi enzimi.

In *H. pluvialis*, l'aggiunta di basse concentrazioni (30 mM) di DPA ha inibito la conversione del β -carotene nei relativi carotenoidi (Lu et al, 1995). Questo evidenziò che l'aggiunta di DPA non aveva effetti deleteri sulla crescita, sul metabolismo, o sulla composizione dei carotenoidi in *H. pluvialis* in condizioni ottimali di crescita.

L'identificazione di una piccola quantità seppur significativa di echinenone e cantaxantina in *H. pluvialis* (Grung et al., 1992), ha condotto all'ipotesi che nelle alghe la via biosintetica dell'astaxantina è differente, dato che inizia con la cantaxantina. È stato dimostrato che l'inibizione della via biosintetica dell'astaxantina con il DPA è associata con un accumulo di β -carotene e una diminuzione di cantaxantina. I risultati di Boussiba et al. (2000) supportano questa ipotesi portando evidenze che i gruppi chetonici C-4 sono introdotti prima sul β -carotene. Tale conclusione è basata sulla rivelazione di una forte diminuzione nella concentrazione di cantaxantina in cellule trattate con DPA, mentre il β -carotene è l'unico carotenoide che viene accumulato in queste condizioni.

La via biosintetica dei carotenoidi è riportata nella Figura 5.

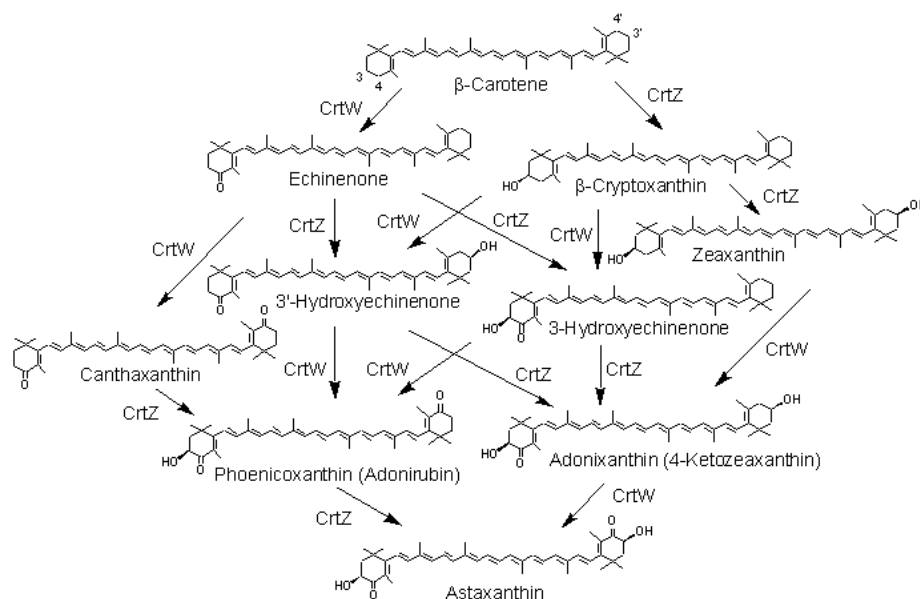


Figura 5: modello schematico della via biosintetica dell'astaxantina in *H. pluvialis*.

Fonte: <http://lipidbank.jp>

Cominciando dal geranilgeranil pirofosfato (non mostrato in Figura 5), la fitoene sintasi insieme ad altri tre enzimi, due desaturasi ed una ciclasi, sono coinvolti nella sintesi del β -carotene, il carotenoide più diffuso in natura. Questo carotenoide è il precursore della sintesi dell'astaxantina in batteri, funghi ed *H. pluvialis*. Le due rimanenti reazioni sono l'introduzione dei gruppi chetonici in posizione 4 e 4' come anche i gruppi idrossilici in posizione 3 e 3' alla molecola di β -carotene. I geni codificanti per le chetolasi che introducono i due gruppi chetonici sono rispettivamente una β -carotene ossigenasi batterica e una β -carotene chetolasi da *H. pluvialis*. Recentemente è stato dimostrato che la chetolasi di *H. pluvialis* riconosce solo il β -carotene ma non la zeaxantina. Comunque, l'idrolasi di *H. pluvialis* può usare la cantaxantina come substrato primario come l'enzima batterico. Quest'assunto è supportato dalle recenti ricerche in cui è dimostrato che la β -carotene idrolasi di *H. pluvialis* può convertire la cantaxantina in astaxantina. Questa nuova scoperta supporta la via biosintetica dell'astaxantina in *H. pluvialis* proposta sopra (Boussiba, 2000).

I pigmenti carotenoidi vengono sintetizzati nei cloroplasti di piante ed alghe. In questi organelli essi si accumulano nelle membrane

fotosintetiche in associazione con i *Light Harvesting Complex* e i *Reaction Centers*. Ricerche precedenti hanno rivelato la via biosintetica dell'astaxantina in *H. pluvialis*. Da questo, è stato suggerito che probabilmente i cloroplasti di *H. pluvialis* contengono un set di enzimi responsabili della biosintesi dei caroteni e di qualche xantofilla, incluso la β -carotene idrolasi, responsabile della conversione del β -carotene a zeaxantina. Comunque, gli enzimi responsabili dell'ossigenazione del β -carotene a cantaxantina e l'idrossilazione ad astaxantina non sono stati ancora localizzati con certezza (Boussiba, 2000). Questo è di particolare interesse come i pigmenti accumulati nel citoplasma fuori dal cloroplasto. Dall'addizione del gruppo chetonico precedente l'idrossilazione, un sito extraplastidico per la chetolasi potrebbe comportare una localizzazione esterna al cloroplasto per l'idrolasi. Si sta tentando di postulare che in *H. pluvialis* ci siano due siti per la sintesi dei carotenoidi. Uno è responsabile per la sintesi di alcuni caroteni e xantofille coinvolti nei centri di reazione e nel ciclo delle xantofille localizzati nel cloroplasto. Un secondo sito contiene un altro set di enzimi o loro precursori presenti nel citoplasma nella loro forma latente, aspettando la loro attivazione dalle specie reattive dell'ossigeno quando *H. pluvialis* è sottoposto a stress ambientali. Questo suggerimento è parzialmente supportato dal fatto che l'accumulo di astaxantina non richiede la sintesi di nuove proteine.

Il melasso da barbabietola come substrato di crescita

La crescente domanda di prodotti naturali ha portato ad individuare quale fosse il substrato migliore per la crescita delle microalghe, ottimizzando i costi di produzione delle sostanze di interesse. Ad oggi l'attenzione si è spinta sulla scelta di Sali organici e inorganici utilizzati in agricoltura (grado di purezza inferiore a quelli di laboratorio), ma sempre più importanza sta prendendo l'impiego di scarti della lavorazione di materie prime vegetali come substrati carboniosi per la crescita del materiale biologico.

Il melasso è uno dei sottoprodotti della lavorazione della barbabietola da zucchero: corrisponde all'acqua madre residua dopo l'estrazione dello zucchero dal sugo di barbabietola. Il melasso è quindi costituito da tutte le sostanze non zuccherine presenti nel sugo e da zucchero residuo non più cristallizzabile nei processi ordinari di zuccherificio. Si presenta come un fluido viscoso, consistente e di colore bruno rossiccio, come mostrato in Figura 6.



Figura 6: aspetto e consistenza del melasso da barbabietola

Il melasso da barbabietola trova usualmente impiego come integratore della razione zootecnica o come materiale co-fermentante all'interno di digestori anaerobici.

Recentemente, l'uso dei materiali di scarto provenienti dall'agricoltura, come il melasso da barbabietola, ha trovato impiego come substrato carbonioso nella crescita di materiale biologico, nella fattispecie microalghe fotosintetizzanti in condizioni di mixotrofia e lieviti oleaginosi, sia per l'estrazione di lipidi per la produzione di biocarburanti, sia il perfezionamento di molecole lipofile con attività benefica per l'uomo (Sharma *et al.*, 2011).

Andrade e Costa nel 2007, hanno provato a stimolare la crescita della microalga *Spirulina platensis* aggiungendo melasso da barbabietola al substrato di crescita. Essi notarono che la concentrazione del melasso era il principale fattore che influenzava la concentrazione massima di biomassa ed il massimo tasso di crescita specifico. Conducendo delle prove in parallelo tra la condizione mixotrofica con il melasso e la condizione autotrofica con la sola luce, i due ricercatori conclusero che la maggior produzione di biomassa si

aveva proprio con l'aggiunta di melasso, confermando così che questo sottoprodotto dell'industria saccarifera è una valida alternativa a basso costo per la crescita di grandi quantità di microalghe.

Ankerstjerne et al. nel 2005, hanno sperimentato la crescita eterotrofica per l'estrazione di ficocianina della microalga rossa *Galdieria sulphuraria*, in condizioni di buio con l'aggiunta di glucosio, fruttosio e melasso da barbabietola. Essi si resero conto che il tasso di crescita, la quantità di biomassa ed anche la quantità di ficocianina erano più alti quando veniva usato il melasso come substrato carbonioso invece che i due zuccheri semplici. In questo modo, venne quindi dimostrato che questa microalga, utilizzando il melasso come substrato di crescita, poteva essere un'alternativa per l'estrazione a basso costo della ficocianina.

SCOPO DEL LAVORO

Il presente lavoro vuole investigare la possibilità di utilizzare un sottoprodotto della lavorazione della barbabietola da zucchero, nello specifico il melasso da barbabietola, come substrato carbonioso per la crescita ed il conseguente accumulo di carotenoidi in *H. pluvialis*. L'obiettivo principale di questo lavoro di tesi è stato quello di studiare la fattibilità, in termini di utilizzazione, del melasso da barbabietola per la produzione di biomassa della microalga fotosintetizzante *Haematococcus pluvialis*; ulteriore parametro per la valutazione della crescita della microalga in questo substrato è stata l'estrazione e la quantificazione dei carotenoidi prodotti, focalizzandosi su quelli noti per la loro capacità antiossidante.

Caratteristica primaria dei carotenoidi, composti con riconosciuta attività antiossidante, antibatterica, antinfiammatoria, anticancerogena e antilipidemica, come già discusso nei precedenti capitoli di questo lavoro di tesi, è quella di avere un ruolo nutrizionale con benefici sulla salute che possono essere raggiunti attraverso un loro utilizzo a lungo termine nell'alimentazione.

Lo studio che ha portato alla stesura di questo lavoro di tesi ha riguardato sia il confronto delle colture *in vitro* ottenute con il substrato da laboratorio BG11 (*vedi infra*), con quelle ottenute con diverse concentrazioni di melasso da barbabietola, sia la capacità di accumulare carotenoidi.

Le microalghe offrono una elevata quantità di materiale da cui estrarre i principi attivi utili, in questo caso i carotenoidi. Verranno inoltre valutati i costi dei differenti substrati di crescita; verrà quindi valutato l'impatto dell'utilizzazione del melasso da barbabietola nei confronti del substrato BG11.

Obiettivo principale di questo lavoro di tesi è quello di utilizzare il melasso da barbabietola come substrato carbonioso per la crescita di un particolare tipo di microalga, *H. pluvialis*, riconosciuto dalla comunità scientifica e commerciale come una fonte ricca di

carotenoidi antiossidanti, già coltivato industrialmente in tutto il mondo, come ad esempio dalla azienda israeliana AlgaTechnologies, che sfrutta un fotobioreattore tubulare per la crescita.

L' *H. pluvialis* è una specie algale di interesse nutraceutico soprattutto per il suo elevato contenuto di astaxantina, pigmento rosso che si sviluppa in determinate condizioni di stress.

Per *H. pluvialis* sono state valutate le colture cellulari sia con substrato “classico” di laboratorio sia con melasso da barbabietola in più concentrazioni, in abbinamento a nitrato di sodio e solfato di magnesio eptaidrato, di purezza inferiore a quelli di laboratorio; inoltre sono state effettuate indagini sulle diversità macroscopiche (colore, forma e dimensione) delle cellule delle colture con le diverse concentrazioni di melasso da barbabietola e delle colture di BG11.

Sono state inoltre svolte anche analisi di tipo chimico, in particolare analisi in HPLC, per l'identificazione e la quantificazione dei carotenoidi estratti dalle diverse colture di *H. pluvialis*, in modo da valutare se l'utilizzo del melasso da barbabietola possa costituire un'alternativa ai substrati di *H. pluvialis* solitamente citati in letteratura.

Inoltre, sono stati valutati i costi dell'utilizzo del melasso da barbabietola su un ipotetico impianto da 1000 litri di substrato di crescita algale, confrontando sulla carta i costi dell'utilizzo di una classica miscela di sali da laboratorio e quello innovativo con il melasso da barbabietola.

Tale esperienza è stata svolta presso il CNR, Istituto di Cristallografia UOS Monterotondo Scalo, Area della Ricerca di Roma 1, sotto la supervisione del Dott. Andrea Margonelli.

MATERIALI E METODI

Costituzione delle colture cellulari di *H. pluvisialis*

Haematococcus pluvisialis Flotow, proveniente dall'Università di Ben Gurion, Israele, è stato fatto crescere nel substrato liquido da laboratorio BG11, la cui composizione per un litro di substrato è riportata nella seguente Tabella 4.

REAGENTE	QUANTITA' (g)
NaNO ₃	150
MgSO ₄ *7H ₂ O	7.5
CaCl ₂ *2H ₂ O	3.6
Acido citrico	0.6
H ₃ BO ₃	2.86
MnCl ₂ *4H ₂ O	1.81
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0.222
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0.39
CuSO ₄ *5H ₂ O	0.079

Tabella 4: composizione substrato BG11

Questa coltura è stata chiamata HP1 ed è stata considerata la coltura “madre”, da utilizzare sia come coltura per i successivi inoculi, sia come coltura di riferimento rispetto a tutte le altre prove.

Sono state utilizzate le seguenti condizioni di crescita: agitazione 130 rpm, temperatura 26°C, luce rossa 650 nm, intensità luminosa 55 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{sec}^{-1}$. La crescita cellulare è stata monitorata giorno per giorno con il contacellule automatico Biorad TC10 Counter Cell, (Figura 7 sx). Sono state inoltre scattate, sulla stessa coltura, delle fotografie con un microscopio ottico (Figura 7 dx), con ingrandimento 40X, accoppiato ad una macchina fotografica con zoom digitale 12X.



Figura 7:
sx) conta cellule automatico TC10 Biorad. **dx)** microscopio ottico usato per fotografare le colture

Costituzione delle colture cellulari con melasso da barbabietola e sali inorganici

Giunta ad una concentrazione media di cellule di $8.3 \cdot 10^5$ cell/ml, misurata con il conta cellule Biorad TC10, un'aliquota di 10 ml della coltura HP1 è stata utilizzata come inoculo sia in 100 ml finali di BG11 sia in 100 ml finali dei substrati di crescita contenenti diverse concentrazioni di melasso da barbabietola, mantenendo invece costante la concentrazione di NaNO_3 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, entrambi alla concentrazione finale di 1.0 g/l.

Il melasso da barbabietola è stato preparato diluendo 1000 g di melasso in 1000 ml di soluzione finale utilizzando acqua deionizzata. Le due soluzioni dei Sali inorganici sono state preparate sciogliendo i Sali in acqua deionizzata, ottenendo rispettivamente le concentrazioni stock di 100 g/l di nitrato di sodio e di solfato di magnesio eptaidrato, trascurando la variazione di volume. Tutte e tre le soluzioni così ottenute sono state sottoposte a sterilizzazione in autoclave a 120 °C per 21 minuti ed utilizzate sotto cappa biologica sterile per evitare contaminazioni.

Per ciascuna concentrazione di melasso sono state effettuate due prove, così da avere un duplicato tecnico della prova.

La Tabella 5 riportata di seguito riassume le concentrazioni finali delle diverse prove eseguite.

PROVA	MELASSO DA BARBABIETOLA (g/l)	SALI INORGANICI (1.0 g/l)
HP2	0.1	NaNO ₃
HP3		
HP4	0.3	
HP5		
HP6	0.5	
HP7		
HP8	0.8	
HP9		
HP10	1.0	
HP11		
HP12	1.3	MgSO ₄ *7H ₂ O
HP13		
HP14	1.5	
HP15		
HP16	2.0	
HP17		

Tabella 5: riassunto delle prove con melasso da barbabietola e Sali inorganici

Le condizioni di crescita erano le seguenti: agitazione 130 rpm, temperatura 26°C, luce rossa 650 nm, intensità luminosa 55 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{sec}^{-1}$. La crescita è stata monitorata giorno per giorno con il contacellule automatico Biorad TC10. Sono state fatte delle fotografie con un microscopio ottico con ingrandimento 40X, accoppiato ad una macchina fotografica con zoom digitale 12X.

Trattamento campioni per estrazione dei carotenoidi

Dopo sette giorni dall'inoculo iniziale, un'aliquota di 10 ml di ciascuna coltura di *H. pluvialis* con melasso, compresa la coltura denominata HP1, è stata prelevata, centrifugata per 10 minuti a 3500 rpm e 4°C; il soprannatante è stato scartato ed il pellet è stato lavato aggiungendo 1 ml di acqua deionizzata e centrifugando tutte le volte per eliminare ogni residuo dei componenti dei substrati. Alla fine dei lavaggi, le eppendorf, precedentemente pesate, contenenti le diverse prove, sono state sottoposte a liofilizzazione.

Nella Tabella 6 seguente sono riportate le tare di ciascuna prova.

PROVA	PESO TARA (g)
HP1	1,1072
HP2	1,1058
HP3	1,1074
HP4	1,1065
HP5	1,0971
HP6	1,1078
HP7	1,1019
HP8	1,1006
HP9	1,1104
HP10	1,1029
HP11	1,1095
HP12	1,1014
HP13	1,1124
HP14	1,0989
HP15	1,1073
HP16	1,0985
HP17	1,1016

Tabella 6: tare delle eppendorf prima della liofilizzazione dei campioni

Dopo la liofilizzazione, le eppendorf contenenti i campioni secchi, sono stati nuovamente pesati e il risultato ottenuto dalla sottrazione del peso lordo con la tara ha permesso di ottenere il peso netto del campione liofilizzato (Tabella 7).

PROVA	PESO NETTO (g)
HP1	0,0291
HP2	0,0058
HP3	0,0016
HP4	0,0094
HP5	0,0019
HP6	0,0139
HP7	0,0054
HP8	0,0253
HP9	0,0074
HP10	0,0200
HP11	0,0230
HP12	0,0340
HP13	0,0073
HP14	0,0123
HP15	0,0125
HP16	0,0238
HP17	0,0241

Tabella 7: pesi netti dei campioni liofilizzati

Noto il peso netto dei campioni liofilizzati, si è proceduto con l'estrazione dei carotenoidi per l'analisi HPLC.

Il protocollo di estrazione adottato ha previsto la reidratazione dei campioni con 1.5 ml di acqua deionizzata; i campioni sono stati messi su agitatore orbitale a 4° per una notte, al buio ed al riparo dalla luce. Il giorno seguente è stata eseguita la procedura di estrazione, mantenendo i campioni in ghiaccio ed al riparo dalla luce diretta. I campioni sono stati centrifugati a 3500 rpm, 4°C per 10 minuti ed il sopranatante è stato scartato. Successivamente, ai campioni è stato aggiunto 1.0 ml di acetone 100% ghiacciato ed una piccola quantità di bicarbonato di sodio anidro e sottoposti a bagnetto ad ultrasuoni, contenente acqua ghiacciata, per 5 minuti, in presenza di ghiaccio fondente. La miscela di estrazione, contenente particolato cellulare e di colore verde, è stata quindi centrifugata a 3500 rpm, 15 minuti, 4°C, ed il sopranatante trasparente di colore verde brillante, è stato recuperato e conservato in frigorifero al riparo dalla luce.

La scelta del solvente di estrazione è stata una parte essenziale della procedura di estrazione, in quanto questo può determinare sia la quantità sia la qualità dei pigmenti estratti. L'acetone è un ottimo solvente di estrazione perché capace di estrarre composti lipofilici come gli antiossidanti a catena lunga (> di 30 C). Il bicarbonato di sodio anidro ha svolto due effetti: coadiuvare nella rottura meccanica delle cellule e disidratare l'acetone dall'acqua che viene dalla rottura delle cellule, eliminando contemporaneamente, per le sue caratteristiche basiche, i composti acidi che si possono liberare dalla rottura delle cellule e quindi rendere trascurabile l'isomerizzazione e la degradazione dei pigmenti molto più forte in ambiente acido acquoso.

Il trattamento di estrazione con acetone/bagno ad ultrasuoni è stato ripetuto fino a che il sopranatante si presentava di un verde pallido, quasi incolore; sono stati necessari 4 passaggi di estrazione e recupero del sopranatante prima di avere la certezza di una estrazione esaustiva.

I vari sopranatanti così ottenuti e recuperati, sono stati riuniti in un'unica soluzione e conservati sempre in frigorifero, al riparo dalla luce.

Ciascun campione così ottenuto, è stato quindi portato a secco sotto flusso di azoto (N₂) e successivamente conservato in congelatore a -20°C al buio prima di essere utilizzato per l'analisi HPLC.

Determinazione cromatografica del contenuto di carotenoidi

La cromatografia liquida è senza dubbio la più usata tra le tecniche di separazioni analitiche. Le ragioni della popolarità di questo metodo analitico sono la sua sensibilità, la sua pronta adattabilità a determinazioni quantitative accurate, la sua facilità di automazione, l'opportunità che essa offre di separare specie non volatili o termicamente labili e, soprattutto, la sua estrema applicabilità a sostanze importanti per l'industria, per molti campi della scienza e della vita quotidiana.

Per la determinazione dei carotenoidi di nostro interesse quali astaxantina, violaxantina, antheraxantina, zeaxantina e luteina si è scelto quindi di utilizzare la tecnica della cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC), impiegando un apparecchio Shimadzu PAD 20AD,(Figura 8 sx), con due pompe ed un auto campionatore. La rivelazione ed il riconoscimento sono stati eseguiti utilizzando un rivelatore DAD (Diode Array Detector) ed uno spettrometro di massa in linea, sempre della Shimadzu. La separazione dei composti è stata fatta utilizzando una colonna a fase inversa Phenomenex C30 COMBI-RP (Figura 8 dx), le cui dimensioni erano 50 x 4.6 mm, con una dimensione delle particelle interne di 5 µm.



Figura 8: sx) strumento HPLC usato per le analisi; **dx)** colonna usata per la separazione cromatografica

I solventi utilizzati sono stati: acqua (per HPLC – SIGMA), metanolo (MeOH), acetonitrile (ACN), diclorometano di grado ultrapuro (SIGMA, Germania); violaxantina, anteraxantina, zeaxantina erano DCM, (Germania), stocks già preparati a concentrazioni note, mentre la luteina (chiamata xantofilla) era Sigma Aldrich.

L'analisi HPLC è stata condotta utilizzando le seguenti fasi mobili: (A) 84:14:2 (v/v/v) metanolo:acetonitrile:acqua; (B) diclorometano 100%. I campioni portati a secco sono stati solubilizzati in metanolo puro per l'iniezione in HPLC.

Le corse sono state effettuate utilizzando un gradiente a step come descritto di seguito. Ogni singolo step di gradiente era lineare.

- Condizione iniziale: 100% solvente A, 0% solvente B
- $t = 0 - 10$ min: 100% solvente A, 0% solvente B
- $t = 10 - 20$ min: 95% solvente A; 5% solvente B;
- $t = 20 - 30$ min: 95 % solvente A ; 5 % solvente B ;
- $t = 30 - 45$ min: 80 % solvente A ; 20 % solvente B,
- $t = 45 - 55$ min: 50% solvente A, 50% solvente B;
- $t = 60 - 67$ min: 100% solvente A ; 0 % solvente B

La temperature della colonna è stata mantenuta a 20°C per tutte le analisi, mentre la temperatura dell'autocampionatore è stata mantenuta a 18°C; il flusso di fase mobile è stato mantenuto a 0,2 ml/min, il volume di iniezione era di 10 μ l. I carotenoidi di interesse

sono stati identificati dalla loro traccia UV seguita da un DAD Shimadzu (integrato con lo strumento HPLC); l'identificazione è stata poi confermata dal contemporaneo spettro di massa.

Ciascun campione è stato analizzato in triplicato.

L'identificazione dei pigmenti è stata condotta confrontando i tempi di ritenzione dei campioni con quelli degli standard iniettati precedentemente, usando una curva di calibrazione con un $R^2 = 95\%$. I parametri caratteristici del metodo HPLC sviluppato e gli appropriati tempi di ritenzione per ciascun standard sono descritti nella Tabella 8 di seguito.

STANDARD ANALITA	ABBREVIAZIONE	TEMPO DI RITENZIONE (min)
ASTAXANTINA	ASTA	18.15
VIOLAXANTINA	VIOLA	11.88
LUTEINA	LUT	23.58
ZEAXANTINA	ZEA	25.93
ANTERAXANTINA	ANT	17.27

Tabella 8: tempi di ritenzione degli standard impiegati nell'analisi HPLC.

RISULTATI

Allestimento delle colture cellulari di *H. pluvialis*

Il monitoraggio delle diverse colture cellulari di *H. pluvialis*, sia la coltura “madre” nel substrato BG11, sia le colture con le varie concentrazioni di melasso da barbabietola, è stato condotto per 7 giorni consecutivi. Di seguito si riporta nella Figura 9 il confronto della crescita tra *H. pluvialis* cresciuto in BG11 e nelle varie concentrazioni di melasso da barbabietola. Ogni punto della curva è la media del duplicato tecnico di ogni esperimento.

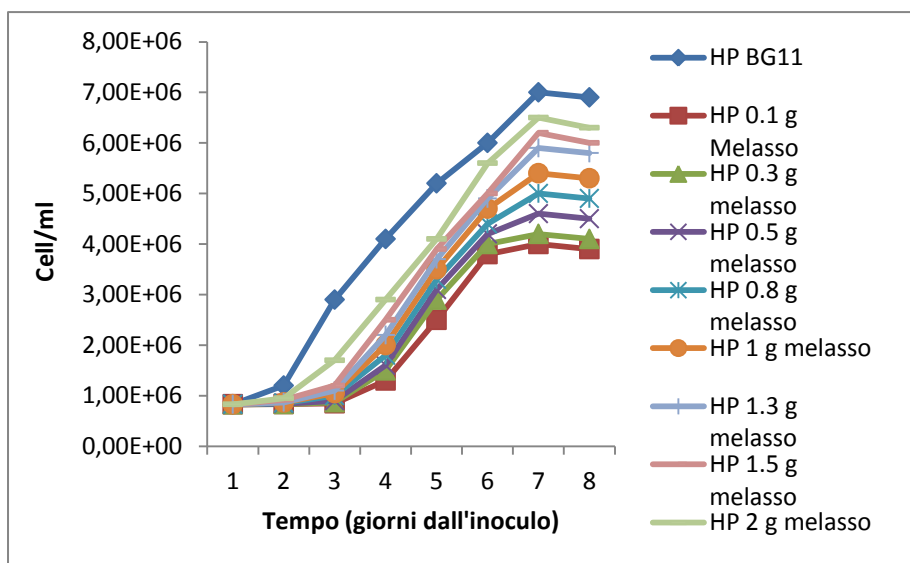


Figura 9: confronto tra le varie curve di crescita di *H. pluvialis*

Come si evince dal grafico, la crescita in BG11 è maggiore rispetto alle prove condotte con il melasso da barbabietola; è stata però ottenuta una forte analogia tra questa prova e quella condotta con 2.0 g/l di melasso da barbabietola, 1.0 g/l di nitrato di sodio e 1.0 g/l di solfato di magnesio eptaidrato.

Durante il periodo di valutazione della conta delle cellule sono state fatte anche delle fotografie per osservare se ci fossero dei cambiamenti conformazionali o di dimensione tra le cellule nei vari substrati. È stata notata una differenza significativa nella dimensione delle cellule: le cellule cresciute in melasso alla concentrazione di 2.0 g/l arrivavano ad essere 1.5/1.8 volte più grandi di quelle cresciute in BG11.

La Figura 10 mostra la crescita di *H. pluvialis* in BG11 dopo 1, 3 e 7 giorni di trattamento.

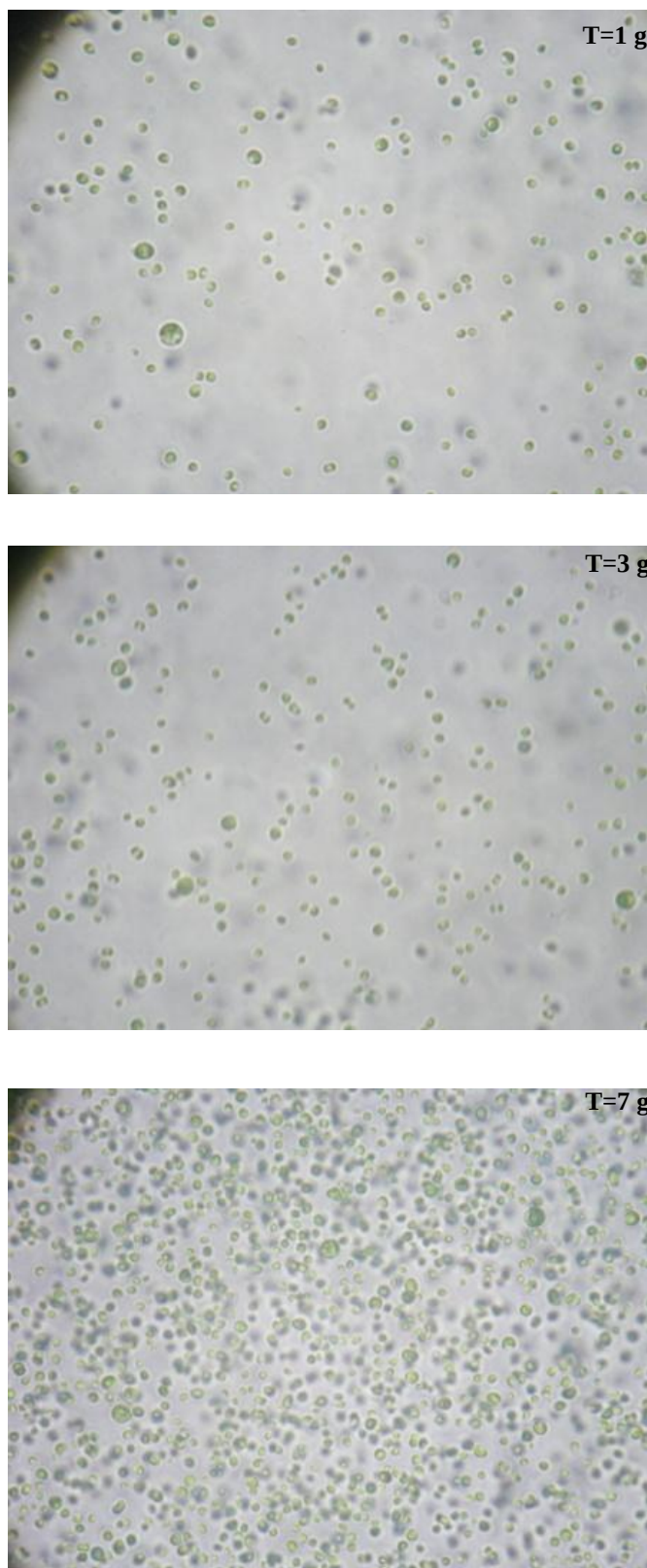


Figura 10: cellule di *H. pluvialis* in BG 11

La Figura 11 mostra la crescita cellulare di *H. pluvialis* nel substrato contenente 0.1 g/l di melasso da barbabietola e 1.0 g/l rispettivamente di solfato di magnesio eptaidrato e nitrato di sodio.

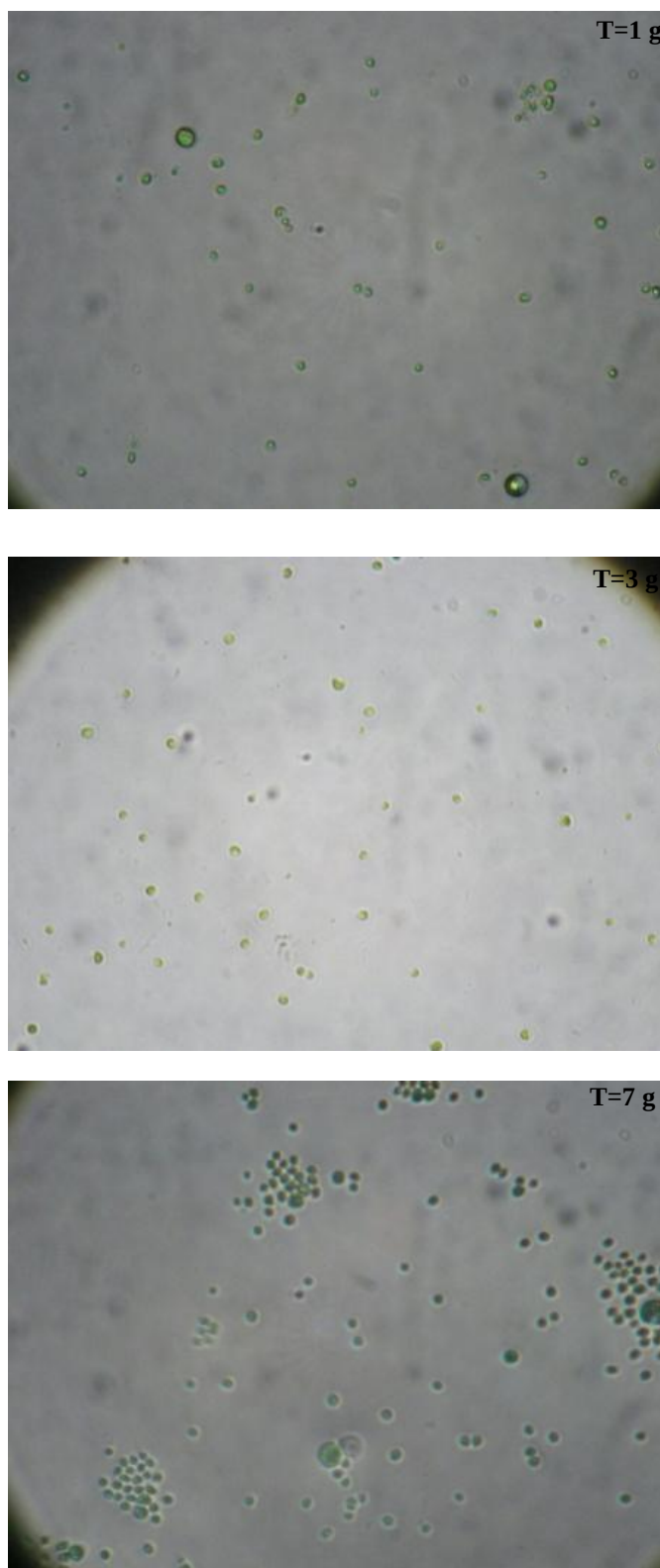


Figura 11: cellule di *H. pluvialis* in 0.1 g/l di melasso, 1.0 g/l di nitrato di sodio e magnesio solfato eptaidrato

La Figura 12 mostra la crescita cellulare di *H. pluvialis* nel substrato contenente 0.3 g/l di melasso da barbabietola e 1.0 g/l rispettivamente di solfato di magnesio eptaidrato e nitrato di sodio

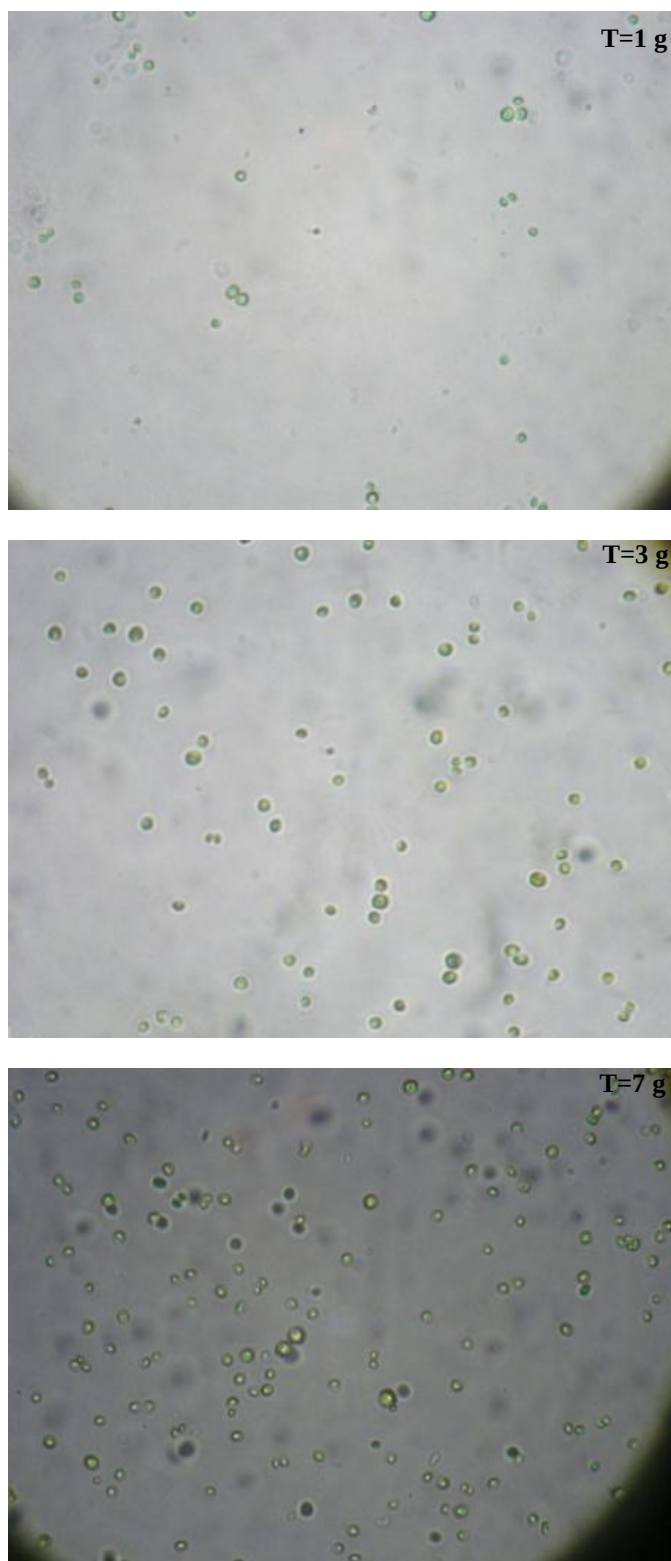


Figura 12: cellule di *H. pluvialis* in 0.3 g/l di melasso, 1.0 g/l di nitrato di sodio e magnesio solfato eptaidrato.

La Figura 13 mostra la crescita cellulare di *H. pluvialis* nel substrato contenente 0.5 g/l di melasso da barbabietola e 1.0 g/l rispettivamente di solfato di magnesio eptaidrato e nitrato di sodio

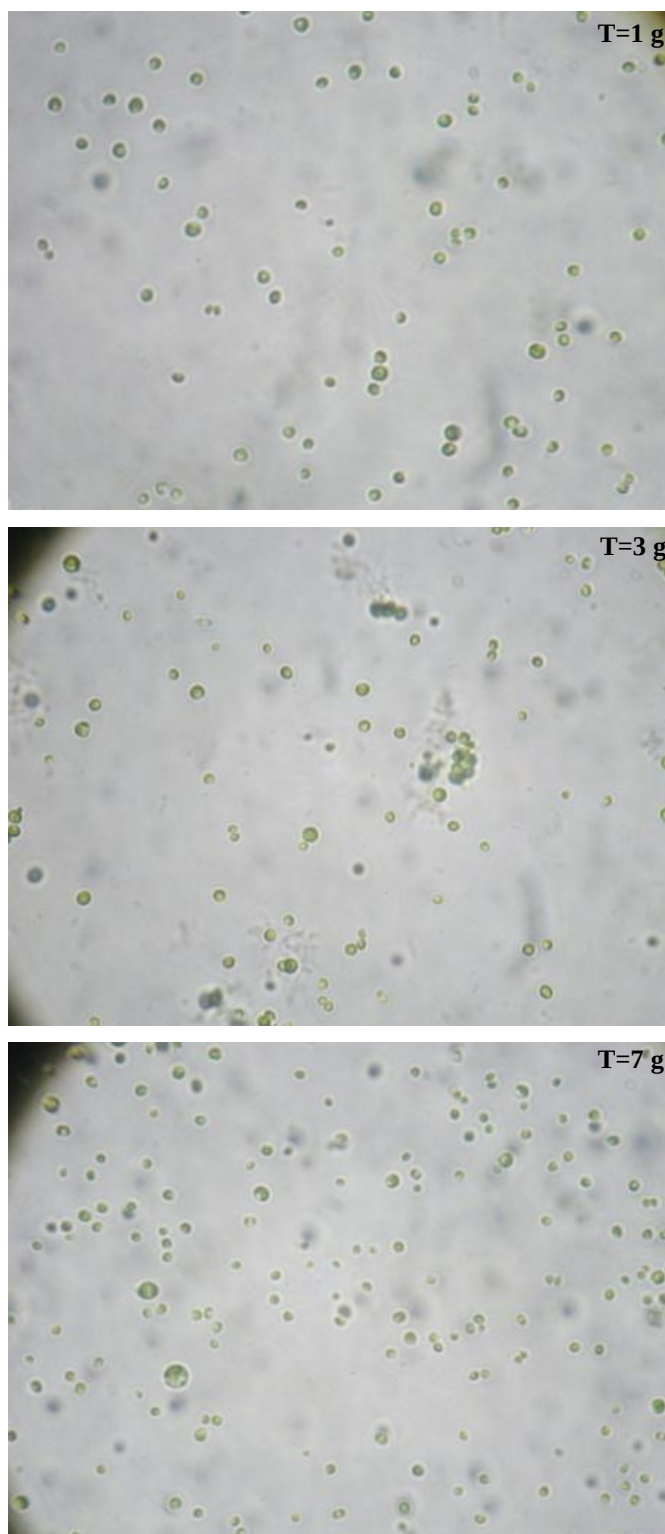


Figura 13: cellule di *H. pluvialis* in 0.5 g/l di melasso, 1.0 g/l di nitrato di sodio e magnesio solfato eptaidrato.

La Figura 14 mostra la crescita cellulare di *H. pluvialis* nel substrato contenente 0.8 g/l di melasso da barbabietola e 1.0 g/l rispettivamente di solfato di magnesio eptaidrato e nitrato di sodio

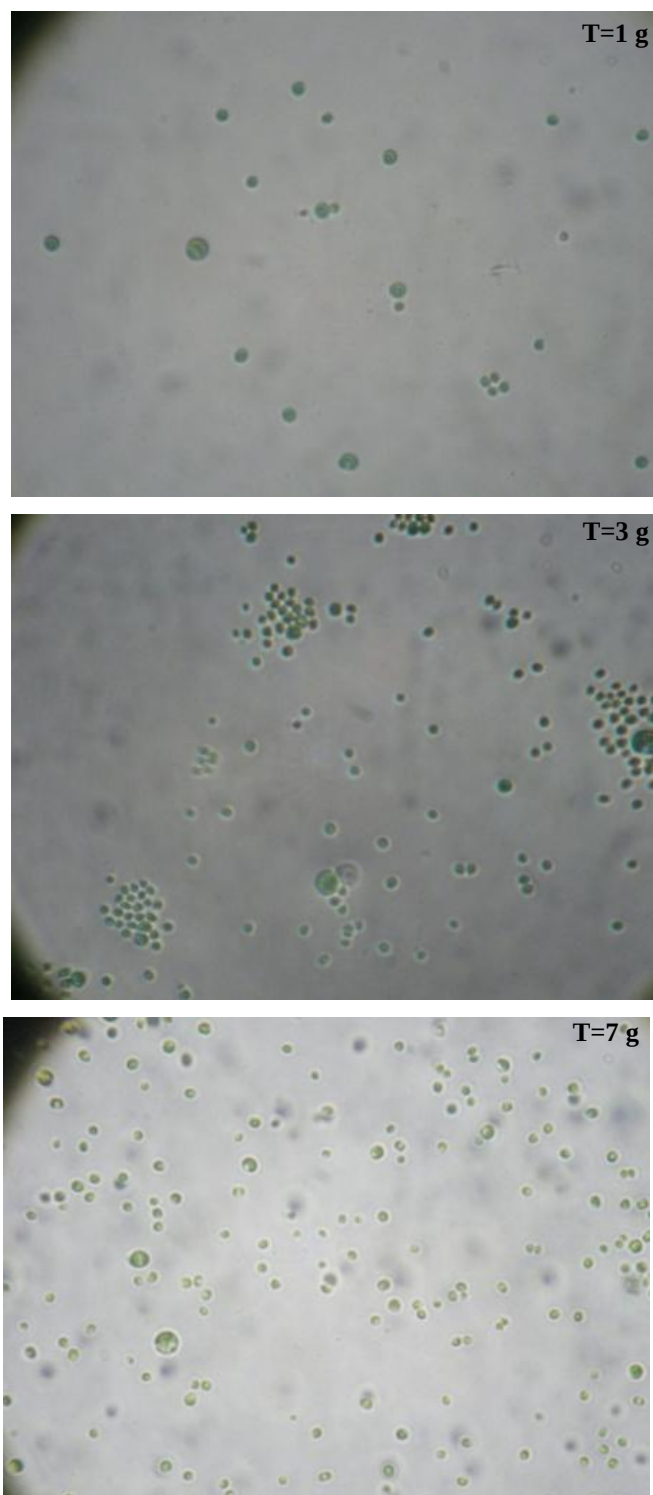


Figura 14: cellule di *H. pluvialis* in 0.8 g/l di melasso, 1.0 g/l di nitrato di sodio e magnesio solfato eptaidrato.

La Figura 15 mostra la crescita cellulare di *H. pluvialis* nel substrato contenente 1.0 g/l di melasso da barbabietola e 1.0 g/l rispettivamente di solfato di magnesio eptaidrato e nitrato di sodio

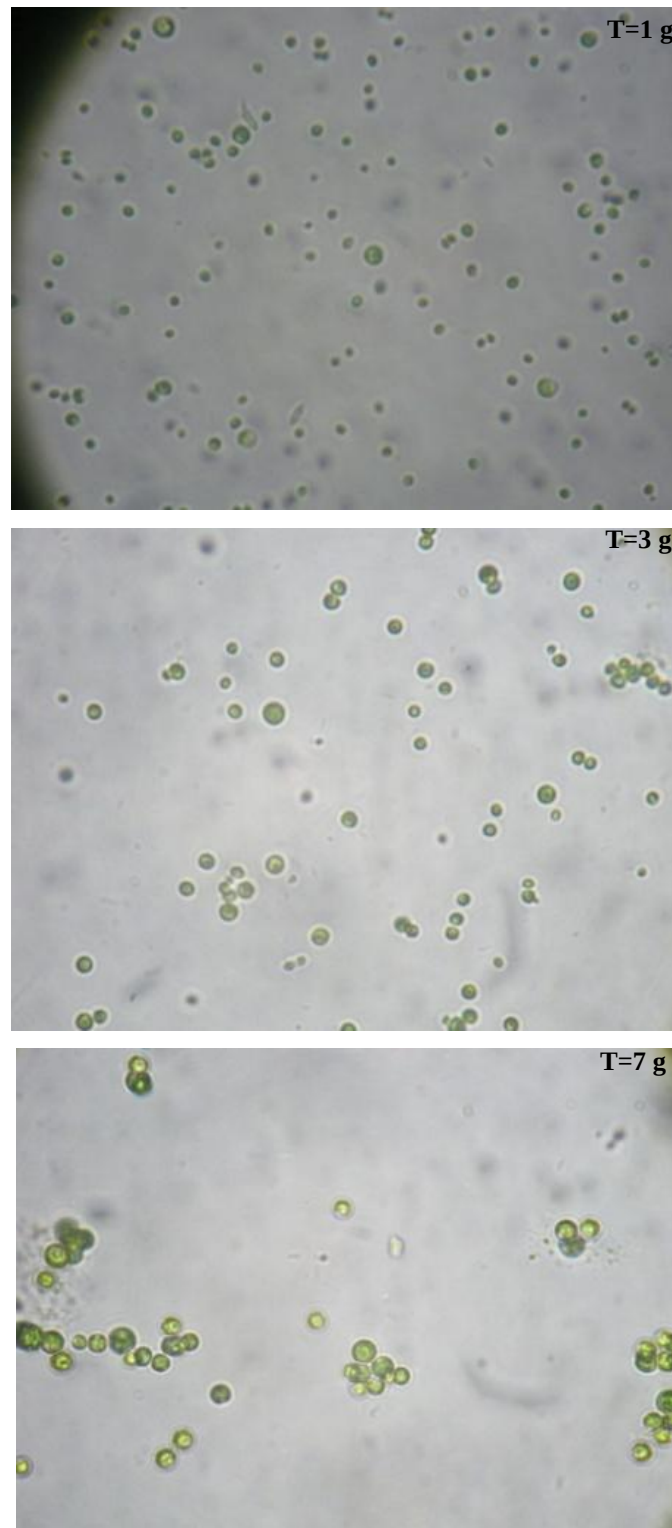


Figura 15: cellule di *H. pluvialis* in 1.0 g/l di melasso, 1.0 g/l di nitrato di sodio e magnesio solfato eptaidrato.

La Figura 16 mostra la crescita cellulare di *H. pluvialis* nel substrato contenente 1.3 g/l di melasso da barbabietola e 1.0 g/l rispettivamente di solfato di magnesio eptaidrato e nitrato di sodio

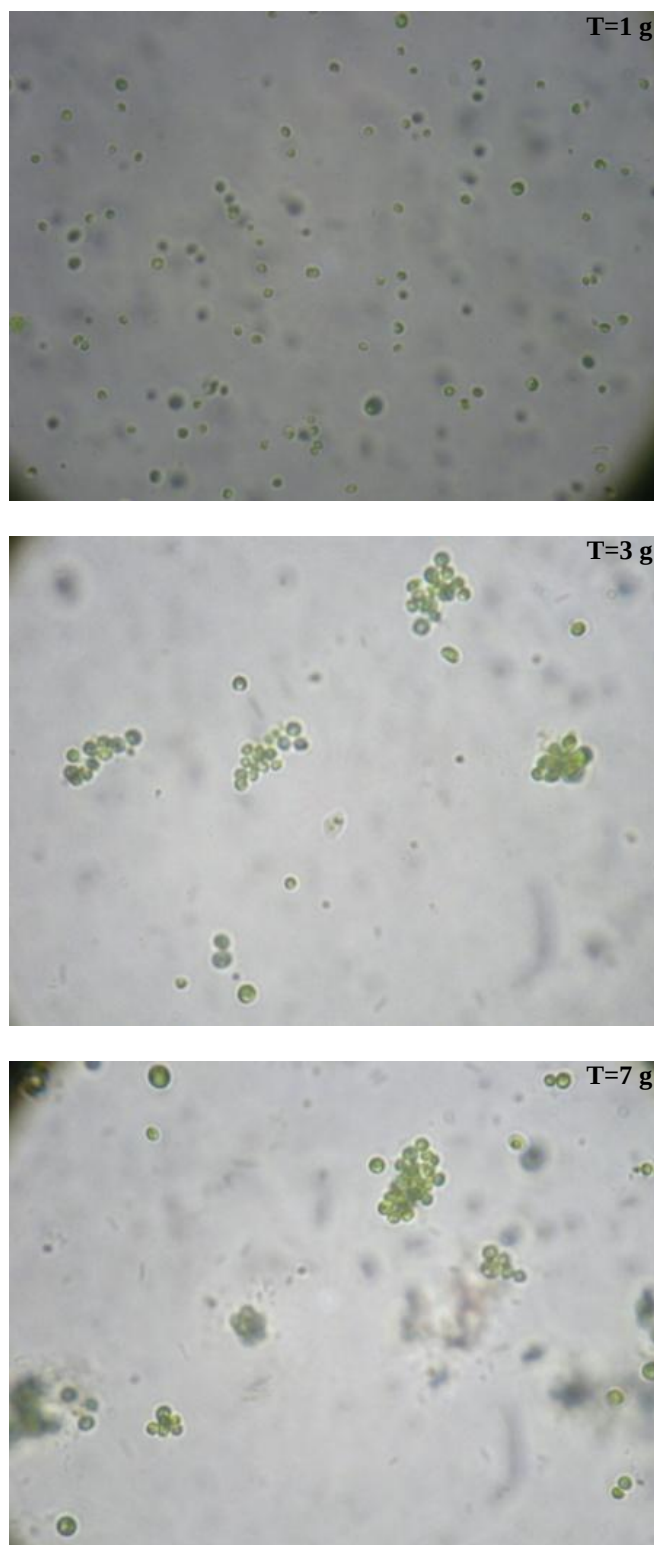


Figura 16: cellule di *H. pluvialis* in 1.3 g/l di melasso, 1.0 g/l di nitrato di sodio e magnesio solfato eptaidrato.

La Figura 17 mostra la crescita cellulare di *H. pluvialis* nel substrato contenente 1.5 g/l di melasso da barbabietola e 1.0 g/l rispettivamente di solfato di magnesio eptaidrato e nitrato di sodio

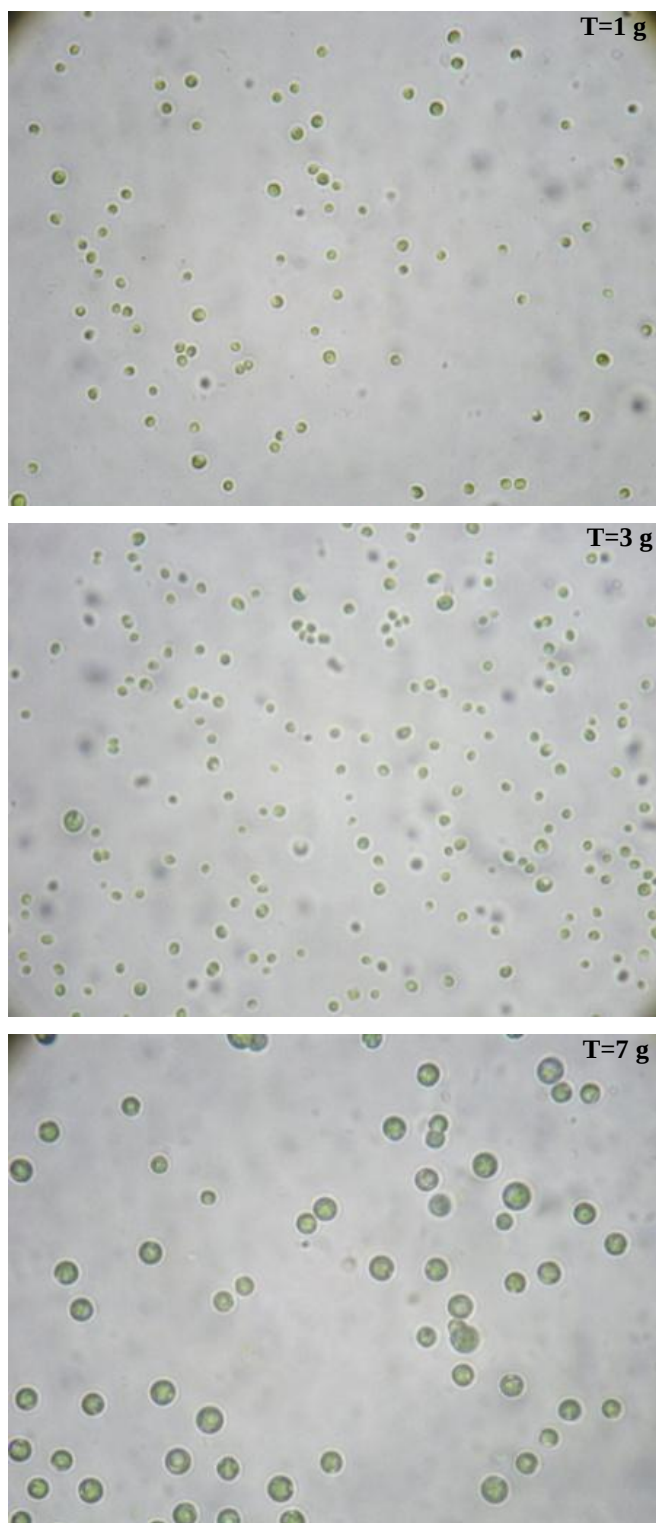


Figura 17: cellule di *H. pluvialis* in 1.5 g/l di melasso, 1.0 g/l di nitrato di sodio e magnesio solfato eptaidrato.

La Figura 18 mostra la crescita cellulare di *H. pluvialis* nel substrato contenente 2.0 g/l di melasso da barbabietola e 1.0 g/l rispettivamente di solfato di magnesio eptaidrato e nitrato di sodio

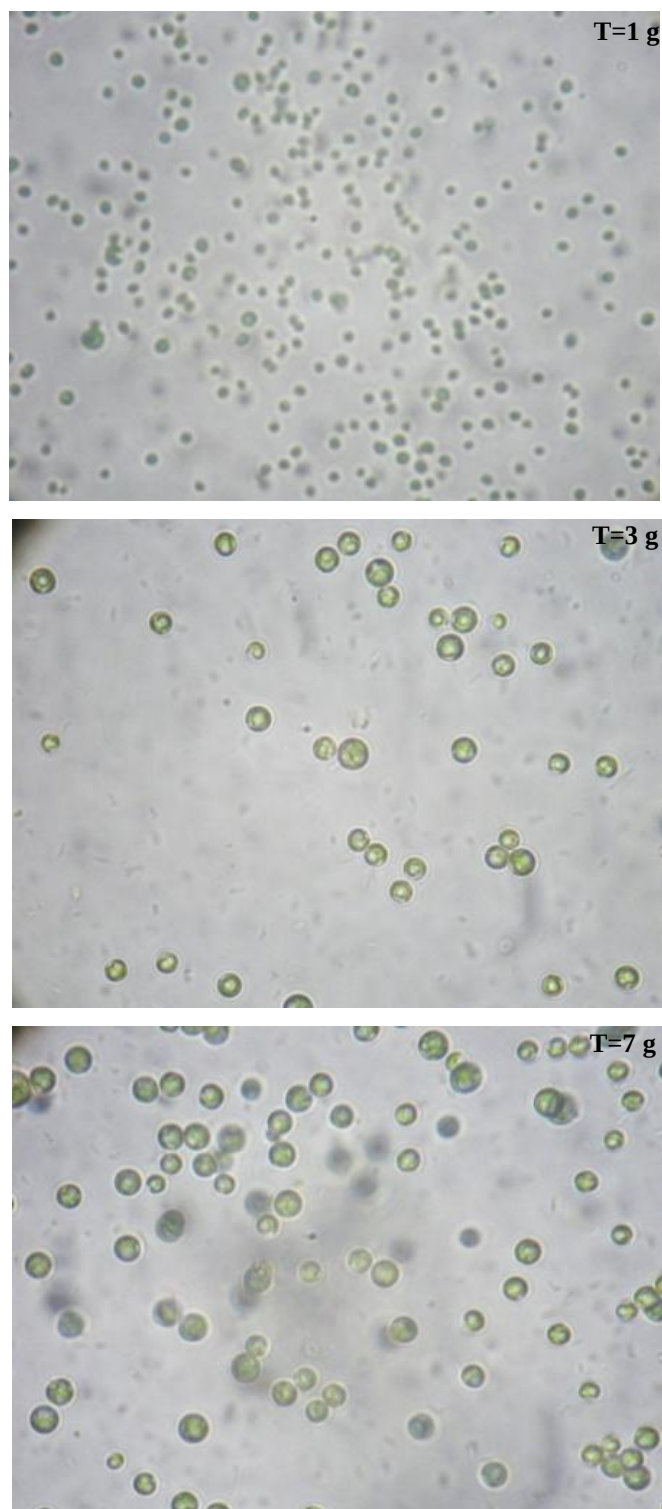


Figura 18: cellule di *H. pluvialis* in 2.0 g/l di melasso, 1.0 g/l di nitrato di sodio e magnesio solfato eptaidrato.

Estrazione dei pigmenti

Dopo aver liofilizzato i campioni, è stato necessario pesarli nuovamente per ottenere il peso netto di materiale biologico, dato che è poi servito per il calcolo della quantità dei pigmenti estratti.

La Tabella 9 di seguito riporta il peso medio di ciascuna prova dopo la liofilizzazione.

PROVA	PESO EPPENDORF (g)	PESO LORDO (g)	PESO NETTO (g)
HP1	1,1072	1,1363	0,0291
HP2	1,1058	1,1116	0,0058
HP3	1,1074	1,1090	0,0016
HP4	1,1065	1,1159	0,0094
HP5	1,0971	1,0990	0,0019
HP6	1,1078	1,1217	0,0139
HP7	1,1019	1,1073	0,0054
HP8	1,1006	1,1259	0,0253
HP9	1,1104	1,1178	0,0074
HP10	1,1029	1,1229	0,0200
HP11	1,1095	1,1325	0,0230
HP12	1,1014	1,1354	0,0340
HP13	1,1124	1,1197	0,0073
HP14	1,0989	1,1112	0,0123
HP15	1,1073	1,1285	0,0125
HP16	1,0985	1,1196	0,0238
HP17	1,1016	1,1255	0,0241

Tabella 9: pesi lordi e netti delle prove condotte

Come si vede dalla Tabella 9, le prove denominate HP16 e HP17, ovvero le prove con 2.0 g/l di melasso da barbabietola, nonostante abbiano avuto un numero di cellule inferiore rispetto alla prova con BG11 (vedi Figura 9), hanno avuto un peso netto molto vicino a quello della coltura HP1.

Determinazione dei pigmenti con analisi HPLC

Sulla base della curva di calibrazione di ciascun pigmento ottenuta in fase di standardizzazione del metodo impiegato, è stato possibile quantificare i carotenoidi astaxantina, zeaxantina, violaxantina, anteraxantina e luteina, oggetto del presente studio.

La Tabella 10 riassume i dati preliminari delle analisi, espressi come ng di carotenoide su mg di peso secco.

PROVA	MELASSO (g/l)	ASTA (ng/mg)	VIOLA (ng/mg)	ANT (ng/mg)	ZEA (ng/mg)	LUT (ng/mg)
HP1	BG11	4.5	5.5	1.3	12.4	44.3
HP2	0.1	4.8	8.1	-	-	47.6
HP3		-	5.1	-	-	35.9
HP4	0.3	4.4	4.4	-	6.0	28.8
HP5		-	6.0	-	14.1	28.2
HP6	0.5	4.1	2.4	-	7.0	2.8
HP7		-	2.4	0.8	-	2.3
HP8	0.8	-	2.2	-	5.9	2.3
HP9		-	5.7	-	-	1.65
HP10	1.0	-	2.9	-	6.6	13.4
HP11		-	-	-	-	-
HP12	1.3	-	2.2	-	-	2.4
HP13		-	2.9	-	-	2.7
HP14	1.5	-	6.0	-	15.5	16.4
HP15		-	5.2	-	14.1	15.6
HP16	2.0	4.1	-	-	14.2	42.3
HP17		4.3	-	-	13.8	43.1

Tabella 10: riassunto dei dati di quantificazione dei pigmenti estratti dalle varie di *H. pluvialis*

Come si vede dalla Tabella 10, al momento è stato possibile quantificare pienamente i cinque carotenoidi oggetto del presente studio solo sulla prova HP1, ovvero la coltura nel substrato da laboratorio BG11.

Delle altre prove invece è stato possibile quantificare solo alcuni dei carotenoidi, probabilmente perché troppo bassi rispetto al Limit of Detection (LoD) strumentale e del metodo utilizzati, sia perché l'introduzione del melasso nel substrato potrebbe aver portato alla sintesi di alcuni carotenoidi rispetto ad altri. Ulteriori analisi dovrebbero portare al chiarimento di questa evidenza sperimentale.

Prendendo come riferimento la massima concentrazione di melasso testata, ovvero 2.0 g/l, si può vedere come la media della quantità dei carotenoidi identificati sia molto simile a quella della prova di controllo con BG11. La Tabella 11 mostra questi risultati.

PROVA	ANALITA	MEDIA DATI QUANTIFICAZIONE (ng/mg peso secco)
HP1	Astaxantina	4.5
	Zeaxantina	12.4
	Luteina	44.3
HP16/17	Astaxantina	4.2
	Zeaxantina	14
	Luteina	42.7

Tabella 11: confronto tra le medie dei dati di quantificazione di HP1 in BG11 e le prove con melasso 2.0 g/l

Confronto economico tra BG11 e melasso da barbabietola

Questo confronto è stato utile per calcolare la fattibilità economica di un impianto da 1000 litri di alghe. Il calcolo non tiene in considerazione la spesa per gli aspetti tecnici dell'impianto (costi per miscelare il materiale, per mantenerlo ad una certa temperatura, ecc.), ma riguarda quella che potrebbe essere la spesa per “alimentare” il materiale biologico, in rapporto con la quantità di carotenoidi estratti ed il loro relativo costo sul mercato. Il confronto è stato

effettuato tra il substrato BG11 e il substrato contenente 2.0 g/l di melasso, 1.0 g/l rispettivamente di NaNO_3 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

La Tabella 12 riportata sotto mostra il costo al kg ed al grammo dei reagenti per il BG11. Il costo è stato preso da catalogo SIGMA 2011 .

REAGENTE	COSTO €/kg	COSTO €/g
NaNO_3	81,80	0,0818
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	36,50	0,0365
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,70	0,0377
Acido citrico	66,20	0,0662
H_3BO_3	45,30	0,0453
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	117	0,117
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	151,40	0,15140
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	622,20	0,622
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	90,10	0,09010

Tabella 12: costo €/kg ed €/g dei reagenti per BG11

Sono state considerate le quantità da utilizzare per 1.0 litro di substrato e quindi per un impianto da 1000 litri.

La Tabella 13 riporta invece i calcoli relativi alla spesa per 1000 litri di substrato BG11.

REAGENTE	QUANTITA' (g/l)	COSTO €/g	COSTO €/l	COSTO €/1000 l
NaNO_3	150	0,0818	12,27	12270
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.5	0,0365	0,274	274
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.6	0,0377	0,136	136
Acido citrico	0.6	0,0662	0,039	39
H_3BO_3	2.86	0,0453	0,129	129
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.81	0,117	0,212	212
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.222	0,15140	0,033	33
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.39	0,622	0,242	242
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.079	0,09010	0,071	71
		TOTALE	13,406	13406

Tabella 13: totale costi per litro e per 1000 litri di BG11

La seguente Tabella 14 riporta i calcoli relativi alla spesa per 1000 litri di substrato contenente melasso, nitrato di sodio e solfato di magnesio eptaidrato. Il costo del melasso sul mercato al momento

dell'indagine era di 150 €/ton, mentre il costo dei Sali inorganici è stato preso dal catalogo SIGMA 2011.

REAGENTE	QUANTITA' (g/l)	COSTO €/g	COSTO €/l	COSTO €/1000 l
NaNO ₃	1	0,0818	0,0818	81.8
MgSO ₄ *7H ₂ O	1	0,0365	0,0365	36.5
Melasso	2	0,00015	0,00030	0.3
		TOTALE	0.1186	118,6

Tabella 14: totale costi per 1 litro e per 1000 litri di substrato con 2.0 g/l di melasso, 1.0 g/l rispettivamente di nitrato di sodio e solfato di magnesio

Come si evince dalle Tabelle 13 e 14, la spesa per un ipotetico impianto da 1000 litri è decisamente più bassa (€ 118,6) rispetto allo stesso volume di BG11 (€ 13406). Il rapporto tra i due si attesta a 1:113.

Se confrontiamo la produttività di *H. pluvialis* nel substrato BG11 e nel substrato composto da 2 g/l di melasso da barbabietola e Sali inorganici, possiamo osservare la media dei tre composti identificati, la quale si attesta per l'astaxantina a 4.2 ng/mg di peso secco per la zeaxantina a 14 ng/mg di peso secco e a 42.7 ng/mg di peso secco per la luteina, contrariamente a HP1 cresciuto in BG11 dove la media per ciascun carotenoide è di 4.5 ng/mg di peso secco per l'astaxantina, di 5.5 ng/mg di peso secco per la violaxantina, di 1.3 ng/mg di peso secco per l'antexantina, di 12.4 ng/mg di peso secco di zeaxantina e di 44.3 ng/mg di peso secco per la luteina. Nella Figura 19 è riportato il grafico a barre del confronto tra la media della quantità, espressa in ng/mg di peso secco dei carotenoidi estratti dalle colture in BG11 e quelli estratti dalla colture in 2.0 g/l di melasso da barbabietola, 1.0 g/l rispettivamente di NaNO₃ e MgSO₄*7H₂O.

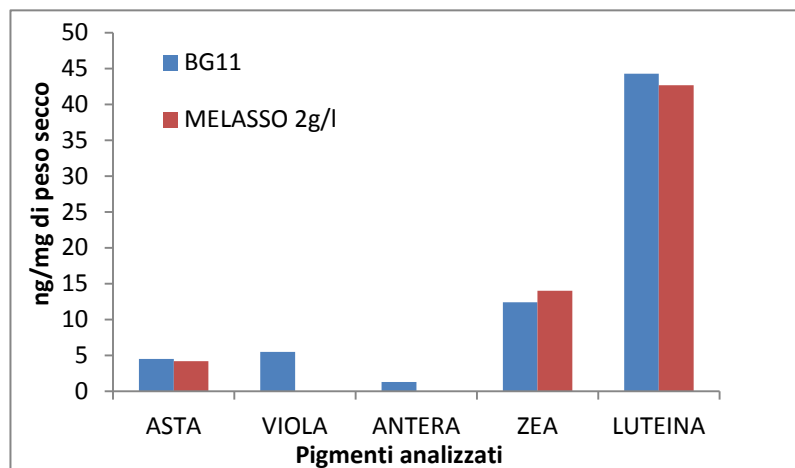


Figura 19: confronto tra le medie dei carotenoidi estratti dalle colture in BG11 e in 2.0 g/l di melasso da barbabietola, 1.0 g/l rispettivamente di NaNO_3 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. ASTA: astaxantina; VIOLA: violaxantina; ANTERA: anteraxantina; ZEA: zeaxantina.

Come si può osservare in Figura 19, il confronto, dove possibile, della media delle quantità dei carotenoidi estratti dalle colture cresciute con il melasso da barbabietola e i Sali inorganici si avvicinano molto a quelle cresciute in BG11; l'incapacità di identificare e quantificare i carotenoidi violaxantina ed anteraxantina potrebbe essere dovuta a mancanze sperimentali, ma anche dall'incapacità del substrato contenente melasso di far esprimere a *H. pluvialis* questi due carotenoidi. Indagini più approfondite potranno dimostrare se effettivamente esiste una correlazione tra carbonio fornito con il substrato ed espressione di carotenoidi.

CONCLUSIONI

Dal grafico delle curve di crescita delle varie prove è stato osservato come la crescita in BG11 sia comunque maggiore rispetto alle prove condotte con il melasso da barbabietola; tuttavia è stata osservata una forte somiglianza tra questa prova e quella condotta con 2.0 g/l di melasso, 1.0 g/l di nitrato di sodio e 1.0 g/l di solfato di magnesio eptaidrato. Inoltre, le fotografie effettuate al microscopio ottico con ingrandimento 40X hanno posto l'attenzione su una differenza significativa nella dimensione delle cellule della coltura con 2.0 g/l di melasso rispetto a quelle cresciute in BG11: le cellule cresciute in melasso da barbabietola sono 1.8 volte più grosse di quelle cresciute in BG11.

Il peso delle prove denominate HP16 e HP17, ovvero le prove con 2.0 g/l di melasso da barbabietola, nonostante abbiano avuto un numero di cellule inferiore, hanno avuto un peso netto molto vicino a quello della prova denominata HP1, in BG11. Questo risultato potrebbe confermare l'ipotesi della maggiore dimensione delle cellule in melasso, a discapito di un numero più basso di individui/ml della coltura.

Analizzando il confronto della quantità dei pigmenti estratti sia dalla coltura con 2.0 g/l di melasso sia da quella in BG11, è stato possibile osservare come la quantità media dei pigmenti identificati sia molto simile, eccetto per i pigmenti violaxantina ed anteraxantina. Questa osservazione avvalora ancora di più l'ipotesi che le cellule nutrite con melasso da barbabietola sono numericamente di meno rispetto ad uno stesso volume di BG11, ma più grosse e quindi contenenti una quantità di pigmenti significativa. Probabilmente indagini molecolari potranno dimostrare l'esistenza di una possibile relazione tra espressione di pigmenti e carbonio introdotto con il terreno di coltura.

L'analisi dei costi per la realizzazione di un ipotetico impianto da 1000 litri ha dimostrato come con l'alimentazione con melasso, nitrato di sodio e solfato di magnesio eptaidrato, alle concentrazioni testate, sia molto più conveniente rispetto allo stesso volume di BG11.

Ulteriori analisi in campo di produttività, utilizzazione del carbonio e dei fattori ambientali, potranno chiarire se effettivamente l'applicazione del melasso da barbabietola possa essere industrialmente conveniente.

RINGRAZIAMENTI

Per il seguente lavoro di tesi vorrei ringraziare mia mamma e mio papà che hanno creduto in me, ora più che mai; la mia compagna, che mi ha sopportato più di qualunque altro, mia suocera, per i pranzi domenicali preparati per sostenere la stesura di questo lavoro di tesi, mia sorella, mio cognato e il mio nipotino.

Vorrei ringraziare il Dott. Andrea Margonelli, impareggiabile tutor e mio mentore, per il grandissimo lavoro di correzione di questo lavoro.

Vorrei ringraziare la Dott.ssa Simona Litescu del Centro di Bioanalisi di Bucarest, Romania, per aver fatto le analisi HPLC che sono riportate in questo lavoro di tesi.

Vorrei ringraziare la Dott.ssa Maria Teresa Giardi e il suo gruppo di lavoro.

BIBLIOGRAFIA

- Allen, R.G. and Tresini, M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000 28, 463–499.
- Anantharajappa Kumudha, Sagaya Selva Kumar, Munna Singh Thakur, Gokare Aswathanarayana Ravishankar, and Ravi Sarada. Purification, Identification, and Characterization of Methylcobalamin from *Spirulina platensis*. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58 (18), pp 9925–9930.
- Andrade Michele R. , Costa Jorge A.V. . Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture*, 2007, Vol. 264, 1-4, pp. 130-134.
- Becker E.W. Libro: Microalgae, biotechnology and microbiology, 1994.
- Becker E.W. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 2004, 25(2):207–210.
- Ben-Amotz A. Biofuel and CO₂ capture by algae. Technical report, reported at NASA, 20 Novembre, 2008.
- Bertram, J.S. Carotenoids and gene regulation. *Nutr. Rev.*, 1999, 57, 182–191.
- Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiologia plantarum*, 2000, 108: 111–117. 2000.
- Burlew J.S. Algal culture. From Laboratory to Pilot Plant, Carnegie Inst. Washington Publ, 1953.
- Cherg Jong-Yuh, Shih Mei-Fen. Potential hypoglycemic effects of *Chlorella* in streptozotocin-induced diabetic mice.
- Clarens A.F., Resurreccion E.P., White M.A. and Colosi L.M. Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks. *Environ. Sci. Technol.*, 2010, 44 (5), pp. 1813-1819.
- Cohen-Bazire G, Stanier RY. Inhibition of carotenoid synthesis in photosynthetic bacteria. *Nature*, 1958, 181: 250–252.

- De S. and Devasagayam T. Marine algae as sources of antioxidants: a review. Indian bulletin, 2006, vol. 5, pp. 23-27.
- Del Campo José A., García-González Mercedes, Guerrero Miguel G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2007, 74:1163–1174.
- Droop MR. Carotenogenesis in *Haematococcus pluvialis*. Nature, 1955, 175: 42.
- Droop MR. Conditions governing haematochrome formation and loss in the alga *Haematococcus pluvialis* Flotow. Arch Mikrobiol, 1954, 20S: 391–397.
- Eere. National algal biofuels technology roadmap. Technical report, Energy Efficiency Renewable Energy Office - U.S. Department of Energy, 2009.
- Fargione J., Hill J., Tilman D., Polasky S., and Hawthorne P.. Land clearing and the biofuel carbon debt. Science, 2008, 319(5867):1235.
- Gershon, D. The mitochondrial theory of aging: Is the culprit a faulty disposal system rather than indigenous mitochondrial alterations? Exp. Gerontol., 1999, 34, 613–619.
- Goodwin TW, Osman HG. Studies in Carotenogenesis 9. General cultural conditions controlling carotenoid (Spirilloxanthin) synthesis in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. Biochem J, 1953, 53: 541–546.
- Griffiths M.J. and Harrison S.T.L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. Journal of Applied Phycology, 2009, 21(5):493–507.
- Grung M, D'Souza FML, Borowitzka M, Liaaen-Jensen S. Algal carotenoids 51. Secondary carotenoids 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S,3S%)-astaxanthin esters. J Appl Phycol., 1992, 4: 165–171.
- Jacques, P. The potential preventive effects of vitamins for cataract and age-related macular degeneration. Int. J. Vitam. Nutr. Res., 1999, 69, 198–205.

-
- K.N. Chidambara Murthy, A. Vanitha, J. Rajesha, M. Mahadeva Swamy, P.R. Sowmya, Gokare A. Ravishankar. In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* — a green microalga. Life Sciences, 2005, Vol.76-12, pp. 1381–1390.
 - Kobayashi M, Kakizono T, Yamaguchi K, Nishio N, Nagai S. Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions. J. Ferment. Bioeng., 1992, 74: 17–20.
 - Kurashige, M. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. Physiol. Chem. Phys. Med. NMR, 1990, 22, 27–38.
 - Laurel A. Loeblich. Photosynthesis and Pigments Influenced By Light Intensity and Salinity in the Halophile *Dunaliella Salina* (Chlorophyta). Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 1982, 62 : pp 493-508
 - Li-chen Wu, Ja-an Annie Ho, Ming-Chen Shieh, and In-Wei Lu. Antioxidant and antiproliferative activities of *Spirulina* and *Chlorella* Water Extracts. J. Agric. Food Chem., 2005, 53 (10), pp 4207–4212.
 - Lu F, Vonshak A, Gabbay R, Hirschberg J, Boussiba S. The biosynthetic pathway of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* as indicated by inhibition with diphenylamine. Plant Cell Physiol, 1995, 36: 1519–1524.
 - Mata Teresa M., Martins Antonio A., Caetano Nidia. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2009.
 - McKendry P. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. Bioresource Technology, 83(1):37–46, 2002.
 - Mera Pharmaceuticals. *Haematococcus pluvialis* and astaxanthin safety for human consumption. Technical Report TR.3005.001, 1999.
 - Naguib, Y.M.A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. J. Agric. Food Chem., 2000, 48, 1150–1154.

- O'Connor, I. and O'Brien, N. Modulation of UVA light-induced oxidative stress by beta-carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.*, 1998, 16, 226–230.
- Palozza, P. and Krinsky, N.I. Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Arch. Biochem.*, 1992.
- Papas, A.M. Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health, CRC Press, 1999.
- R.J. Geider, B.A. Osborne. Libro: Algal photosynthesis, 1992.
- Radmann E.M., Reinehr C.O., Costa J.A.V. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. *Aquaculture*, 2007, Vol. 265, 1–4, pp. 118–126.
- Rikke Ankerstjerne Schmidt, Marilyn G. Wiebe, Niels Thomas Eriksen. Heterotrophic high cell-density fed-batch cultures of the phycocyanin-producing red alga *Galdieria sulphuraria*.. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, Vol. 90-1, pp. 77–84.
- Scott A. Halperin, Bruce Smith, Coleen Nolan, Janet Shay, Jaroslav Kralovec. Safety and immunoenhancing effect of a *Chlorella*-derived dietary supplement in healthy adults undergoing influenza vaccination: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *CMAJ*, 2003, vol. 169 no. 2.
- Sheehan J., Dunahay T., Benemann J., and Roessler P. A look back at the u.s. department of energy's aquatic species program - biodiesel from algae. Technical report, National Renewable Energy Laboratory, 1998.
- Shimidzu, N. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fish. Sci.*, 1996, 62, 134–137.
- Spolaore, Pauline and Joannis-Cassan, Claire and Duran, Elie and Isambert, Arsène. Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, vol. 101 (n° 6). pp. 201-211.
- Stephen L. DeFelice, The NutraCeutical Revolution: Fueling a Powerful, New International Market, 1989.

- Suh I.S. and Lee C.G. Photobioreactor engineering: design and performance. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2003, 8(6):313–321.
- Tedesco M.A. and Duerr E.O. Light, temperature and nitrose starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of *Spirulina platensis* UTEX 1928. *Journal of Applied Phycology*, 1989, 1(3):201–209.
- Tornabene G. and Burris N. Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. *Enzyme and Microbial Technology*, 1983, 5(6):435–440.
- Tso, M.O.M. and Lam, T-T. Method of Retarding and Ameliorating Central Nervous System and Eye Damage. U.S. Patent #5527533, 1996.
- Tyson K., Bozell J., Wallace R., Petersen E., and Moens L. Biomass oil analysis: Research needs and recommendations. Technical report, National Renewable Energy Laboratory, 2004.
- Y. Chisti. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv*, 2007, 25(3):294–306.
- Yogesh C. Sharma, Bhaskar Singh, John Korstad. A critical review of recent methods used for economically viable and eco-friendly development of microalgae as a potential feedstock for synthesis of biodiesel. *Environmental Science & Technology* (submitted).
- Yong YYR, Lee YK. Do carotenoids play a photoprotective role in the cytoplasm of *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta)? *J Phycol*, 1991, 30: 257–261.
- Yusuf Chisti. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 2007, pp. 294–306.
- Yu-Wen Hsu, Chia-Fang Tsai, Wen-Huei Chang, Yung-Chyuan Ho, Wen-Kang Chen, Fung-Jou Lu. Protective effects of *Dunaliella salina*: a carotenoids-rich alga, against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, Vol. 46-10, pp. 3311–3317.