

**ALMA MATER STUDIORUM**  
**UNIVERSITÀ DI BOLOGNA**

Scuola Di Scienze

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina

**Effetto della carenza di azoto sulla crescita e  
composizione di *Phaeodactylum tricornutum***

Tesi di Laurea in Fitobiologia Marina

**Relatrice**

Prof. ssa Rossella Pistocchi

**Correlatrice**

Dott.ssa Matilde Mazzotti

**Presentata da**

Valentina Casciaro

---

III sessione

Anno accademico 2014/2015



*“Colui che non sa niente, non ama niente.  
Colui che non fa niente, non capisce niente.  
Colui che non capisce niente è spregevole.  
Ma colui che ama, vede, osserva...  
La maggiore conoscenza è  
congiunta indissolubilmente all’amore...  
Chiunque creda che tutti i frutti maturino  
contemporaneamente come le fragole,  
non sa nulla dell’uva.”*

*Paracelso*



*Alla mia famiglia,  
per sempre*



# INDICE

1	INTRODUZIONE.....	10
1.1	Microalghe.....	10
1.1.1	Pigmenti fotosintetici .....	10
1.1.2	Fattori che influenzano la crescita e la composizione biochimica delle microalghe .....	12
1.2	Diatomee.....	15
1.2.1	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> e sue applicazioni.....	18
1.3	Sistemi industriali di coltivazione .....	22
2	SCOPO DELLA TESI.....	28
3	MATERIALI E METODI .....	30
3.1	Disegno sperimentale .....	30
3.2	Valutazione della crescita.....	34
3.2.1	Conta cellulare.....	34
3.2.2	Analisi della torbidità.....	35
3.2.3	Analisi del peso secco .....	36
3.3	Composizione cellulare .....	37
3.3.1	Analisi della clorofilla <i>a</i> totale.....	37
3.3.2	Analisi dei polisaccaridi totali.....	38
3.3.3	Determinazione proteine totali.....	40
3.3.4	Isolamento della frazione lipidica .....	43
3.3.5	Isolamento della frazione polisaccaridica .....	43
3.4	Determinazione del consumo dei nutrienti.....	45
3.4.1	Determinazione del fosforo reattivo .....	45
3.4.2	Determinazione dei nitrati mediante colonna di cadmio metallico ramato.....	46

3.5	Analisi statistica.....	49
4	Risultati .....	50
4.1	Crescita di <i>Phaeodactylum tricornutum</i> in colture batch .....	50
4.1.1	Andamento della crescita e del consumo dei nutrienti .....	50
4.1.2	Composizione cellulare .....	54
4.2	Crescita di <i>Phaeodactylum tricornutum</i> in PBR.....	59
4.2.1	Andamento della crescita e del consumo dei nutrienti .....	59
4.2.2	Composizione cellulare .....	62
5	Discussione .....	66
6	Bibliografia .....	71
7	Ringraziamenti .....	76



# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 Microalghe

In ambiente marino gli organismi vegetali sono rappresentati in larga parte dalle alghe le quali hanno il ruolo di produrre sostanza organica per mezzo della fotosintesi, ossigenando le acque e utilizzando la CO<sub>2</sub> disciolta. Si distinguono in alghe unicellulari, con flagelli o senza, in forme coloniali e in alghe pluricellulari, con tallo ad organizzazione filamentosa, pseudoparenchimatica, parenchimatica, sifonale. Possono essere bentoniche o planctoniche oppure, in base alle loro preferenze nutrizionali si dividono in quattro gruppi: eterotrofe obbligate, fototrofe obbligate, mixotrofe obbligate, mixotrofe facoltative. I metodi riproduttivi possono essere vegetativi (tramite divisione di una singola cellula o frammentazione della colonia), asessuali (con la produzione di spore motili) o sessuali (tramite unione dei gameti) (Barsanti et al., 2010).

### 1.1.1 Pigmenti fotosintetici

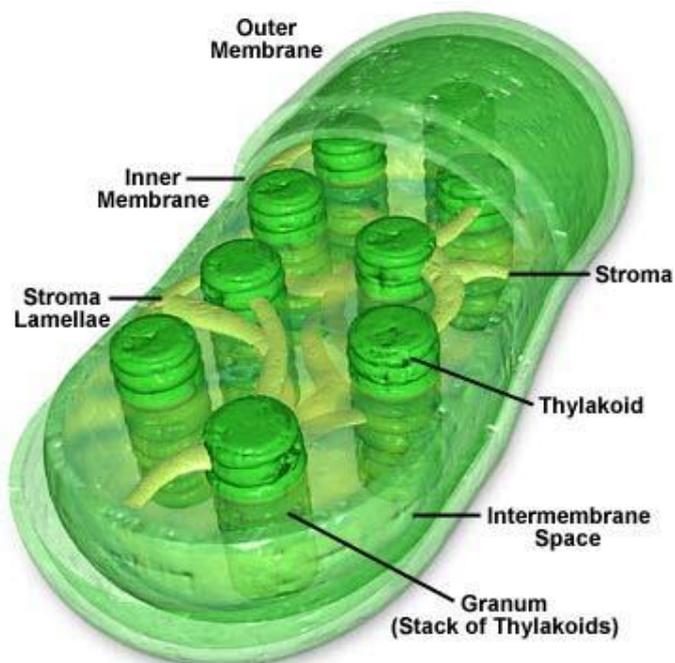
Tutte le cellule vegetali sono caratterizzate dalla presenza di particolari organelli detti plastidi e in base al loro colore, vengono distinti in cloroplasti, leucoplasti, cromoplasti.

Le alghe (sia unicellulari che pluricellulari) contengono principalmente cloroplasti fotosintetici. I cloroplasti, delimitati da 2 a 4 membrane, circondano una sostanza amorfa ricca di H<sub>2</sub>O con ribosomi ed enzimi detta stroma. Nello spazio interno vi è un ulteriore sistema membranoso detto sistema tilacoidale che ne aumenta la superficie (Fig.1). Questi tilacoidi sono in continuità tra loro delimitando uno spazio detto lumen. All'interno delle membrane tilacoidali si inseriscono i pigmenti fotosintetici, grazie ai quali è possibile utilizzare la luce solare. La capacità di assorbire la luce è dovuta alla presenza nella molecola dei pigmenti di numerosi doppi legami coniugati; maggiore è il numero di doppi legami maggiore è la lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) di assorbimento, pertanto, ogni pigmento assorbe determinate  $\lambda$ . Ad ogni pigmento corrisponde uno spettro di assorbimento ossia un diagramma che mostra l'intensità di assorbimento di una determinata  $\lambda$ .

I pigmenti presenti nelle alghe sono divisi in clorofille, carotenoidi, ficobiliproteine.

Le clorofille sono liposolubili e sono costituite da un sistema di anelli porfirinici (tetrapirroli) con al centro un atomo di  $Mg^{2+}$ . Le varie clorofille vengono identificate con le lettere *a, b o c*.

La clorofilla *a* è quella che accomuna tutte le alghe e le piante superiori distinguendo i cianobatteri da tutti gli altri organismi fotosintetici; assorbe principalmente la luce blu-violetta a 430 nm e rossa a 663 nm. Le altre clorofille assorbono in regioni limitrofe a quelle della clorofilla *a* (Barsanti et al., 2010)



*Fig.1 Cloroplasto*

La clorofilla *b* si forma a partire dalla clorofilla *a* in seguito alla conversione enzimatica di un gruppo metile in un gruppo formile con utilizzo di  $O_2$ . E' presente in 3 generi di cianobatteri, nelle clorofite e nelle euglenofite.

La clorofilla *c* si trova nelle dinofite, criptofite, rafidofite, aptofite, diatomee, xantofite e feofite. Possiede diversi componenti spettrali: le forme *c1, c2, c3 e c4*. Tranne la *c2* le restanti non posseggono il fitolo e non riescono quindi ad inserirsi nella membrana tilacoidale, risultando maggiormente solubili in acqua rispetto alle altre clorofille.

I carotenoidi sono composti isoprenoidi con 40 atomi di carbonio e almeno 9 doppi legami coniugati. Si dividono in caroteni (privi di O<sub>2</sub>, es. β-carotene) e xantofille (con ossigeno, es. luteina, fucoxantina, peridina). La maggior parte dei carotenoidi, di colore prevalentemente giallo-arancione, presenta assorbimento della luce di lunghezza d'onda tra 450 e 480 nm, cioè nell'azzurro-verde.

Le ficobiliproteine sono costituite da un tetrapirrolo a catena aperta, la ficobilina e da una parte proteica. In base all'assorbimento della luce da parte del cromoforo abbiamo: ficoeritrina (rossa), ficocianina (blu), alloficocianina (blu-porpora). Sono tutte solubili in acqua e presenti solo in cianobatteri, rodofite e criptofite. Le ficobiliproteine coprono uno spettro di assorbimento da 450 a 670 nm e sono di colore rosso o blu.

### **1.1.2 Fattori che influenzano la crescita e la composizione biochimica delle microalghe**

Particolari fattori ambientali quali luce, temperatura, nutrienti, salinità e pH possono influenzare non solo la produttività algale e la fotosintesi, ma anche il metabolismo cellulare e quindi la composizione della cellula (Hu, 2013).

#### **1.1.2.1 Luce**

Al variare dell'intensità luminosa interviene il processo di foto-acclimatazione che provoca cambiamenti fenotipici nella cellula per ottimizzare la fotosintesi e, quindi, la crescita algale (Dubinsky et al., 1995). A basse intensità luminose la cellula aumenta la produzione di clorofilla *a*, ad alte intensità luminose aumentano i carotenoidi che hanno una funzione foto-protettrice. Ad alte intensità luminose si è anche visto l'aumento nella produzione di polisaccaridi e lipidi in varie specie microalgali (Hu, 2013).

#### **1.1.2.2 Temperatura**

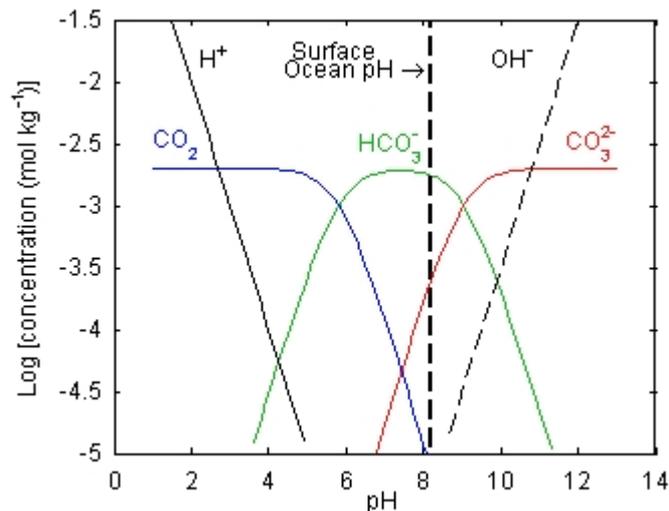
La temperatura agisce sulla composizione cellulare seguendo due vie: influenzando il tasso delle reazioni chimiche e biochimiche temperatura-dipendenti e influenzando la ripartizione del carbonio fissato fotosinteticamente nelle tre macromolecole principali, ossia lipidi, proteine e carboidrati (Hu, 2013). Ogni specie possiede il proprio valore ottimale di crescita e spesso si osserva come un abbassamento della temperatura sotto tale valore riduca la produzione di lipidi aumentandone però il grado di insaturazione a livello delle membrane; un aumento della stabilità e fluidità delle membrane (soprattutto nelle membrane tilacoidali) permette la protezione dei fotosistemi dai fenomeni di

fotoinibizione o fotoossidazione che avverrebbero a basse temperature (Nishida et al., 1996).

Sono stati notati anche cambiamenti nella produzione della clorofilla *a* che aumenta all'aumentare della temperatura in varie specie algali. Quindi si evince come i cambiamenti nella temperatura alla quale la coltura viene mantenuta influenzino la produzione di lipidi, carboidrati e proteine pur variando da specie a specie.

### 1.1.2.3 pH

Come la temperatura anche il pH influenza la crescita algale in quanto ogni specie cresce a livelli ottimali di pH caratteristici. Il pH del mezzo è determinato dall'equilibrio dei carbonati. La  $\text{CO}_2$  è un gas in grado di reagire con l'acqua pertanto il carbonio inorganico in mare è presente in varie forme che si trovano in equilibrio tra loro (Fig.4). Al pH tipico dell'acqua di mare (pH 8) il bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) è la forma prevalente, se aumenta l'anidride carbonica determina uno spostamento verso valori di pH acidi, invece la scissione del bicarbonato in  $\text{CO}_3^{2-}$  e  $\text{OH}^-$  determina valori basici. Il pH ottimale cambia da specie a specie e le colture vengono mantenute a pH ideali per mezzo dell'insufflazione di  $\text{CO}_2$  che, oltre a regolare il pH, fornisce il carbonio necessario per ottenere colture ad alto rendimento (Grobbelaar, 2013).



*Fig.4 pH ed equilibrio carbonati*

#### **1.1.2.4 Nutrienti**

Tra i macronutrienti più importanti per la crescita delle microalghe, oltre a carbonio, ossigeno e idrogeno (sempre disponibili), ricordiamo l'importanza di azoto e fosforo, in quanto sono gli elementi che possono maggiormente causare una limitazione della crescita.

L'azoto può essere utilizzato sotto varie forme: nitrato, ammoniaca, urea. Quando le alghe vivono in ambienti con concentrazioni ideali di azoto l'accumulo di sostanze di riserva (polisaccaridi e lipidi) è limitato, al contrario, in condizioni di carenza di azoto, le sostanze di riserva aumentano. In quest'ultima condizione si vede come la cellula, non riuscendo a produrre proteine, indirizzi il metabolismo verso la produzione di carboidrati e lipidi (Li et al., 2011).

Se lo stress è persistente la cellula predilige indirizzare il carbonio nella formazione di lipidi. La carenza di azoto in alcune microalghe sembra invece incrementare la produzione di carotenoidi (Ben-Amotz et al., 1982).

Altro elemento importante è il fosforo. In forma di ortofosfato viene unito ai composti organici tramite fosforilazioni; il fosfato inorganico in eccesso viene accumulato nelle cellule sotto forma di polifosfato depositato in granuli. Questi granuli risultano osservabili a concentrazioni di fosfato ideali per la crescita e riproduzione della microalga e scompaiono in carenza di fosfati (Hu, 2013).

I sintomi della carenza di questo nutriente sono simili a quelli dell'azoto, ossia aumento di carboidrati e diminuzione di clorofilla *a* (Hu, 2013).

Vi sono numerosi minerali presenti in tracce importanti per la crescita algale che variano da specie a specie. Uno dei più importanti è il ferro per le sue capacità redox e per il suo coinvolgimento in processi essenziali come fotosintesi, respirazione, fissazione dell'azoto e sintesi del DNA (Hu, 2013).

## 1.2 Diatomee

La microalga presa in esame in questo studio è *Phaeodactylum tricornutum*, una diatomea pennata.

Le diatomee sono alghe unicellulari o coloniali appartenenti alla classe delle *Bacillariophyceae* (divisione *Heterokontophyta*), comparse sul pianeta Terra circa 135 milioni di anni fa. Le più antiche diatomee risalgono al Giurassico Inferiore, ma ritrovamenti sono molto rari fino al Cretaceo Superiore. Esistono più di 250 generi differenti, costituiti a loro volta da più di 100.000 specie presenti in tutti i mari, laghi e fiumi del pianeta. Questi organismi costituiscono il più importante gruppo eucariotico del fitoplancton, sono presenti anche a livello bentonico e sono responsabili di circa il 40% della produttività primaria marina (Falwoski et al., 1998).

Le diatomee hanno dimensioni comprese tra i 10 e i 200  $\mu\text{m}$ , vivono in tutti gli ambienti acquatici, sono prive di flagelli e sono caratterizzate da un rivestimento esterno amorfo di natura silicea  $[(\text{SiO}_2)_n (\text{H}_2\text{O})]$ , chiamato *frustulo* e costituito da due parti sovrapposte: epiteca ed ipoteca. Ognuna a sua volta è costituita da una parte piatta (valva) e una laterale (cingolo). Sono presenti in 4 forme: centrica, pennata, trellissoide, gonoide in base alla simmetria dei frustuli. Le forme più abbondanti sono centriche e pennate. Le diatomee centriche posseggono simmetria radiale, sono tutte planctoniche e sono particolarmente abbondanti in zone ricche di nutrienti e nelle regioni subpolari. Le diatomee pennate sono allungate e presentano simmetria bilaterale, sono prevalentemente bentoniche e sono presenti in acque dolci, salmastre e marine di bassa profondità.

Alcune diatomee hanno un solco, detto rafe, sulla valva diviso in due da un nodulo, attraverso il quale vengono secrete sostanze di natura polisaccaridica per esocitosi che permettono lo scivolamento sulle superfici solide. Dal frustulo possono svilupparsi estensioni che servono per la formazione di colonie, galleggiamento oppure per rilasciare mucillagine (utilizzata per l'adesione al substrato o ad altre cellule della colonia) o chitina (deterrente per la predazione, galleggiamento o formazione colonie).

Normalmente le diatomee si riproducono asessualmente per scissione binaria da 1 a 8 volte al giorno a seconda della specie (Falciatore et al., 2002). La cellula madre si divide in due e ogni cellula figlia eredita una delle due parti del frustulo (o l'epiteca o l'ipoteca) che andrà a costituire in entrambe le cellule figlie l'epiteca; ogni cellula figlia

costruirà da sé l'ipoteca. Chi eredita dalla madre l'epiteca rimane delle sue stesse dimensioni, chi invece eredita l'ipoteca rimpicciolisce (essendo la parte più piccola) fino a raggiungere dimensioni incompatibili con la vita. A questo punto interviene la riproduzione sessuale che inizia con la gametogenesi, un processo meiotico che porta alla formazione di gameti morfologicamente uguali tra loro (isogamia) nelle diatomee pennate o differenti (oogamia) nelle diatomee centriche. Il prodotto della fusione dei gameti maschili e femminili genera un'auxospora diploide circondata da una membrana al cui interno si forma una nuova diatomea dalle massime dimensioni possibili (Fig. 4). In risposta a particolari fattori (carenza di nutrienti, temperatura, intensità luminosa, pH) le diatomee possono produrre spore di resistenza che differiscono notevolmente dalle forme vegetative. Queste spore possono germinare al ripresentarsi delle condizioni favorevoli per la crescita della specie. Le spore hanno valve molto ispessite e citoplasma denso e ricco di sostanze di riserva. Le diatomee hanno un numero variabile di cloroplasti giallo-dorati aventi all'interno lamelle formate da tre tilacoidi racchiusi da un tilacoide cingolare.

Al loro interno è contenuto il pirenoide, un corpo proteico leggermente più scuro in confronto al resto del cloroplasto e contenente lamelle costituite solamente da due tilacoidi. I cloroplasti delle diatomee sono caratterizzati dall'essere avvolti da quattro membrane. Analisi dell'RNA ribosomiale dei plastidi e comparazioni del genoma plastidiale hanno rivelato che le diatomee hanno avuto origine da un doppio evento di endosimbiosi.

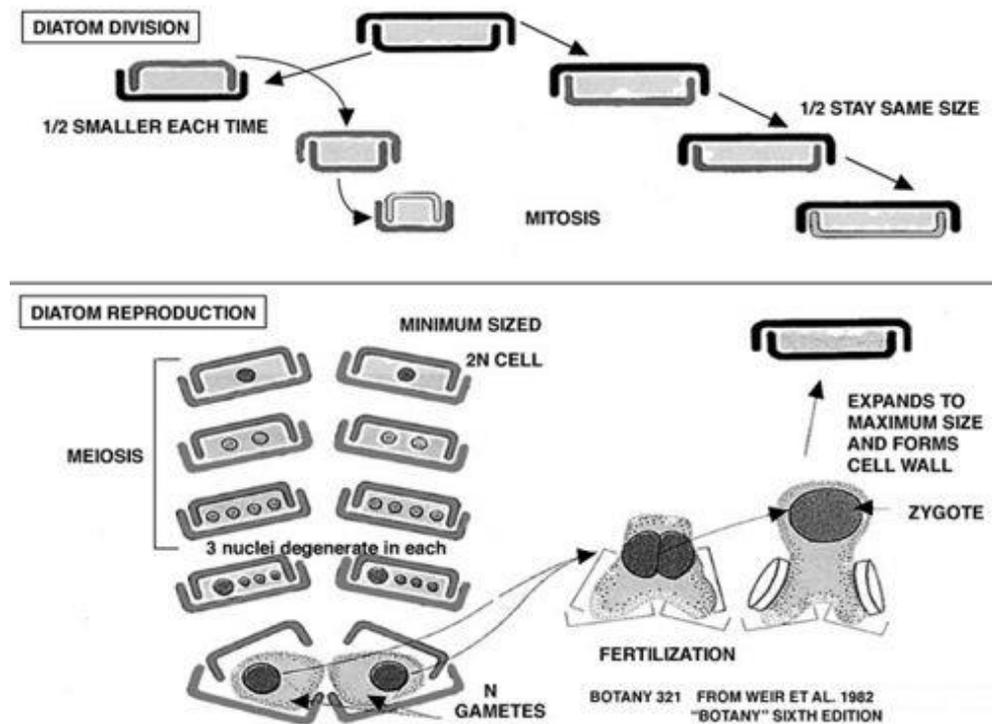


Fig.4 Ciclo riproduttivo di una diatomea

Le diatomee contengono clorofilla *a* e clorofille di tipo *c*; come pigmenti accessori, contengono  $\beta$ -carotene e alcune xantofille, tra cui fucoxantina, diatoxantina e diadinoxantina; la prima in particolare è molto abbondante e per questo conferisce alle cellule il colore bruno-dorato caratteristico.

In mare le diatomee aumentano numericamente all'inizio della primavera quando i nutrienti sono abbondanti e le condizioni di luce cominciano a permettere la fotosintesi. Un ulteriore aumento si ha in autunno. Alla morte della cellula i frustuli possono accumularsi andando a creare depositi silicei conosciuti come farina fossile o diatomite che possono divenire spessi centinaia di metri e ricoprire aree di molti chilometri quadrati. Questi depositi sono sfruttati a livello industriale soprattutto nella produzione di abrasivi.

A parte il frustulo siliceo, la composizione chimica delle diatomee è piuttosto simile a quella delle altre microalghe: le cellule sono costituite per il 30-60% da proteine, 5-20% da carboidrati e 10-50% da lipidi in peso secco (Paul et al., 2009).

### 1.2.1 *Phaeodactylum tricornutum* e sue applicazioni

*Phaeodactylum tricornutum*, diatomea marina con simmetria pennata, è l'unica del suo raggruppamento che può esistere in tre diversi morfotipi (triradiata, ovale, fusiforme) in risposta a stimoli esterni (De Martino et al., 2007) (Fig.5). È una delle due diatomee (l'altra è *Thalassiosira pseudonana*) ad avere il genoma interamente sequenziato e perciò può essere usata come modello di indagini sulle diatomee (Kim et al. 2012).

L'interesse commerciale verso *Phaeodactylum tricornutum* nasce dal suo alto contenuto di acidi grassi polinsaturi (PUFA), tra cui troviamo degli omega 3, come l'acido eicosapentaenoico (EPA) e l'acido docosaesaenoico (DHA). EPA e DHA risultano importanti nella crescita e nello sviluppo dell'infante e nel mantenimento in salute del sistema cardiovascolare dell'adulto (Hamilton et al., 2013). Grazie agli alti contenuti di PUFA questa microalga risulta, pertanto, una valida fonte alternativa di lipidi rispetto a quelle attualmente in commercio quali krill e olio di pesce, divenendo interessante anche nel campo della nutraceutica e farmaceutica (Yongmanitchai *et al.* ,1990) e nell'acquacoltura (Becker, 2013).

Recentemente si è sperimentata la capacità anti-tumorale del DHA microalgale che favorisce l'aumento delle proteine che inducono l'apoptosi cellulare e la frammentazione del DNA (Amaro et al., 2012).

Inoltre, sempre grazie agli elevati contenuti lipidici, *Phaeodactylum tricornutum* è stato annoverato di recente tra i potenziali candidati per la produzione di bio-diesel (Torzillo *et al.*, 2012).

Questa microalga è ricca anche di composti polisaccaridici che possiamo dividere in tre categorie (Alekseeva et al., 2005):

**polisaccaridi strutturali:** rappresentati dagli eteroglicani che insieme alle proteine avvolgono la parete silicea delle diatomee;

**polisaccaridi di riserva:** sono i prodotti finali della fotosintesi rappresentati dai  $\beta$ -D-glucani (es. crisolaminarina) e sono contenuti in vescicole. Durante la fase esponenziale e stazionaria la quantità di crisolaminarina può rappresentare l'80% del peso secco. In linea generale i glucani aumentano in condizioni di carenza di nutrienti, quando le proteine diminuiscono;

**polisaccaridi extracellulari:** sono complessi eteroglicani e la loro struttura differisce notevolmente dai carboidrati intracellulari. Spesso formano rivestimenti viscosi intorno alle cellule, con funzione di aggregazione cellulare, scambio ionico, protezione da predatori e locomozione per le specie bentoniche.

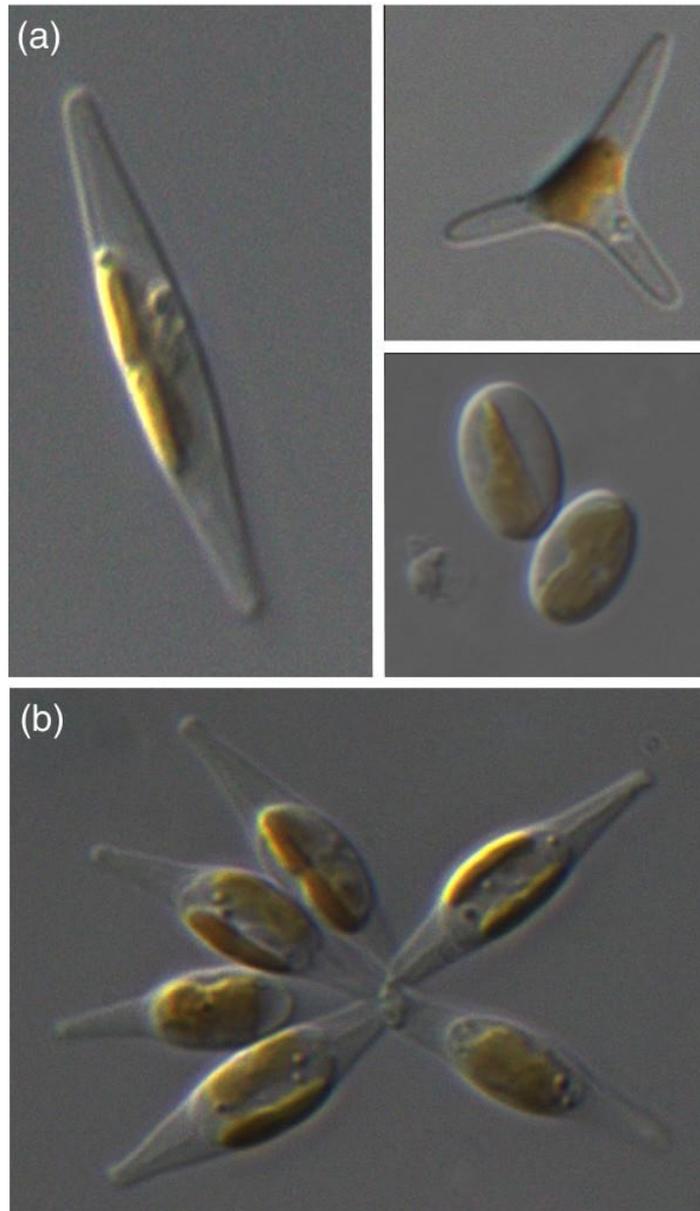


Fig. 5 I diversi morfotipi di *P. tricornutum* ([www.genomebiology.com](http://www.genomebiology.com))

Il polisaccaride di riserva prodotto, il  $\beta$ -1,3 glucano crisolaminarina, è un composto solubile in acqua molto simile alla laminarina delle alghe brune. Questi polisaccaridi possono avere importanza commerciale, tuttavia la maggior parte degli studi eseguiti fino ad ora hanno riguardato le alghe brune.

E' stata studiata la capacità dei  $\beta$ -1,3 glucani, in particolare della laminarina, di inibire l'attacco cellulare da parte di *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Vibrio parahaemolyticus*, tre batteri dannosi per la salute umana (Kuda et al., 2015). Altre caratteristiche osservate consistono nella capacità di protezione nei confronti di batteri patogeni, aumentando le cellule B e le T-helper del sistema immunitario, e di ridurre i livelli di colesterolo e la pressione sistolica (Kraan, 2012).

Inoltre questi polisaccaridi, non essendo digeriti dagli enzimi intestinali, vengono fermentati dalla microflora intestinale, similmente ai probiotici (An et al., 2012) e si è visto come gli oligosaccaridi della laminarina promuovano, a livello intestinale, la crescita dei ceppi di *Bifidobacterium* (Kuda et al., 1992).

Gli effetti protettivi nei confronti di patogeni non vengono esplicitati solo nei confronti dell'uomo o di altri animali, in quanto è stato osservato come la laminarina sia capace di indurre nelle piante la produzione di molecole specifiche, quali proteine, fitoalessine, callosio e lignina, nei confronti di agenti infettivi. Queste molecole scatenano risposte localizzate nel punto di infezione ma determinano anche una reazione sistemica più generale, quale appunto la Resistenza Sistemica Acquisita (SAR) o la Resistenza Sistemica Indotta (ISR). Ad esempio si è visto come la laminarina sia in grado di fungere da elicitore nelle risposte difensive ed induttore di resistenza nei confronti di *Botrytis cinerea* e *Plasmopora viticola* nella vite (Burketova et al., 2015).

Anche se i carboidrati hanno il più basso contenuto di energia,  $15.7 \text{ kJ g}^{-1}$ , in confronto agli altri principali composti, quali lipidi  $37.6 \text{ kJ g}^{-1}$  e proteine  $16.7 \text{ kJ g}^{-1}$  (Wilhelm et al., 2011), possono anch'essi essere usati per la produzione di biocarburanti (come il bioetanolo, biobutanolo, bioidrogeno, etc.) mediante digestione anaerobica, fermentazione anaerobica e produzione biologica di bioidrogeno (Markou et al., 2012).

In condizioni di limitazione dei nutrienti si è visto come il metabolismo delle diatomee prediliga la formazione di lipidi e carboidrati a discapito delle proteine (Geider et al., 2002). In particolare, in condizioni di carenza di azoto si è registrata una diminuzione della taglia cellulare in *P. tricornutum* e si è visto come lo stoccaggio del carbonio avviene prevalentemente in forma di carboidrati (Chauton et al., 2014).

Anche i pigmenti accessori di questa diatomea in particolare il  $\beta$ -carotene (appartenente ai caroteni) e la fucoxantina (appartenente alle xantofille) possono essere impiegati nella

nutraceutica. Il  $\beta$ -carotene è la principale fonte di vitamina A necessaria per l'attività della retina e nella regolazione dell'espressione genica. (Fu et al., 2015).

Si è visto come i caroteni, grazie alla loro capacità di captare i ROS (specie reattive dell'ossigeno), svolgono un importante ruolo antiossidante e possono essere usati come additivi naturali per preparati alimentari e nella cosmetica (Goiris et al., 2012).

La fucoxantina ha impieghi importanti nella salute umane come anti-ossidante, anti-cancro, contro obesità e diabete; inoltre grazie al suo caratteristico colore marrone-bruno viene impiegata anche come colorante nell'industria alimentare e cosmetica (Fu et al., 2015).

Recenti studi mostrano anche l'importanza di caroteni e fucoxantina nella dieta delle persone affette da cancro grazie alla loro capacità anti-ossidante, a quella di inibire la proliferazione di cellule cancerogene, di causarne la morte e la soppressione della metastasi. (Padua et al., 2015).

Per incrementare la produzione di carotenoidi a livello industriale è stato sperimentato l'utilizzo di LED con irradianza rossa e blu combinata (50:50) e si è visto che l'efficienza fotosintetica aumentava dell'1.3% rispetto all'utilizzo di LED ad irradianza rossa grazie alla mancanza in questi organismi di clorofilla b che assorbe primariamente lo spettro d'onda blu. Risulta, inoltre, importante la luce blu per l'adattamento di *P. tricornutum* ad alte intensità luminose (Fu et al., 2015).

### 1.3 Sistemi industriali di coltivazione

Per l'estrazione dei prodotti utili dal punto di vista commerciale è necessario che la specie prescelta raggiunga elevati livelli di biomassa. Per fare ciò lo sviluppo di sistemi di coltivazione avviene con due modalità: sistemi aperti e sistemi chiusi.

I sistemi aperti includono stagni naturali, vasche circolari (circular ponds), vasche allungate (raceway ponds) e sistemi inclinati (Zittelli et al., 2013).

Tra questi, i principali sistemi utilizzati sono i raceway ponds, che presentano costi di produzione e mantenimento bassi, alto tasso di crescita ma alti livelli di contaminazione da parte di predatori o altre specie microalgali, per cui la produzione di biomassa algale con questi sistemi tende ad essere ristretta solo a specie estremofile. Mantenendo la coltura ad esempio con pH o salinità elevate viene limitato l'attacco da agenti contaminanti (Darzins et al., 2010). Infatti le specie coltivate con maggiore successo in simili sistemi sono specie che hanno criteri di selettività, quali *Arthrospira* (alta alcalinità), *Dunaliella* (alta salinità) e *Chlorella* (alti nutrienti) (Richmond, 1999).

I raceway ponds (Fig.6) consistono in circuiti di canali paralleli dove la coltura viene fatta circolare da pale. In sistemi del genere l'evaporazione a causa della fluttuazione della temperatura è significativa, inoltre le precipitazioni possono diluire la concentrazione dei nutrienti e la concentrazione della biomassa (Tredici et al., 2010). Per aumentare l'efficienza dell'intero sistema le pale tradizionali sono state sostituite con delle pompe ed è stato notato che la produttività del sistema è simile alle vasche con le pale ma vi è un risparmio in acqua ed energia per il mixaggio (Zittelli et al., 2013). Rimane comunque complesso il mantenimento di una buona crescita della coltura nei sistemi all'aperto non solo per le contaminazioni ma anche per le fluttuazioni naturali di temperatura, luce, quantità di nutrienti, CO<sub>2</sub> in quanto la coltura è a diretto contatto con l'ambiente esterno (Darzins et al., 2010).



*Fig.6 Raceways ponds in Germania*

I sistemi chiusi sono i fotobioreattori (PBR). Possono essere definiti come sistemi di coltura per fototrofi dove i fotoni, che sono la principale risorsa di energia per la crescita, non sono a diretto contatto con la superficie della coltura ma passano attraverso le pareti trasparenti del reattore prima di incontrare le cellule. Lo scambio di gas, liquidi e particellato con l'atmosfera è nullo o ridotto ai minimi termini (Tredici et al., 2010).

I PBRs possono essere classificati sulla base del design, in base al loro modo di funzionamento, al materiale (Zittelli et al., 2013).

Per quanto riguarda la classifica in base al design abbiamo:

- Piatti o tubulari;
- Orizzontali, inclinati, verticali o a spirale;
- Collettori e serpentine;
- Ibridi;
- Galleggianti;
- A biofilm.

In base al loro metodo di funzionamento possiamo avere:

- Mescolati con aria o pompa;

- A singola fase (riempiti con dei supporti e gli scambi di gas avvengono in determinati scambiatori);
- A due fasi (gas e liquidi sono presenti e il trasferimento di gas avviene nel reattore stesso).

In base al materiale abbiamo reattori in:

- Vetro o plastica o resina;
- Rigidi o flessibili.

Il design più diffuso e preferito per la produzione industriale di microalghe è la forma tubulare (Fig.7). Di solito questi PBR sono costruiti in plastica/resina o vetro e la coltura viene fatta circolare con una pompa o con un sistema di aereazione; possiamo avere serpentine, collettori o fotobioreattori elicoidali.

Le serpentine sono costituite da una serie di tubi collegati tra loro con anse a U per formare, appunto, una serpentina che può essere posizionata verticalmente o orizzontalmente. La coltura circola a circa 20/30 cm/s per mezzo di un sistema di aereazione o una pompa. Il primo impianto pilota tubulare orizzontale si ottenne nei primi anni '50 al Massachusetts Institute of Technology (Tredici et al., 2010).

I collettori sono una serie di tubi paralleli collegati alle estremità da due canali: uno per la distribuzione e uno per la raccolta della biomassa. I principali vantaggi di questi sistemi sono la riduzione della perdita di carico e la bassa concentrazione di ossigeno, due fattori che facilitano lo sviluppo nei sistemi industriali (Tredici et al., 2010).

I PBR elicoidali consistono in tubi flessibili dal piccolo diametro avvolti attorno ad una struttura verticale detta biocoils. Questo design venne usato per la prima volta negli anni '50 per la coltivazione di *Chlorella* ma al momento non vi sono impianti industriali che utilizzano questo modello di PBR (Zittelli et al., 2013).

I reattori piatti verticali o inclinati possono essere orientati per modificare la luce che colpisce la superficie, che influenza notevolmente la produttività dei sistemi (Zittelli et al., 2013). Inoltre possono essere “impacchettati” per formare una sorta di sistema laminare con una alta efficienza fotosintetica (Carlozzi, 2003).

I sistemi ibridi, invece, cercano di unire le caratteristiche dei sistemi aperti con quelle dei sistemi chiusi. Ve ne sono di due tipi: il primo è costituito sostanzialmente da una

vasca con una copertura sulla superficie per separare la coltura dall'ambiente esterno cercando di ridurre le contaminazioni; il secondo tipo è caratterizzato da un design pseudo-tubulare ma disteso e gonfiato tanto da sembrare una copertura dei sistemi aperti. (Zittelli et al., 2013)

Vi sono poi i sistemi fluttuanti che includono PBR sviluppati nei corpi d'acqua ancorati per evitare il trasporto al largo da correnti sfruttando così la superficie dell'acqua che rappresenta la superficie più estesa sulla Terra. Sono utili in zone costiere fortemente urbanizzate, per evitare lo sfruttamento di superficie terrestre utile ad altre attività (Zittelli et al., 2013).

Indipendentemente dal tipo di sistema di coltura scelto, per massimizzare la produttività bisogna rispettare determinate linee guida (Posten, 2009):

- Adeguato mixaggio che fornisce alle cellule lo stesso ciclo di luce-buio prevenendo il biofouling;
- Un alto rapporto superficie/volume (S/V) per aumentare la concentrazione cellulare e la produttività volumetrica;
- Controllo della temperatura cercando di mantenerla intorno all'ottimale della specie algale coltivata;
- Accurato controllo di pH, CO<sub>2</sub> e concentrazione dei nutrienti;
- Adeguato sistema di raccolta per mantenere la popolazione con densità ottimale;
- Un'inclinazione e orientamento del PBR per limitare la fotoinibizione e massimizzare l'efficienza fotosintetica.

La produttività dei PBR può essere valutata come:

- Produttività volumetrica (VP) ossia la biomassa prodotta per volume del reattore in un'unità di tempo (g/L/d);
- Produttività per area (AP) ossia biomassa prodotta nell'unità di area occupata dai reattori in una unità di tempo (g/m<sup>2</sup>/d);



*Fig.7 Esempio PBR tubulari*

- Produttività della superficie illuminata (ISP) biomassa prodotta nell'area della superficie illuminata in un determinato arco di tempo ( $\text{g/m}^2/\text{d}$ ).

In caso di reattori tubulari stanziati ad una certa distanza tra loro lo spazio vuoto viene considerato come spazio occupato nel calcolo della AP. La produttività di ampi sistemi è però difficile da valutare con questi soli 3 parametri per cui ne è stato incluso un quarto: la overall produttività per area (OAP) che si ottiene sommando la produzione dei reattori che costituiscono la pianta del sistema di produzione

dividendo il valore per il totale di superficie terrestre occupata da tutti i reattori (inclusi gli spazi vuoti), espressa come  $\text{g/m}^2/\text{d}$  (Tredici et al., 2010).

## 2 SCOPO DELLA TESI

*Phaeodactylum tricornutum* è una diatomea con caratteristiche utili allo sfruttamento industriale, sia per l'elevato numero di composti bioattivi che entrano nella sua composizione sia per la capacità l'elevato rendimento della crescita in sistemi industriali quali i fotobioreattori.

Molti degli studi precedenti si erano concentrati sulla quantità e qualità di lipidi che possono essere ottenuti da questo organismo, non solo in vista di un impiego nella nutraceutica ma anche perché si tratta di molecole utili a produrre biodiesel. Tuttavia, poiché anche i polisaccaridi e i pigmenti delle diatomee possono trovare impiego nella nutraceutica/farmaceutica, *P. tricornutum* può rappresentare un candidato eccellente per l'applicazione di un processo di bioraffineria. Con questo concetto si intende la necessità, più che la possibilità, di produrre biomassa algale con più di una finalità, in quanto solo così si possono ammortizzare i costi di produzione della biomassa che al momento sono piuttosto elevati.

Tutto il lavoro di tesi si è svolto presso l'azienda Micoperi Blue Growth (MBG), nello stabilimento di Ortona (CH). L'azienda si occupa di produzione di biomassa di microalghe in filiera controllata, per farne prodotti innovativi in diversi campi applicativi: alimentare, agricolo, medico e farmaceutico. Vista l'esperienza acquisita dall'azienda sull'effetto dei polisaccaridi provenienti da macroalghe brune nei confronti dei patogeni di piante ad uso agricolo, l'azienda è interessata nella ricerca di possibili effetti di polisaccaridi provenienti da microalghe contro agenti patogeni di piante da utilizzare, in particolare, per la coltivazione della vite.

In questo contesto si è inserito il mio lavoro di tesi volto all'ottimizzazione del contenuto polisaccaridico in monoculture di *Phaeodactylum tricornutum*.

Inizialmente sono state allestite colture di piccolo volume che hanno permesso di scegliere la condizione che dava i migliori risultati e, successivamente, è stata valutata la riproducibilità dei dati ottenuti utilizzando un sistema di coltivazione chiuso di scala industriale.

Il lavoro, è stato svolto in due fasi:

1. Nella prima fase l'esperimento è stato condotto su piccola scala con reattori da 1 L e la monocultura è stata sottoposta a due concentrazioni diverse di azoto, di cui una scelta in modo da permettere alle cellule di entrare in limitazione in tempi brevi. Ne è stata seguita la crescita per mezzo di misure di assorbanza, peso secco, pH, conta cellulare, determinazione dei macronutrienti ed è stata analizzata la composizione biochimica con determinazione dei composti polisaccaridici totali, determinazione qualitativa dei polisaccaridi, determinazione della clorofilla *a*, valutazione quantitativa e qualitativa dei lipidi.
2. Con la seconda fase si è voluto verificare la riproducibilità su larga scala di quanto notato nel primo esperimento, ossia la crescita di *P. tricornutum* e un incremento nella produzione dei polisaccaridi nel terreno con la minore concentrazione di azoto, in sistemi chiusi industriali. E' stata avviata una monocultura di *Phaeodactylum tricornutum* in PBR da 70L e ne è stata monitorata la crescita misurando assorbanza, peso secco, pH, quantità di macronutrienti nel terreno; la composizione biochimica è stata valutata determinando i polisaccaridi totali e la loro composizione qualitativa, le proteine totali, i lipidi totali e la composizione qualitativa.

## 3 MATERIALI E METODI

### 3.1 Disegno sperimentale

Per il primo esperimento le colture sono state cresciute in bottiglie di vetro da 1L con una salinità del 20 ‰ insufflate con aria (o CO<sub>2</sub>) e mantenute in camera algale termostata a 21±1°C. L'intensità luminosa è stata settata a 120 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> con un fotoperiodo di 16:8 h (luce: buio), inoltre sono state agitate tramite agitatori magnetici. Il mantenimento del pH a livelli ottimali è stato effettuato con insufflazione di CO<sub>2</sub> pura a 2 L/min nei giorni di analisi per 3 min.

Per mantenere le colture algali in condizioni sterili, le attrezzature usate giornalmente per il monitoraggio della coltura sono state sterilizzate in autoclave ad 1 atm per 20 min a 121 °C e le colture sono state manipolate sotto cappa a flusso laminare.

Le condizioni di coltura per quanto riguarda il terreno sono state due. Per la prima il mezzo di coltura usato è stato il Medium f/2 (Guillard and Ryther, 1962) modificando solo le concentrazioni di N e P fino ad ottenere una concentrazione X volte superiore, ovvero un 4f (Tab.1). Per la seconda, a partire dal 4f, si è ridotto di 1/3 l'apporto di N (Tab.2). Ogni condizione è stata studiata in triplicato (Fig.1).

<b>Nutrienti</b>	<b>Stock (g/200 ml)</b>	<b>ml/l</b>	<b>Medium g/l</b>
NaNO <sub>3</sub>	120	1	0,6
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	8	1	0,04
HEPES	46 (pH 7,1-7,3)	1	0,23
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	2,58	1	0,013
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,0034	0,080	-
Vitamine	-	0,5	-
Elementi in traccia+ EDTA	-	1	-
<b>Soluzione Stock</b>			
<b>Elementi in traccia+ EDTA</b>	<b>g/100 ml</b>	<b>Medium mg/l</b>	
EDTA	0,359	3,59	
FeCl <sub>3</sub>	0,189	1,89	
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,00098	9,8x10 <sup>-6</sup>	
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0022	22x10 <sup>-6</sup>	
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,001	10x10 <sup>-6</sup>	
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,018	180x10 <sup>-6</sup>	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,00063	6,3x10 <sup>-6</sup>	
<b>Vitamine</b>	<b>Stock mg/100 ml</b>	<b>Medium mg/l</b>	
Thiamine B <sub>1</sub>	20	0,1	
Cobalamine B <sub>12</sub>	100	0,05	
Biotin	10	0,005	

*Tab.1 Terreno 4f*

<b>Nutrienti</b>	<b>Stock (g/200 ml)</b>	<b>ml/l</b>	<b>Medium g/l</b>
NaNO <sub>3</sub>	40	1	0,2
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	8	1	0,04
HEPES	46 (pH 7,1-7,3)	1	0,23
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	2,58	1	0,013
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,0034	0,080	-
Vitamine	-	0,5	-
Elementi in traccia+ EDTA	-	1	-
Soluzione stock  <b>Elementi in traccia+ EDTA</b>	<b>g/100 ml</b>	<b>Medium mg/l</b>	
EDTA	0,359	3,59	
FeCl <sub>3</sub>	0,189	1,89	
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,00098	9,8x10 <sup>-6</sup>	
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0022	22x10 <sup>-6</sup>	
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,001	10x10 <sup>-6</sup>	
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,018	180x10 <sup>-6</sup>	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,00063	6,3x10 <sup>-6</sup>	
<b>Vitamine</b>	<b>Stock mg/100 ml</b>	<b>Medium mg/l</b>	
Thiamine B <sub>1</sub>	20	0,1	
Cobalamine B <sub>12</sub>	100	0,05	
Biotin	10	0,005	

*Tab.2 Terreno con 1/3 N rispetto a 4f*

Tutte le soluzioni stock una volta preparate vengono autoclavate, tranne le vitamine, che essendo termolabili, vengono sterilizzate tramite filtrazione (con filtri Millipore di porosità 0,22  $\mu\text{m}$  in grado di trattenere la componente batterica) sotto cappa sterile.

La base dei terreni è acqua di mare sintetica preparata con Sali Ocean Reef ad una salinità del 20 ‰ e successivamente anch'essa autoclavata.

Per il secondo esperimento è stato inoculato un PBR anulare verticale da 70 L con 30 L di coltura e portato a volume. il terreno scelto è stato quello con N ridotto a 1/3 rispetto al 4f; le concentrazioni g/L dei nutrienti quindi sono quelle della Tab.2. La salinità è stata mantenuta al 20 ‰.

Il PBR era illuminato con luce di irradianza pari a  $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con neon cool white e insuflato/agitato a 4 L/min con aria. Il controllo del pH avveniva con insufflazione di  $\text{CO}_2$  pura tutti i giorni del prelievo per 5 min a 2 L/min. Le analisi sui campioni prelevati dal PBR sono state effettuate in triplicato.



*Fig.1 Allestimento esperimento in camera algale termostata*

## 3.2 Valutazione della crescita

La crescita algale segue un tipico andamento costituito da 4 fasi (Fig.1):

- Fase di *latenza* o *lag*: è una fase di adattamento al nuovo ambiente dalla durata variabile in base alla consistenza dell'inoculo, alle nuove condizioni della coltura e alle sue caratteristiche fisiologiche. Non vi è un aumento nel numero di cellule;
- Fase di crescita *esponenziale* dove vi è un rapido aumento del numero di cellule e la crescita è lineare;
- Fase *stazionaria* che coincide con l'esaurimento di nutrienti nel mezzo di coltura, dove il numero di cellule rimane stabile e può durare varie settimane;
- Fase *senescente* in cui le cellule tendono a morire, essendo sospesa sia la fase di divisione cellulare sia la fase metabolica. (Fig.2).



Fig.2 Curva di crescita

La crescita di una coltura microalgale può essere valutata in diversi modi, in questi esperimenti si è scelto di utilizzare 3 metodi: conta cellulare, torbidità e peso secco.

### 3.2.1 Conta cellulare

Uno dei metodi più semplici per stimare la biomassa algale è quello di contare le cellule presenti in un determinato volume d'acqua. Vengono prelevati 5 mL di campione da tutte le repliche delle due condizioni studiate per un totale di sei campioni e, posizionati

in provette, vengono fissati con una soluzione di Lugol a base di iodio-ioduro. Da questi 5 mL viene prelevato 1 mL, mentre il campione restante viene conservato in caso di eventuali errori e verifiche. Il volume prelevato viene diluito 200 volte e un'aliquota di 1 ml viene lasciata sedimentare per almeno 30 min nella camera di sedimentazione. Quindi le cellule vengono contate con il metodo dei campi, viste le alte concentrazioni che possono raggiungere; per ogni campione sono stati contati 30 campi. Il conteggio si effettua utilizzando un microscopio Zeiss Axiovert S 100 con obiettivo 32X.

Si procede calcolando la media delle alghe contate nei diversi campi e si moltiplica per un fattore (F) del valore di 1497 e il fattore di diluizione, ottenendo così il numero di cellule algali presenti in un millilitro di coltura. Il fattore F è calcolato in base al rapporto tra l'area della camera di sedimentazione e l'area del campo.

Questa analisi è stata effettuata solo sul primo esperimento per ogni replica a giorni alterni.

Il tasso di crescita della diatomea è stato calcolato tramite la seguente equazione:

$$\mu = \ln (X_1 / X_0) / (t_1 - t_0)$$

dove:

$\mu$  = tasso di crescita calcolato nell'intervallo  $t_1 - t_0$ ;

$X_1/X_0$  = rapporto del numero di cellule al tempo 1 e al tempo 0 rispettivamente;

$t_1 - t_0$  = intervallo temporale.

Il tasso di crescita viene espresso come frequenza di divisioni giornaliere (giorni<sup>-1</sup>).

### **3.2.2 Analisi della torbidità**

La torbidità della coltura viene misurata spettrofotometricamente a giorni alterni in entrambi gli esperimenti usando come bianco l'acqua demineralizzata, alla base del terreno della coltura. La lunghezza d'onda impostata è 750 nm in quanto a questo valore non si ha assorbimento da parte della clorofilla e viene evidenziata solo la torbidità della sospensione.

Lo spettrofotometro usato è a doppio raggio VWR UV-6300 PC.

### 3.2.3 Analisi del peso secco

Per il peso della biomassa filtrata ed essiccata vengono usati filtri Whatman GF/C dal diametro di 47mm. I filtri, prima di essere usati, sono lasciati in stufa ad 80° C almeno un giorno. Prima della tara vengono depositi in essiccatore per venti minuti, dopodiché presa la tara vengono usati per filtrare la coltura. Quindi il filtro contenente le microalghe viene lavato con 20 mL di formato d'ammonio (pari volume del filtrato) per eliminare i sali in eccesso e, a questo punto, riposto nuovamente in stufa a 80 °C per un'ora e mezza. Prima della pesata finale il filtro viene spostato dalla stufa all'essiccatore per evitare che lo sbalzo di temperatura influenzi la pesata. Dopo venti minuti si procede con la pesata del filtro. A questo valore viene sottratta la tara e il valore ottenuto diviso per il volume filtrato.

Suddetto procedimento è usato per entrambi gli esperimenti, a giorni alterni.

La produttività è calcolata con la seguente equazione:

$$P_{(t_1-t_0)} = (DW_{t_1} - DW_{t_0}) / (t_1 - t_0)$$

Dove:

$P_{(t_1-t_0)}$  = produttività calcolata nell'intervallo  $t_1-t_0$  ;

$DW_{t_1} - DW_{t_0}$  = variazione del peso secco nell'intervallo  $t_1-t_0$ ;

$t_1 - t_0$  = intervallo temporale espresso in giorni.

La produttività è espressa come rapporto della variazione della biomassa per giorno (g/L/giorno).

### 3.3 Composizione cellulare

#### 3.3.1 Analisi della clorofilla *a* totale

La clorofilla *a* totale è stata analizzata solo nel primo esperimento, a giorni alterni. La biomassa utilizzata è stata filtrata su filtri Whatman GF/C (1.2µm porosità nominale) dal diametro di 25 mm e usata previo congelamento in provette di plastica da 15 mL. Al filtro vengono aggiunti 3 mL di acetone puro e, dopo avere mescolato sul vortex per 30 sec, la sospensione è stata incubata per 10 min a 4°C. Successivamente il campione è stato centrifugato a 1100 x *g* per 10 min a 4°C con centrifuga VWR Mega Star 1.6R.

Il sovranatante è stato trasferito in provette tramite pipette pasteur e conservato al buio (Fig.3) a 4°C. L'estrazione è stata ripetuta dalle 2 alle 5 volte per campione collezionando il sovranatante sempre nella stessa provetta. Al termine delle operazioni i campioni (contenenti tutti i sovrinatanti raccolti) sono stati portati tutti allo stesso volume con acetone puro e letti a 630-647-664-750 nm contro acetone puro.

La formula utilizzata per il calcolo di "Chl *a* totale" è la SCOR-UNESCO (1966):

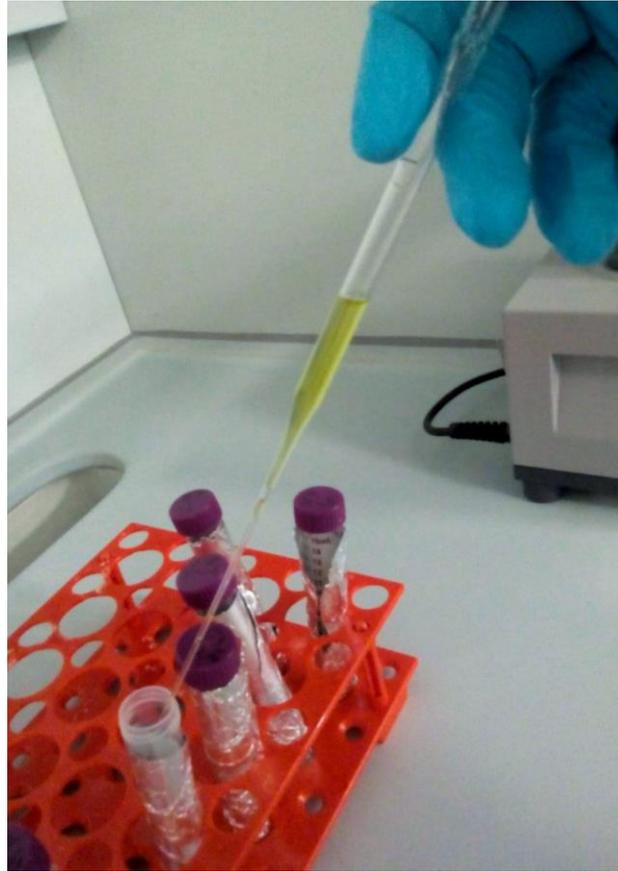
$$\text{Chl } a \text{ totale (mg/m}^3\text{)} = (11.84 * E_{664} - 1.54 * E_{647} - 0.08 * E_{630}) * F$$

dove:

E<sub>664</sub>, E<sub>647</sub>, E<sub>630</sub> sono i valori di assorbanza alle lunghezze d'onda di 664,647,630 nm;  
11.84, (-1.54), (-0.08) sono fattori di correzione delle lunghezze d'onda 664, 647, 630 rispettivamente;

F è il fattore che riporta la concentrazione di clorofilla dalla soluzione acetonica al campione originale. Si calcola:

<b>(mL estratto acetónico)</b>
<b>F=</b> _____
<b>(L campione filtrato/cammino ottico cuvetta)</b>



*Fig.3 Trasferimento del sovrinatante nelle provette dopo la centrifugazione*

### **3.3.2 Analisi dei polisaccaridi totali**

Per l'estrazione dei composti polisaccaridici si è seguito il metodo di Myklestad (1972) modificato: vengono filtrati 5 mL di coltura su filtro Whatman GF/C (1.2  $\mu\text{m}$  porosità nominale) dal diametro di 25 mm e usato previo congelamento in provette di plastica da 15 mL. Al campione viene aggiunto 1 mL di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  12M (Fig. 4) e incubato a 37°C per 1h. Successivamente vengono aggiunti 11 mL di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata e, dopo aver mescolato sul vortex per 30 sec, incubato a 100°C per 2h. Dopo quest'ultima incubazione i campioni vengono centrifugati a 1100 x g per 15 min a 15°C.

Per la determinazione (Dubois, 1956 modificato) vengono prelevati 100  $\mu\text{l}$  di campione e posti in un tubo di vetro. A questo volume di campione vengono aggiunti 1 mL di fenolo 2.5% e 2.5 ml di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  95% e lasciato incubare per 30 min (Fig.5). Dopo ciò si procede con la lettura a 490 nm contro bianco con  $\text{H}_2\text{O}$  distillata.

La determinazione richiede l'assenza di luce vista la sensibilità di fenolo e  $H_2SO_4$  alla luce.

I campioni vengono letti utilizzando una curva di taratura precedentemente allestita utilizzando come soluzione madre il glucosio con concentrazioni da 0  $\mu\text{g/mL}$  a 640  $\mu\text{g/mL}$ .

Questo metodo è stato utilizzato per la determinazione dei polisaccaridi sia nel primo che nel secondo esperimento.



*Fig.4 Aggiunta di 1 ml di  $H_2SO_4$  al filtro contenente la biomassa da analizzare*



Fig.5 Determinazione di polisaccaridi totali

### 3.3.3 Determinazione proteine totali

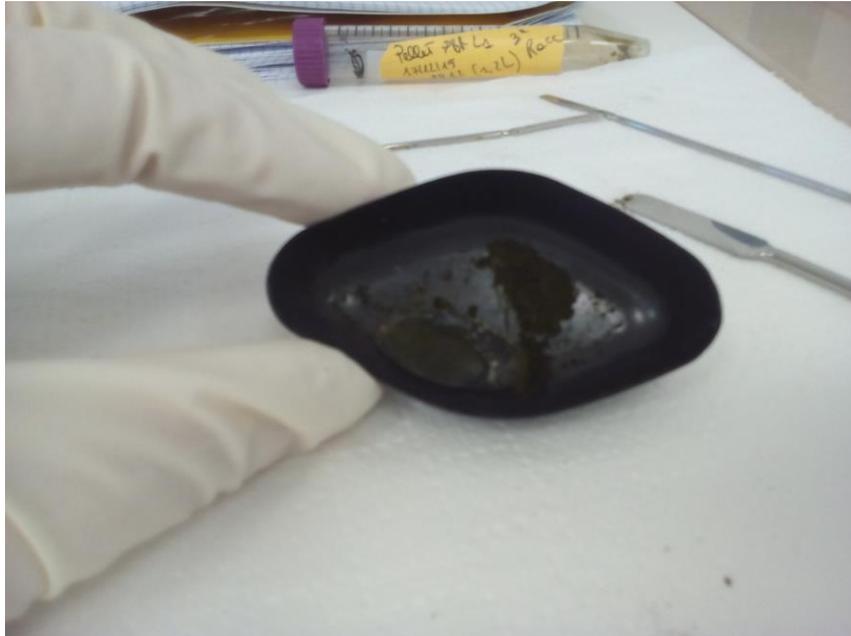
Per l'estrazione delle proteine totali (effettuata sul secondo esperimento) si è scelto di seguire il metodo di Rausch, 1981, ottimizzato per l'estrazione da *Phaedactylum tricornutum*.

Per ogni campione è stata pesata una quantità nota di biomassa, tra i 5 e i 30 mg, liofilizzata tramite liofilizzatore da banco LABCONCO Free Zone 4.5 (Fig.6).

Ad ogni campione posto in provette da 15 ml sono stati aggiunti 3 mL di NaOH 0.5 M e mescolato sul vortex. I tubi sono stati incubati a 90°C per 15 min e, successivamente, lasciati raffreddare in ghiaccio per 2 min. Dopo il raffreddamento sono stati centrifugati a 1100 x g a 4°C per 5 min; è stato raccolto il sovrantante con pasteur di vetro e posizionato in provette da 15 mL (Fig. 7). I passaggi che vanno dall'aggiunta dell'NaOH alla raccolta del sovrantante (sempre nella stessa provetta) vengono ripetuti dalle 2 alle 6 volte. Mentre si ripetono le operazioni le provette di raccolta vengono mantenute in frigo per evitare la degradazione delle proteine.

Terminate queste operazioni vengono portate a volume le provette di sovrantante e viene determinato l'estratto di proteine seguendo il metodo di Lowry, 1951. Quest'ultimo metodo è basato su una reazione colorimetrica tra il reattivo di Folin

(fosfomolibdato, fosfotungstato, sali rameici) con gli aminoacidi contenenti anelli aromatici.



*Fig.6 Biomassa di Phaeodactylum tricornutum liofilizzata*

Il composto colorato viene letto allo spettrofotometro a 750 nm con riferimento ad una curva di taratura effettuata usando come standard albumina bovina a concentrazioni note.

Per la determinazione vengono usate 3 soluzioni:

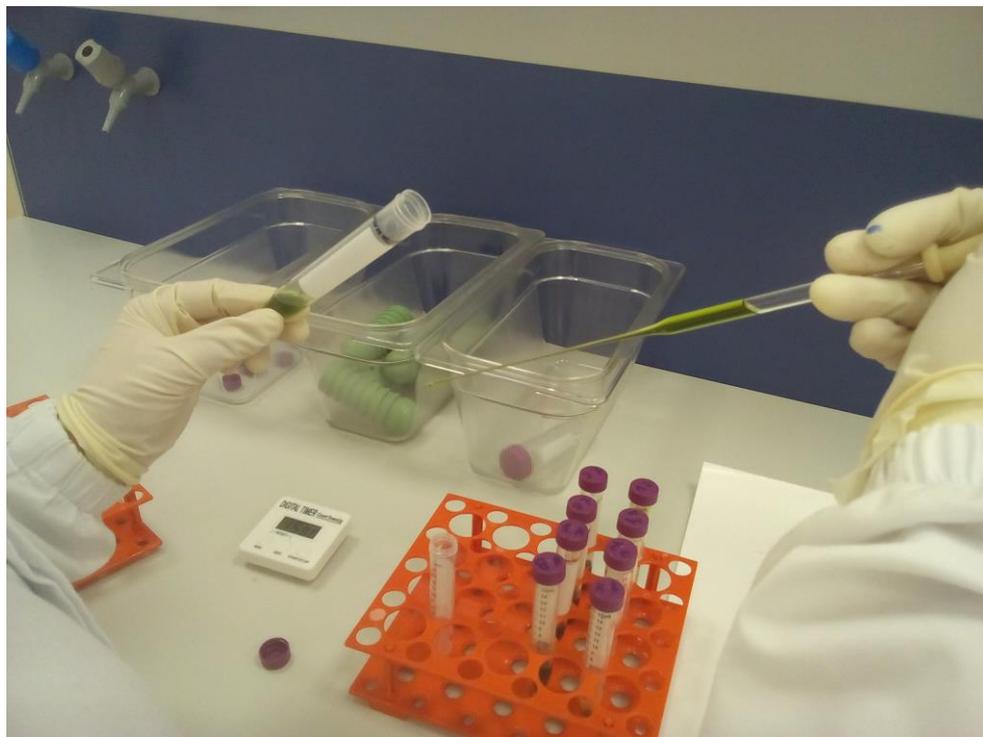
1. 10 gr di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in 100 mL di NaOH 0.5M
2. 0.5 gr di Na oppure K tartarato in 50 mL di  $\text{H}_2\text{O}$
3. 250 mg di  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  in 50 mL della soluzione 3

Con queste soluzioni vengono preparati i reattivi da usare al momento:

- A. 10 parti sol.1 + 1 parte sol. 3
- B. 3 parti di Folin Cicalteau + 27 parti di  $\text{H}_2\text{O}$ .

Un volume noto di campione (250  $\mu\text{l}$ ) viene messo in tubi di vetro e portato a volume di 1 mL con NaOH 0.5M. Viene aggiunto 1 mL della sol. A, mescolato sul vortex e incubato per 10 min. Successivamente vengono aggiunti 3 mL della sol. B e si attende

30 min (fig.8). Il composto viene letto allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 750 nm.



*Fig.7 Prelievo sovrantante per determinazione proteine totali*



*Fig.8 Determinazione delle proteine totali*

### **3.3.4 Isolamento della frazione lipidica**

Il campione liofilizzato (dai 100 mg ai 200 mg) è stato estratto con una miscela di  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (6 mL, 2:1 v/v) a riflusso per 1.5 h per 3 volte. Il campione è stato centrifugato a  $1100 \times g$  per 5 min e il solvente recuperato sempre nella stessa vials e seccato sotto vuoto. Il contenuto lipidico è espresso in base al peso del campione analizzato (wt%) (Bligh et Dyer, 1959).

#### **3.3.4.1 Determinazione degli acidi grassi totali (TFA, comprendenti acidi grassi liberi e acidi grassi legati)**

Un'aliquota della frazione lipidica (2 mg) è stata disciolta in 0,4 mL di dimetil carbonato (solvente di reazione), 0,1 mL di 2,2-dimetossipropano e 0,1 mL di metossido di sodio. I campioni sono stati posti in agitazione 30 min a 50/60°C. Successivamente sono stati aggiunti 2 mL di brine, 1 mL di esano e 0.02 mg di metil nonadecanato (standard interno per l'analisi quantitativa). I campioni sono stati centrifugati a 4000 rpm per 5 min e la fase organica (esano e dimetilcarbonato, contenente i TFA) analizzata mediante GC-MS.

### **3.3.5 Isolamento della frazione polisaccaridica**

Il residuo de-grassato è stato estratto con  $\text{H}_2\text{O}$  (3 mL) a 80°C per 1h per 2 volte. Il campione poi centrifugato per 5 min a 4000 rpm e il sovrinatante addizionato con EtOH (25 mL) e posto a -20°C per 24h. La frazione polisaccaridica è stata raccolta dopo centrifugazione e seccata sotto azoto.

#### **3.3.5.1 Determinazione dei monosaccaridi**

Tutta la frazione polisaccaridica è stata disciolta in  $\text{NHCl}$  (1 mL) e posta in agitazione per 1 min a 80°C. Un'aliquota (0,2 mL) è seccata sotto azoto e sottoposta a sililazione con bis- di trimetilsililtrifluoroacetamide (BSTFA, 0.05 mL) contenente 1% di trimetilclorosilano (TMCS) e piridina (0,02 mL). La soluzione è posta in incubatore ad 80°C per 30 min ed analizzata mediante GC-MS.

#### **3.3.5.2 Analisi GC-MS**

Le analisi GC-MS sono state effettuate mediante un GC 6850 Agilent HP connesso con uno spettrofotometro di massa 5975 Agilent HP. La temperatura dell'iniettore è stata settata a 280°C. Gli analiti sono stati separati tramite una colonna capillare HP-5 fusesilica (fase stazionaria poli [5% difenil/95% dimetil]silossano, 30 m, 0,25 mm i.d., 0,25

mm film thickness) usando elio come gas carrier. Gli spettri di massa sono stati acquisiti mediante ionizzazione elettronica (70 eV) ad una frequenza di 1 scan per secondo, nel range 12-600 m/z. La programmata termica usata per analizzare i TFA è stata: da 50°C a 180°C con un gradiente di 50°C min<sup>-1</sup>, seguito da 10 min a 325°C.

La programmata tecnica per analizzare i monosaccaridi è stata: da 50°C a 325°C con un gradiente di 50°C min<sup>-1</sup>, seguito da 10 min a 325°C.

L'analisi quantitativa dei TFA e dei monosaccaridi è stata effettuata assumendo un fattore di risposta unitario rispetto agli standard interni (metil nonadecanoato e sorbitolo, rispettivamente).

### 3.4 Determinazione del consumo dei nutrienti

Le analisi dei nutrienti (fosfati e nitrati) vengono effettuate sul terreno di coltura separato dalle cellule per filtrazione su filtri GF/C e conservato in provette da 50 mL a -20°C.

La velocità di uptake dei nutrienti è stata calcolata usando la seguente formula

$$U = -(C_1 - C_0) / \gamma \Delta t$$

dove:

C = la concentrazione residua nel terreno del nutriente preso in considerazione;

$\gamma \Delta t$  = variazione nell'arco di tempo preso in esame ( $\Delta t$ ) nella densità algale in termini di biomassa.

Inoltre

$$\gamma = B_1 - B_0 / \ln B_1 - \ln B_0$$

dove:

B<sub>1</sub> e B<sub>0</sub> = biomassa al tempo 1 e al tempo 0.

#### 3.4.1 Determinazione del fosforo reattivo

La determinazione del fosforo reattivo è stata effettuata in accordo con Strickland e Parsons, 1972.

Vengono usati matracci in vetro da 50 mL. Si prepara un reattivo misto costituito da molibdato ammonico (20 mL), acido solforico (50 mL), acido ascorbico (20 mL), soluzione di tartrato di potassio e antimonile (10 mL). Le quantità indicate sono sufficienti per 20 campioni.

Il campione è stato diluito per evitare che l'elevata concentrazione dei nutrienti falsasse la lettura spettrofotometrica. Dopo aver aggiunto il volume di campione stabilito, si porta a volume di 50 mL con H<sub>2</sub>O distillata. Il bianco è costituito da 50 mL di H<sub>2</sub>O distillata che è alla base del nostro terreno. Ad ogni campione, bianco incluso, vengono aggiunti 5 mL di reattivo misto con successiva agitazione per miscelare bene il reattivo con il campione. La reazione tra l'acqua e il reattivo misto fa sì che il campione assuma una colorazione blu (Fig.9), che varia in intensità a seconda della concentrazione di fosfati presenti: più è alta la concentrazione di fosfati, più la colorazione della soluzione

tenderà al blu. Dopo 10 min si legge il composto allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 885 nm. Il valore viene letto con riferimento ad una curva di taratura precedentemente effettuata usando come sale standard il  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .



*Fig. 9 Determinazione fosforo reattivo. Si notano le diverse intensità di blu dei due campioni*

### **3.4.2 Determinazione dei nitrati mediante colonna di cadmio metallico ramato**

Per l'analisi dei nitrati, i campioni prelevati vengono diluiti con acqua di mare sintetica fino al volume di 100 mL (Fig.10). Oltre ai campioni si prepara anche un bianco costituito esclusivamente da acqua di mare sintetica e uno standard, costituito da 100 $\mu\text{L}$  di soluzione standard di  $\text{N-NO}_3$  (140 mg/L) portato a un volume di 100 mL con acqua di mare sintetica. Ai campioni allo standard e al bianco così preparati sono aggiunti 2 mL di  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al 25% e successivamente vengono passati in una colonna di vetro contenente cadmio ramato per la riduzione dei nitrati a nitriti. Nel passaggio attraverso la colonna di riduzione i primi 45 mL vengono scartati (Fig.11) mentre 50 mL vengono raccolti in cilindri graduati. Avvenuta la riduzione, ai cilindri vengono aggiunti 2 ml di soluzione di SA (Solfanilammide all'1%) e dopo 3 minuti 1 mL di soluzione di NEDA (Naftiletildiammina allo 0,1%); si attende che avvenga la reazione colorimetrica per

15 minuti, dopo di che si misura l'assorbanza della soluzione a 543 nm contro acqua distillata. Per la determinazione dei nitrati, occorre sottrarre ai valori di assorbanza ottenuti per i campioni il rispettivo valore del bianco e procedere alla determinazione del fattore F per la determinazione dell'efficienza della colonnina in quanto può disattivarsi con l'utilizzo avanzato o a causa dell'inoperosità della stessa.

$$F = \frac{[N]diNO_3(0,14ppm)}{abs(st) - abs(bianco)}$$

Quando si impiega uno spettrofotometro il valore F dovrebbe avere un valore compreso tra 0,31 per un'efficienza del 100%, e 0,37, per un'efficienza dell'84%. Dopo il calcolo del fattore F la concentrazione dei nitrati si ottiene nel seguente modo:

$$mg/l(NdiNO_3) = \frac{F \cdot [abs(c) - abs(bianco)] \cdot 100}{V}$$

Dove:

F= fattore precedentemente calcolato;

abs (c)= assorbanza del campione corretta per i valori del bianco e per l'assorbanza dei nitriti;

V= è il volume in ml di acqua in esame prelevata per l'analisi.



*Fig.10 Diluizione campioni fino a 100 ml*



*Fig.11 Passaggio campione attraverso la colonnina contenente cadmio metallico  
ramato*

### **3.5 Analisi statistica**

Le differenze nella crescita e nei contenuti cellulari, sono stati testati tramite analisi della varianza (ANOVA) utilizzando il software PAST 3.0 (Hammer et al., 2001).

Ogni qualvolta una differenza significativa per l'effetto principale veniva osservata ( $p < 0,05$ ) un Tukey's pairways comparison test è stato applicato.

## 4 Risultati

In questo lavoro si è voluto valutare l'effetto dell'influenza dell'azoto sulla crescita e composizione della diatomea *Phaeodactylum tricornutum*. Visto l'obiettivo di ottimizzare il contenuto polisaccaridico e lipidico, la microalga è stata sottoposta ad una condizione di stress da carenza di azoto. Sono state create due condizioni in triplicato: per la prima, denominata N, il terreno di base utilizzato è stato il Medium f/2 (Guillard and Ryther, 1962) in cui solo le concentrazioni di N e P sono state modificate fino ad ottenere un terreno in cui questi nutrienti sono 4 volte più concentrati (4f); per la seconda, denominata N/3, a partire dal 4f, si è ridotto di 1/3 l'apporto di N. Questa parte dello studio è stata condotta in colture batch.

Le colture allestite in piccolo volume (1 L) ci hanno permesso di scegliere la condizione che dava i migliori risultati. Successivamente è stata valutata la riproducibilità dei dati ottenuti utilizzando un sistema di coltivazione chiuso, di scala industriale (PBR da 70L), utilizzando un metodo di crescita in semicontinuo.

### 4.1 Crescita di *Phaeodactylum tricornutum* in colture batch

#### 4.1.1 Andamento della crescita e del consumo dei nutrienti

La crescita di *Phaeodactylum tricornutum* sottoposto alle due diverse condizioni è stata analizzata in questa prima parte della tesi in termini di assorbanza, peso secco, crescita cellulare e consumo dei macronutrienti (N e P).

Di seguito sono riportate le curve di crescita della diatomea presa in considerazione, studiata con due concentrazioni di azoto differenti monitorando il consumo dei macronutrienti.

La coltura cresciuta ad alto contenuto di azoto (N) risulta subire all'inizio della crescita uno stress, probabilmente dovuto all'elevata concentrazione del nutriente preso in esame. In fig. 1 si vede come la sua crescita in termini di peso secco sia inferiore rispetto alla condizione con una minore concentrazione di azoto (N/3) fino al giorno 9.

I valori di peso secco misurati nelle due condizioni, infatti, nei giorni 0-7 non risultano significativamente diversi (ANOVA,  $p > 0.05$ ). Andando a confrontare queste osservazioni con i dati inerenti alla deplezione dell'azoto nel terreno (fig.4), si vede come la condizione N esaurisce questo nutriente in 11 giorni contro i 7 impiegati dalla condizione N/3. La velocità di uptake cellulare calcolata nei primi 7 giorni nella condizione N e nella condizione N/3 risulta effettivamente diversa (rispettivamente  $0.08 \text{ mmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  e  $0.59 \text{ mmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) dimostrando come la condizione N abbia, effettivamente, assimilato l'azoto ad una velocità inferiore rispetto alla condizione N/3 influenzando la crescita della biomassa.

Questo rallentamento è stato riscontrato anche nei valori relativi alle abbondanze cellulari (fig. 2) nei primi 4 giorni di monitoraggio delle colture. Sono stati riscontrati valori lievemente differenti tra le due colture in questo arco temporale (ANOVA,  $p > 0.05$ ) e il tasso di crescita calcolato non risulta essere differente nella condizione N/3 e nella condizione N (rispettivamente  $0,57 \text{ d}^{-1}$  e  $0,60 \text{ d}^{-1}$ ). Inoltre confrontando il tasso di crescita nelle due condizioni, lungo tutta la durata dell'esperimento (Tab.1), si nota come i valori siano molto simili (ANOVA,  $p > 0.05$ ) e quindi che la variazione nel contenuto di azoto non ha influenzato la crescita (valutata come  $\text{n}^\circ \text{cell/mL}$ ) nell'arco di tempo monitorato.

La fase di latenza non è stata notata nei valori di assorbanza (fig.3) dai quali si evince però una fase di plateau per le due colture a partire dal giorno 9. Non essendo stata registrata nelle altre due curve di crescita (fig.1, fig.2) si è dedotto che sia dovuta alla mancata diluizione del campione nei giorni di analisi falsando, quindi, la lettura spettrofotometrica.

Le analisi condotte sulla quantità di fosforo del terreno (Fig.6) ci mostrano come questo macronutriente presente nelle due colture in concentrazioni uguali, è stato consumato in 4 giorni con una velocità di uptake pari a  $0.11 \text{ mmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  per la coltura N e  $0.16 \text{ mmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  per la coltura N/3.

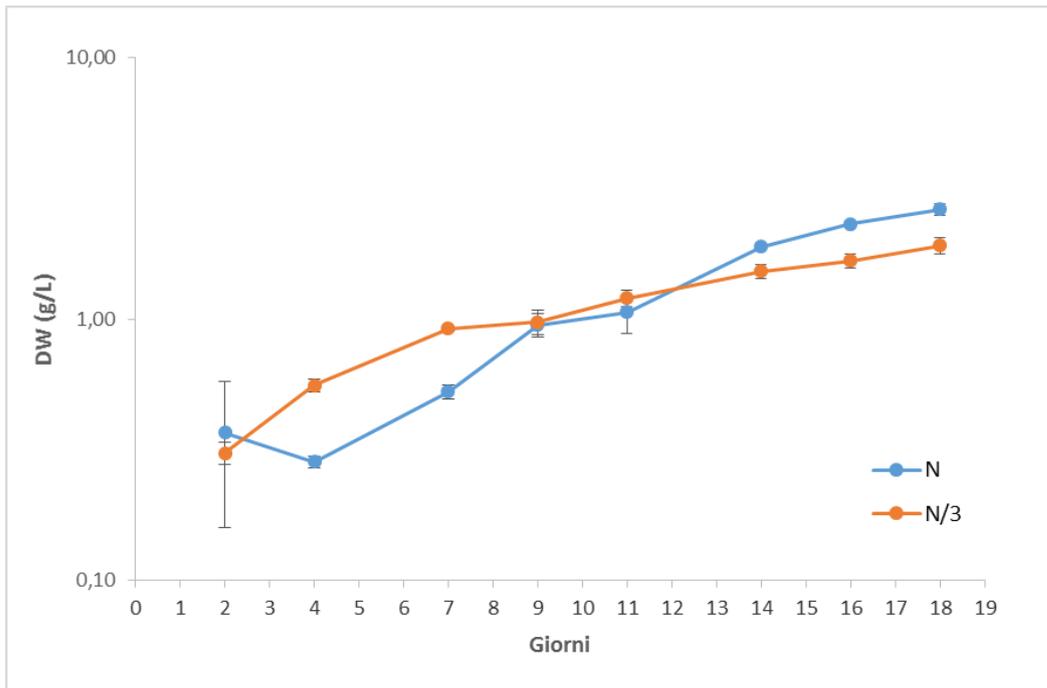


Fig. 1 Variazione del peso secco nelle colture N ed N/3

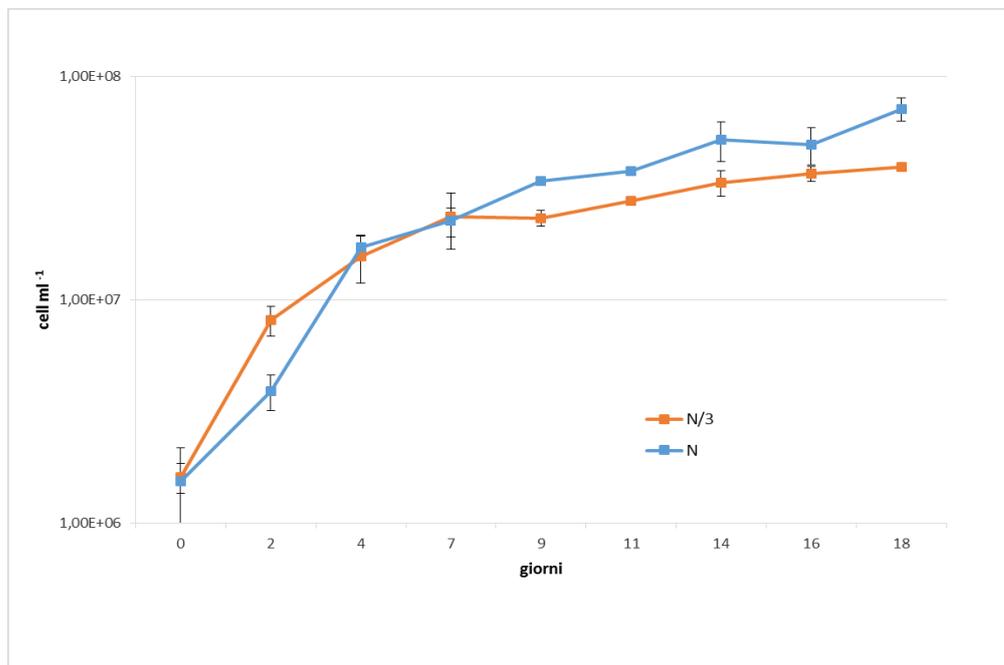


Fig. 2 Andamento delle abbondanze cellulari nelle colture N ed N/3

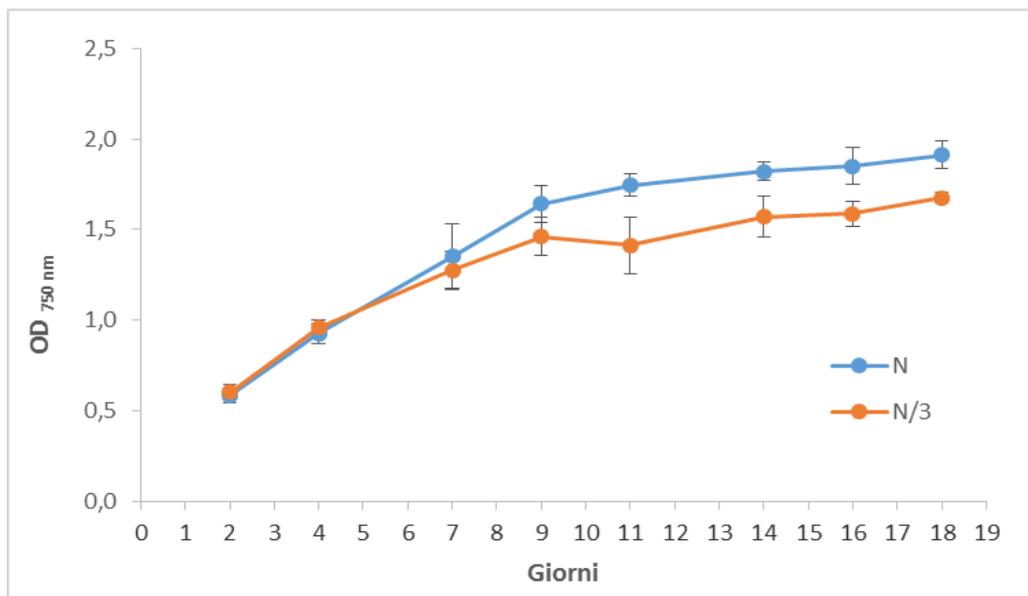


Fig.3 Variazione densità ottica nelle colture N ed N/3

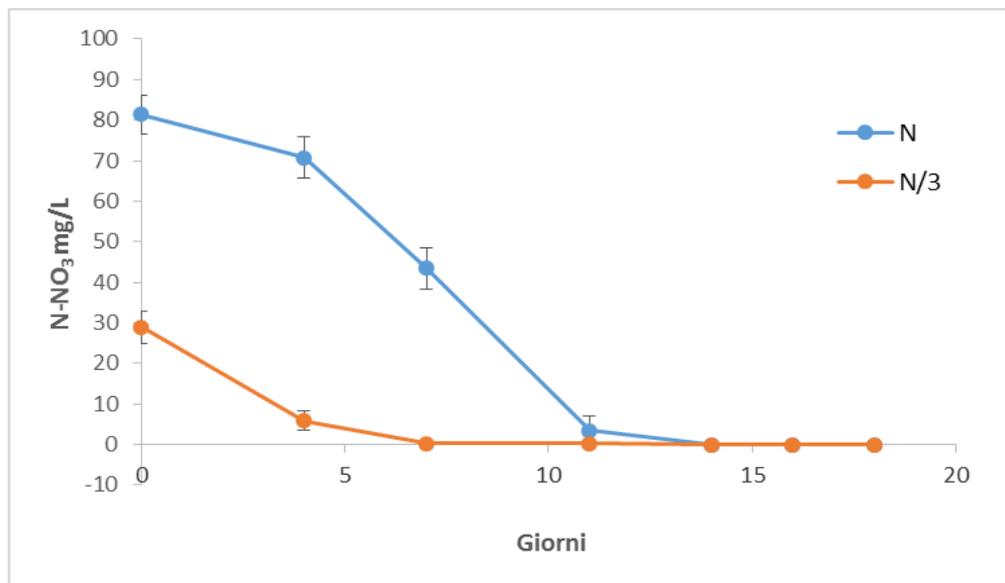


Fig.4 Contenuto N-NO<sub>3</sub> nel terreno

	Max DW (g/l)	$\mu$ (d <sup>-1</sup> )	$U_N$ (mmol g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	$U_P$ (mmol g <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
N	2,63±0,14	0,18	0,05	0,0011
N/3	1,91±0,13	0,21	0,02	0,0016

Tab. 1 Valori di: peso secco (DW), tasso di crescita ( $\mu$ ) e velocità di uptake di azoto ( $U_N$ ) e fosforo ( $U_P$ ) nelle colture N ed N/3

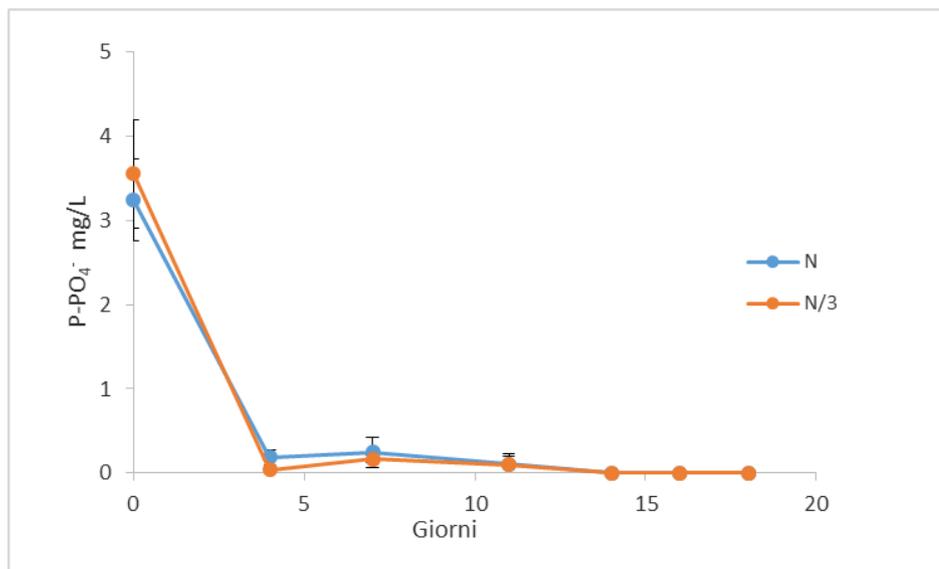


Fig.5 Contenuto P-PO<sub>4</sub> nel terreno

#### 4.1.2 Composizione cellulare

La composizione cellulare della diatomea sottoposta alle due concentrazioni di azoto differenti, è stata valutata in termini di contenuto polisaccaridico, quantitativo e qualitativo, contenuto lipidico quantitativo e qualitativo, contenuto di clorofilla *a*.

Per quanto riguarda l'accumulo di polisaccaridi nella condizione N/3 e nella condizione N, è stato registrato un andamento simile, tuttavia con qualche giorno di slittamento (fig.6).

La condizione N/3 registra un picco nel contenuto polisaccaridico al giorno 7, esattamente tre giorni dopo la deplezione dell'azoto nel terreno (fig.4) con un valore intorno al 25%. Il giorno di analisi seguente (giorno 9) il valore scende al 20% per poi diminuire sempre più nei giorni seguenti.

Si nota, quindi, come la massima produzione di polisaccaridi sia concentrata in pochi giorni diminuendo successivamente in maniera rapida, infatti si passa da un contenuto polisaccaridico del 20% al giorno 9 ad un contenuto del 13% al giorno 11 (fig.6).

Nella condizione N, invece, il picco viene registrato al giorno 4 anche se la condizione non aveva ancora terminato l'azoto. Tuttavia il valore del suo contenuto polisaccaridico risulta inferiore a quello del picco di N/3 (ossia 21%) calando, anche in questo caso a partire dal giorno successivo. Si notano, quindi, delle differenze (ANOVA,  $p < 0,05$ ) del contenuto in polisaccaridi tra la coltura N/3 (caratterizzata da una maggiore produzione) e la coltura N (con valori inferiori).

I monomeri costituenti questi polisaccaridi sono stati studiati per le due condizioni in tre giorni nel corso dell'esperimento. I giorni scelti sono stati: giorno 2 (in cui entrambe le colture erano in presenza di azoto), giorno 9 (in cui la condizione N era in presenza di azoto e la condizione N/3 lo aveva già terminato), giorno 16 (in cui entrambe le condizioni avevano terminato l'azoto).

Si vede come in presenza di azoto i polisaccaridi sono costituiti da vari tipi di monomeri (fig.7) ossia: ramnosio, fucosio, xilosio, mannosio, galattosio e glucosio. Quest'ultimo è il monomero predominante in entrambe le condizioni. Al giorno 9 la condizione N, che presenta ancora azoto nel terreno mantiene questa eterogeneità nei monomeri, mentre la condizione N/3 risulta composta esclusivamente da glucosio (fig.7). La predominanza del glucosio viene raggiunta al giorno 16 anche nella condizione N.

Anche i lipidi sono stati analizzati dal punto di vista quantitativo e qualitativo nelle due condizioni nei giorni 2, 9, 16.

Nei giorni 2 e 9 la composizione lipidica percentuale delle cellule è intorno al 30% con differenze non significative tra le condizioni (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Il picco lipidico si ottiene nella condizione N/3 al giorno 16, ossia in condizioni di inoltrata limitazione del macronutriente preso in esame (fig.4), dove il valore lipidico è del 40%. Il valore corrispondente di lipidi, al giorno 16, nella condizione N è 23% (fig.8).

Sempre nei giorni 2, 9, 16 una porzione dei lipidi, ossia gli acidi grassi totali, è stata studiata qualitativamente ed espressa come % sui lipidi totali. L'acido grasso più abbondante per tutta la crescita in entrambe le condizioni risulta l'acido palmitoleico (C 16:1) seguito dall'acido palmitico (C 16:0).

Un importante acido a scopo commerciale prodotto da *Phaeodactylum tricornutum* è il C 20:5, ossia l'acido eicosapentaenoico (EPA). La percentuale prodotta aumenta con il diminuire dell'azoto (fig.9) raggiungendo il 4% nella condizione N al giorno 16 e il 2% nella condizione N/3 sempre al giorno 16.

La condizione con una percentuale maggiore di acidi grassi risulta quella in limitazione di azoto (N/3) al giorno 16 (fig.9) con una preponderanza di acido palmitoleico e palmitico, seguiti dall'acido eicosapentaenoico. Al giorno 16 anche la condizione N presenta un contenuto in acidi grassi maggiore rispetto a quello dei giorni precedenti, dovuto all'influenza anche in questo caso della deplezione dell'azoto nel terreno (fig.4).

Parallelamente ad una biomassa inferiore e ad un aumento di lipidi e polisaccaridi, la limitazione di azoto causa una diminuzione della quantità di clorofilla *a* prodotta dalla diatomea: vediamo infatti come la quantità di clorofilla *a* diminuisce nella condizione N il giorno 14 (ossia tre giorni dopo la deplezione dell'azoto nel terreno, fig. 4) e al giorno 7 nella condizione N/3 (anche qui tre giorni dopo la deplezione dell'azoto nel terreno, fig.4).

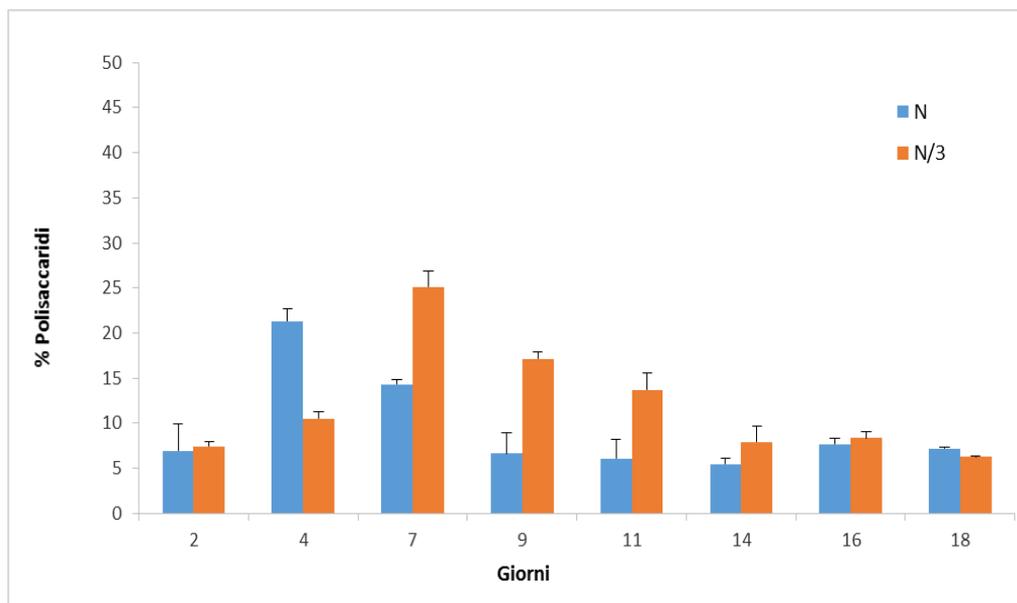


Fig.6 Contenuto polisaccaridico nelle colture N ed N/3 (%)

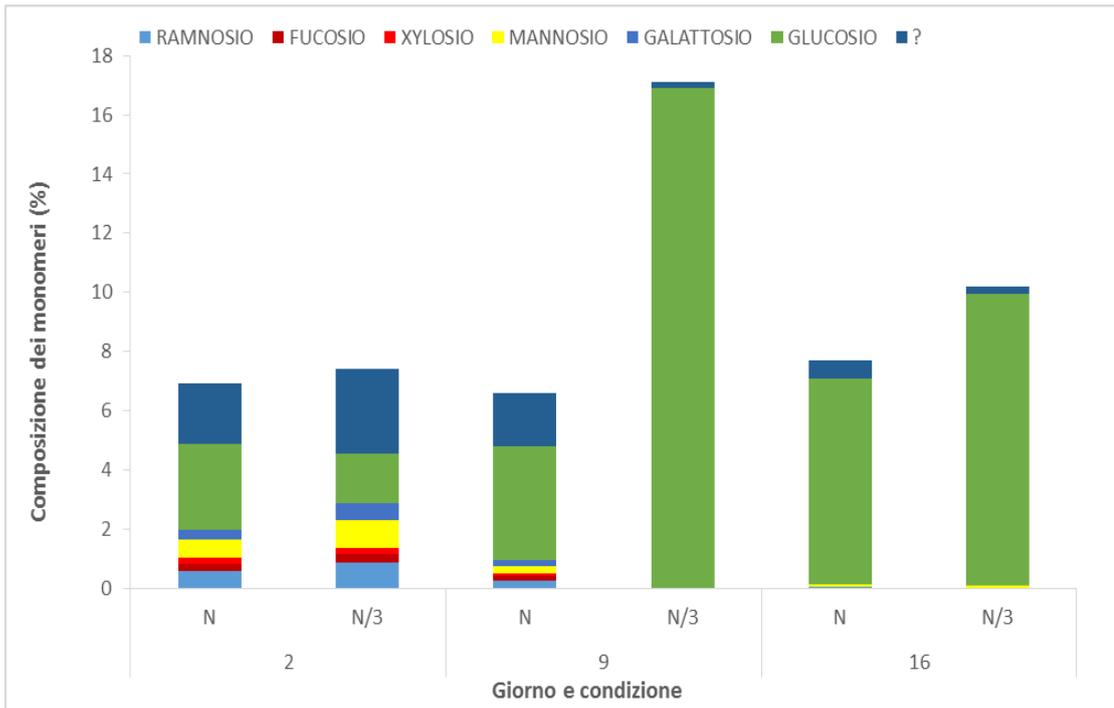


Fig.7 Composizione dei monomeri (%) nelle colture N ed N/3

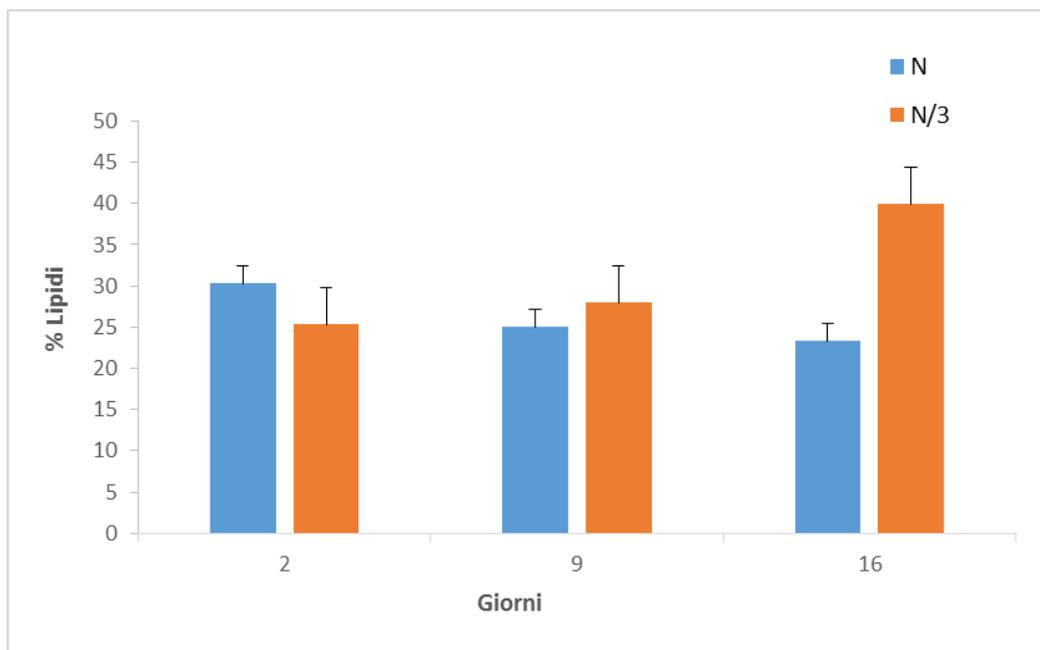


Fig.8 Contenuto lipidico nella colture N ed N/3 (%)

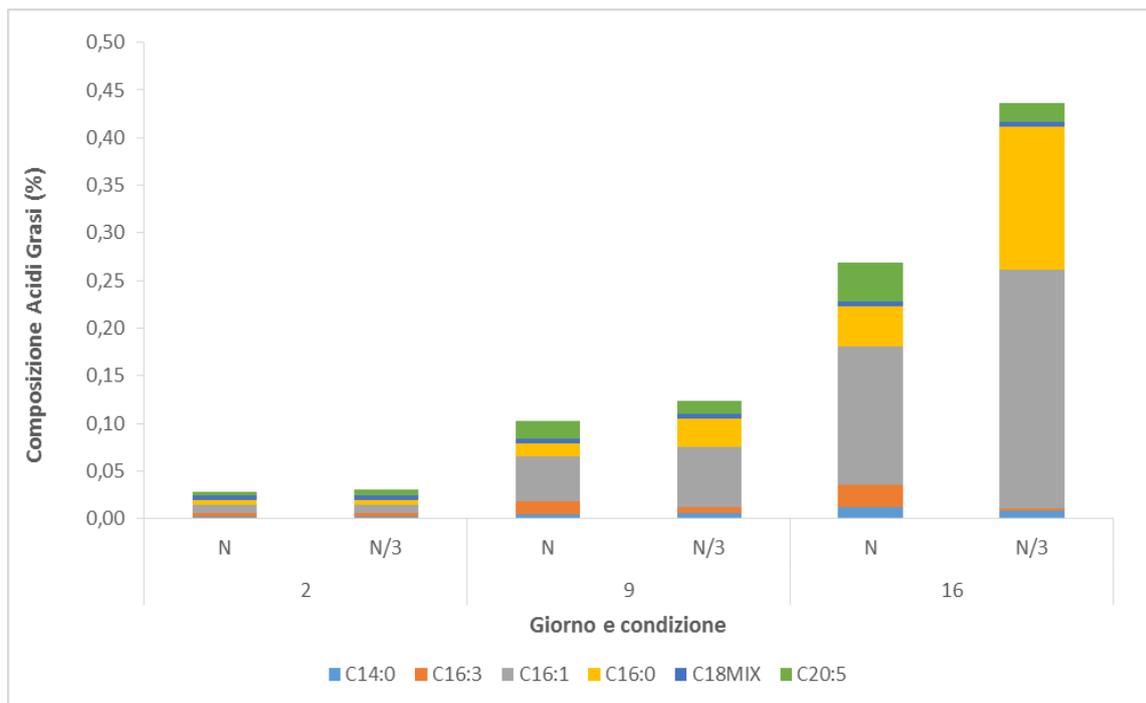


Fig.9 Acidi grassi totali (%) nelle colture N ed N/3C 14:0 acido miristico, C 16:3 acido esadecatrienoico, C 16:1 acido palmitoleico C 16:0 acido palmitico, C 20:5 acido eicosapentaenoico

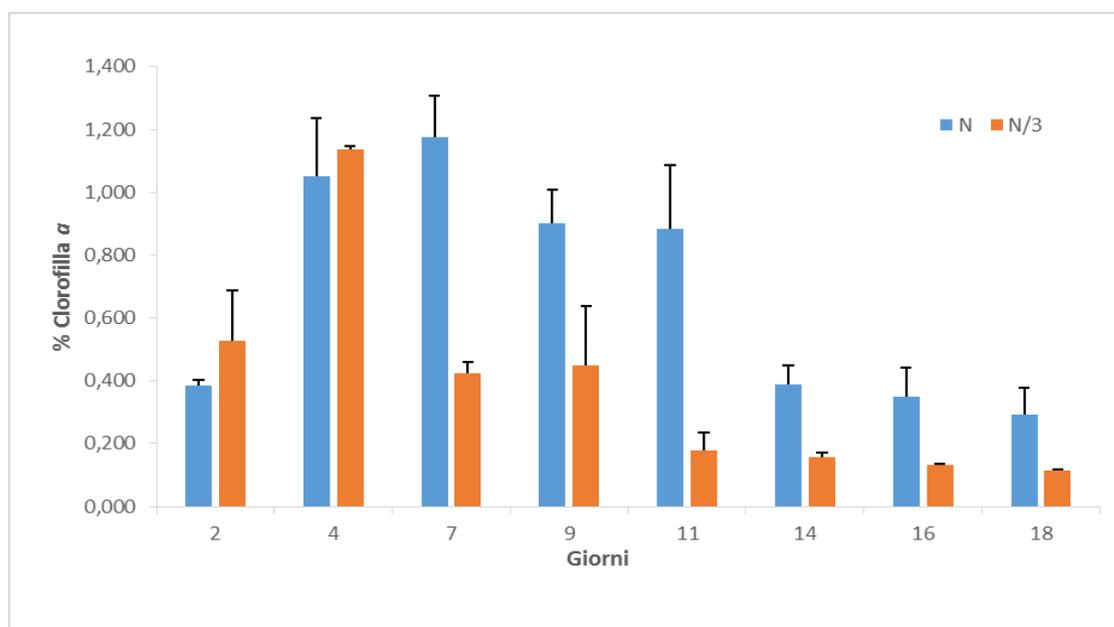


Fig.10 Contenuto di clorofilla a nelle colture N ed N/3 (%)

## **4.2 Crescita di *Phaeodactylum tricornutum* in PBR**

In base ai risultati ottenuti dall'esperimento condotto in modalità batch in reattori da 1 L, si è scelto di valutare la riproducibilità dei dati ottenuti dalla condizione N/3 in un PBR da 70 L. La coltura è stata monitorata per un periodo più lungo durante il quale, tre giorni dopo la deplezione dell'azoto nel terreno, si è effettuata la raccolta della biomassa equivalente ad 1/3 del peso secco registrato il giorno stesso. Questa operazione è stata ripetuta per tre volte durante i 38 giorni di monitoraggio. Dopo ogni raccolta il PBR è stato portato a volume con il terreno contenente il quantitativo di azoto iniziale.

### **4.2.1 Andamento della crescita e del consumo dei nutrienti**

L'andamento della crescita è stato monitorato tramite misure di assorbanza, peso secco e consumo dei macronutrienti.

Dai valori di peso secco (fig.2), si osserva che la coltura subito dopo l'inoculo entra in una fase di latenza necessaria per l'acclimatazione della stessa al nuovo ambiente. Questa fase è stata registrata fino al giorno 4, giorno in cui la velocità di uptake dell'azoto è pari a  $0.01 \text{ mmol g}^{-1}\text{d}^{-1}$ . Da questo giorno in poi il peso secco cresce fino a raggiungere un massimo di 0,7 g/L nel giorno 16.

Al giorno 16 corrisponde il giorno della prima raccolta, tre giorni dopo la deplezione dell'azoto nel terreno (fig.13). La produttività della coltura in questo primo periodo è stata  $0.026 \text{ g l}^{-1}\text{d}^{-1}$  e il suo tasso di crescita pari a  $0.022 \text{ d}^{-1}$  (Tab.2).

Le successive raccolte sono avvenute al giorno 25 e al giorno 38, mediamente ogni 10 giorni: questo implica che il tempo necessario alla coltura per esaurire l'azoto sia intorno ai 7 giorni, valore registrato anche nell'esperimento in batch con reattori da 1L nella condizione N/3 (fig.4).

Dopo ogni raccolta e reintegro del terreno, la coltura non ha più attraversato fasi di latenza ma entrava direttamente in fase di crescita esponenziale (fig.12) aumentando il suo peso secco fino ad un valore massimo finale di 1 g/L (fig.2).

Dalla tab.2 si può vedere come, dopo ogni reintegro di terreno, i valori di produttività che la coltura raggiunge siano pressoché simili mentre si osserva una diminuzione del tasso di crescita.

Per quanto riguarda la completa deplezione del fosforo questa si è registrata in due giorni e anche subito dopo il reintegro il valore di fosforo misurato nel terreno è pari a zero, in quanto utilizzato dalle cellule in tempi molto rapidi.

	P (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	μ (d <sup>-1</sup> )
1	0,026	0,022
2	0,028	0,008
3	0,021	0,006

Tab. 2 Valori di produttività e tasso di crescita della coltura nelle tre fasi di crescita

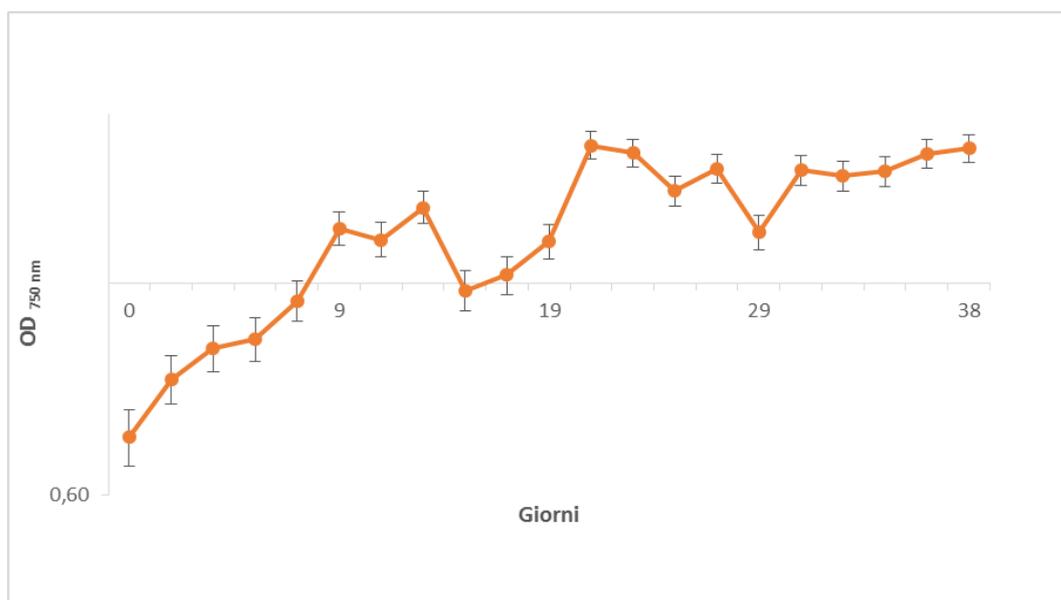


Fig.11 Variazione di densità ottica nella coltura

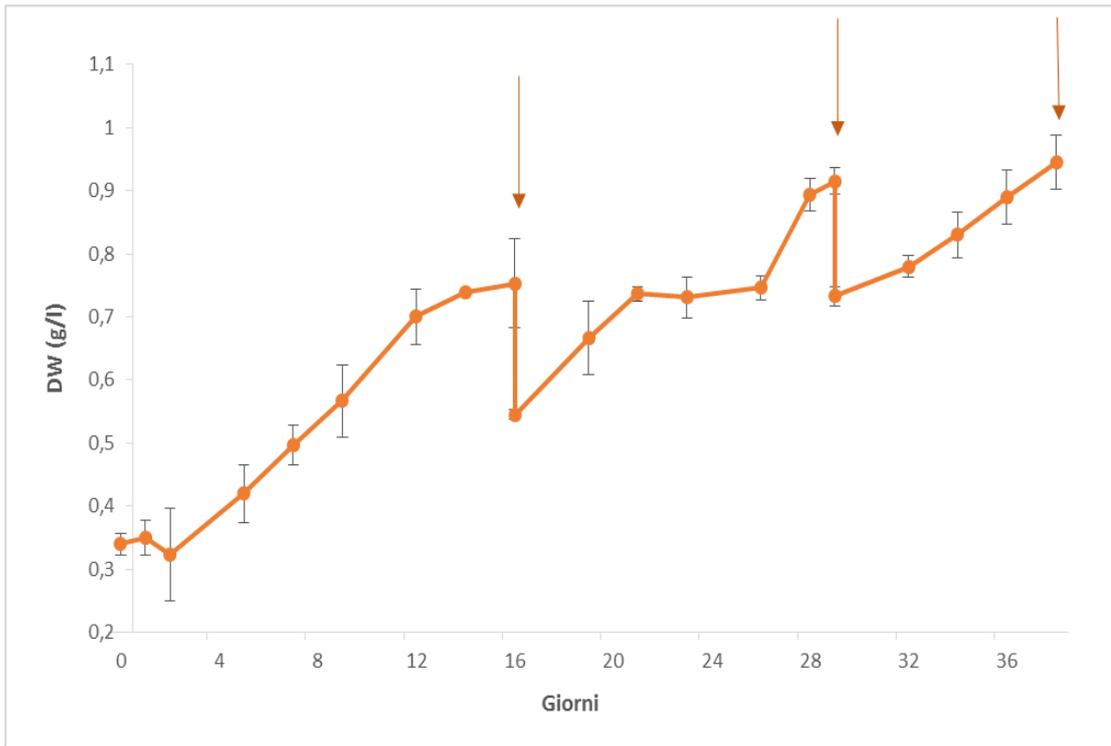


Fig.12 Variazione del peso secco (DW) nella coltura

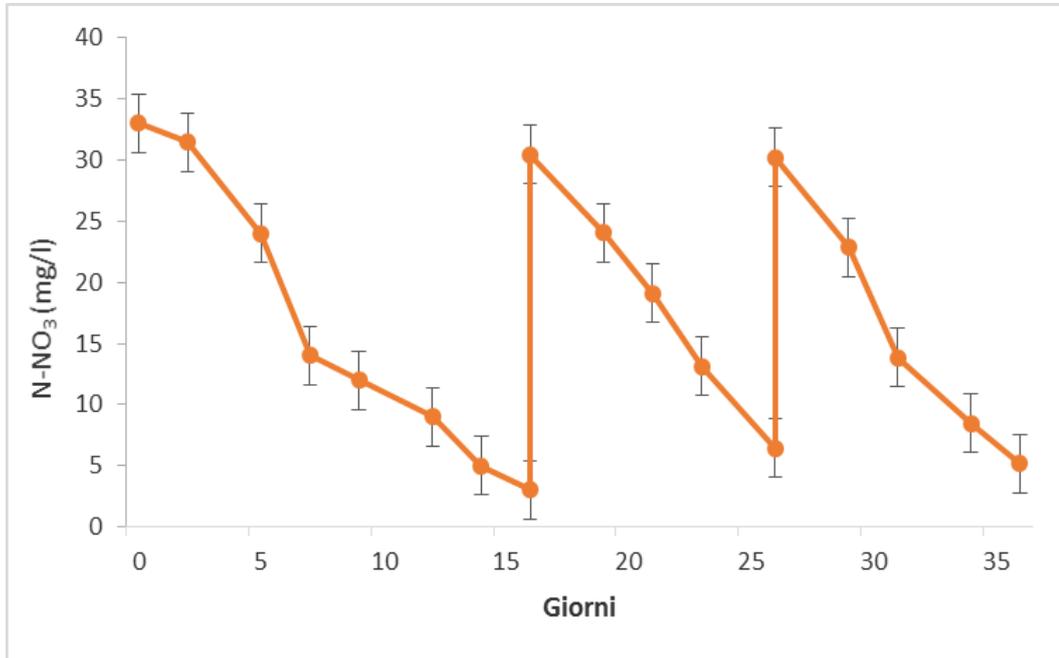


Fig.13 Contenuto di N-NO<sub>3</sub> nel terreno

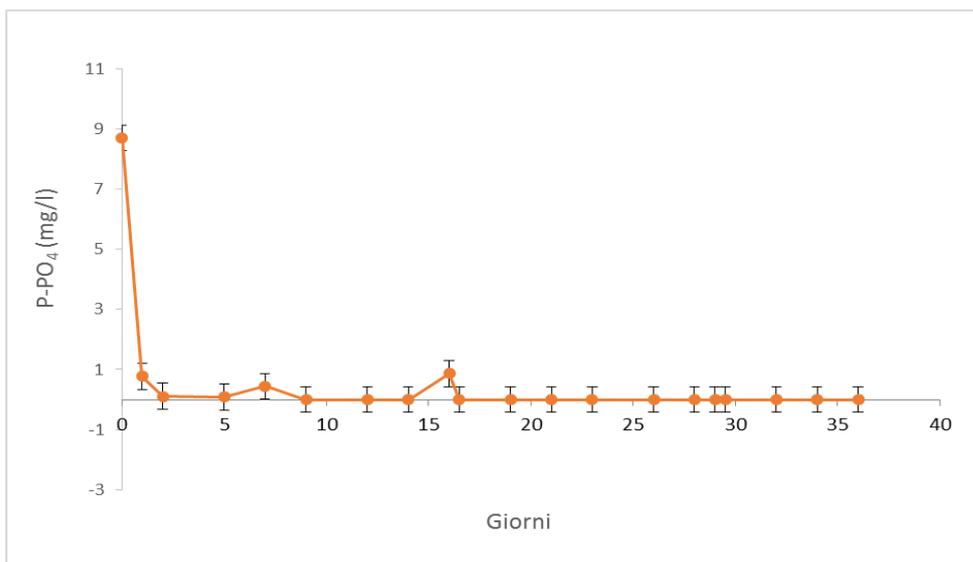


Fig.14 Contenuto di P-PO<sub>4</sub><sup>-</sup> nel terreno

#### 4.2.2 Composizione cellulare

Sulla biomassa ottenuta da ogni raccolta sono stati analizzati i polisaccaridi, in termini quantitativi e qualitativi, i lipidi totali e la loro porzione di acidi grassi totali e il contenuto proteico.

Il contenuto polisaccaridico ottenuto nelle prime due raccolte è costante, ossia intorno al 20% del peso secco tranne nella terza raccolta in cui è il 10%, valore significativamente diverso dalle altre (ANOVA,  $p < 0.05$ ) (fig. 15).

Il contenuto lipidico nelle tre raccolte è intorno al 30% del peso secco (fig. 17). Risulta evidente come il contenuto lipidico di *Phaeodactylum tricorutum* sia maggiore in condizioni di limitazione di azoto rispetto al contenuto polisaccaridico.

Una ulteriore analisi effettuata è stata quella del contenuto proteico che è risultato costante nel corso delle raccolte, ossia intorno al 50% (ANOVA,  $p > 0.05$ ) (fig.17). La composizione media di *Phaeodactylum tricorutum* in limitazione di azoto in PBR da 70 L risulta, quindi, costituita da: 20% polisaccaridi, 50% proteine e 30% lipidi.

Per quanto riguarda i monomeri costituenti i polisaccaridi (fig.16) vediamo come il monomero principale nella raccolte sia il glucosio seguito, nelle prime due raccolte dal

mannosio assente invece nella terza. Anche l'andamento dei monomeri rispecchia molto quello registrato nella coltura N/3 in batch (fig.7).

Sono state effettuate analisi qualitative anche su una porzione dei lipidi: gli acidi grassi totali (fig.19).

L'acido presente in concentrazioni maggior è il C 16:1 (2,5% in ogni raccolta), seguito dal C 20:5 (2,3% in ogni raccolta) e dal C 16:3 (2% in ogni raccolta).

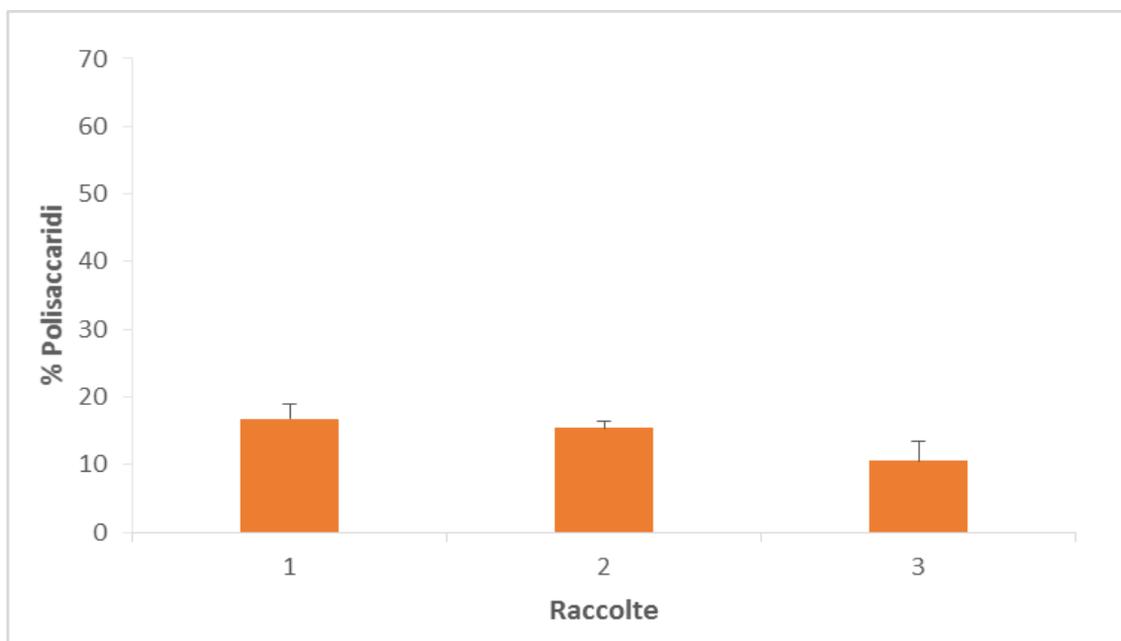


Fig.15 Contenuto polisaccaridico nella coltura

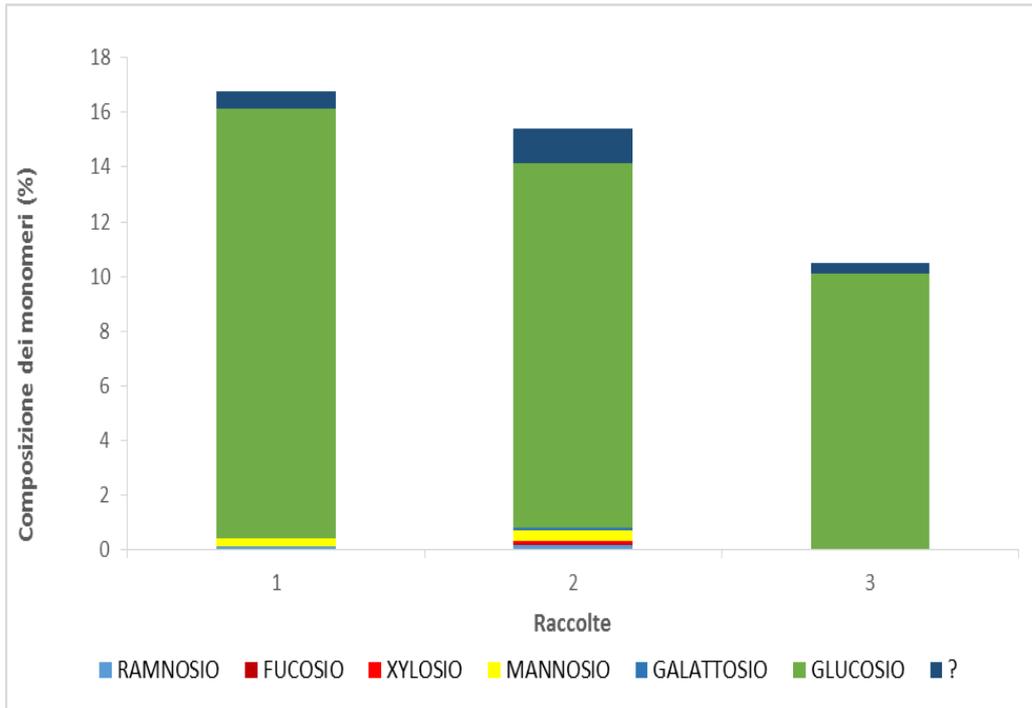


Fig.16 Composizione dei monomeri (%) nella coltura

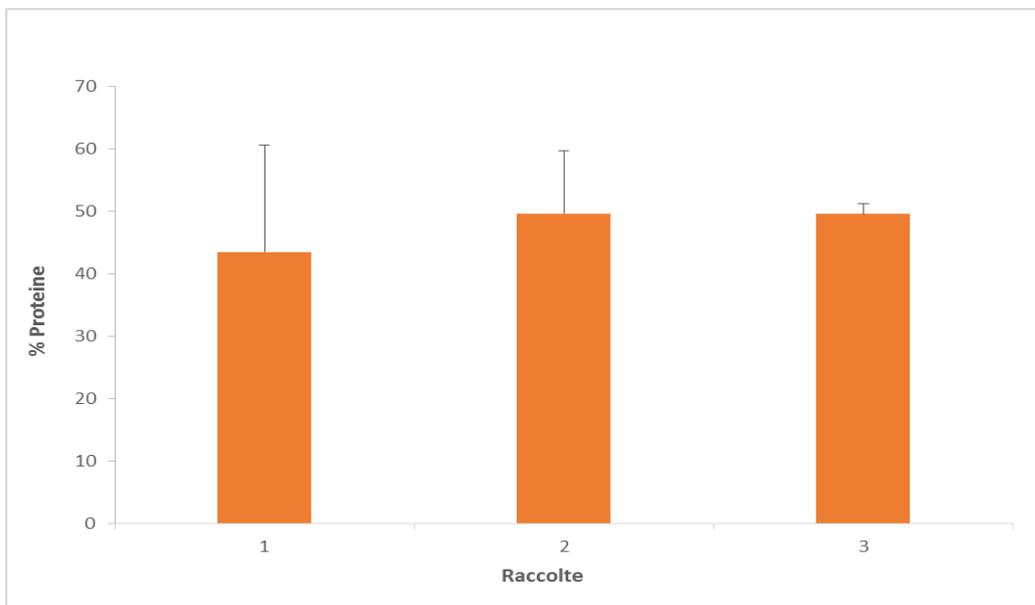


Fig.17 Contenuto proteico nella coltura

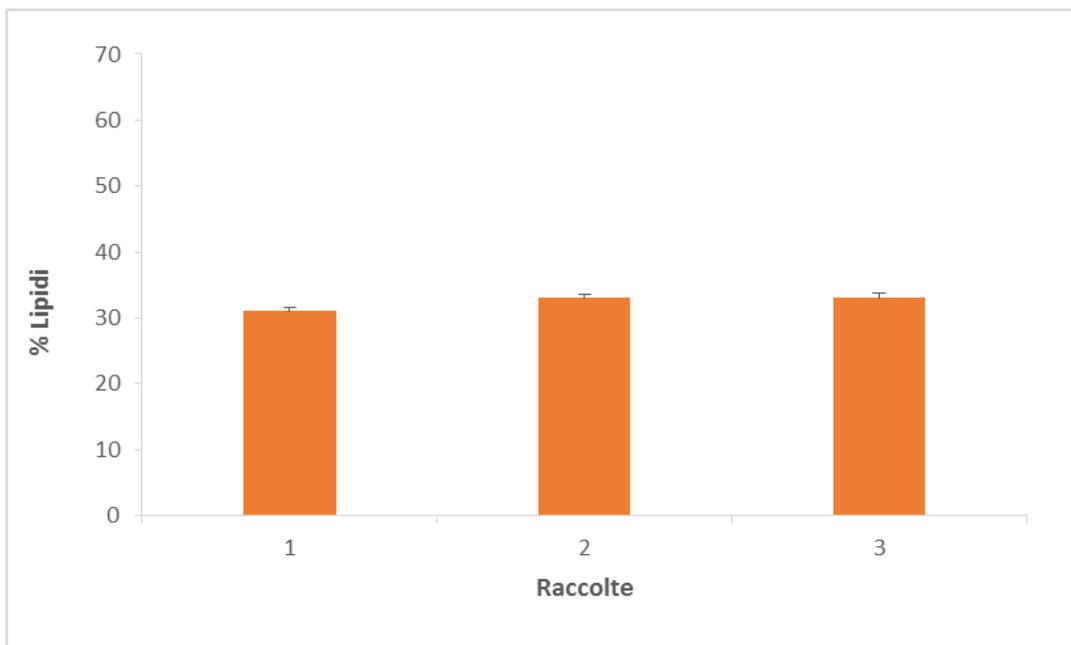


Fig.18 Contenuto lipidico nella coltura

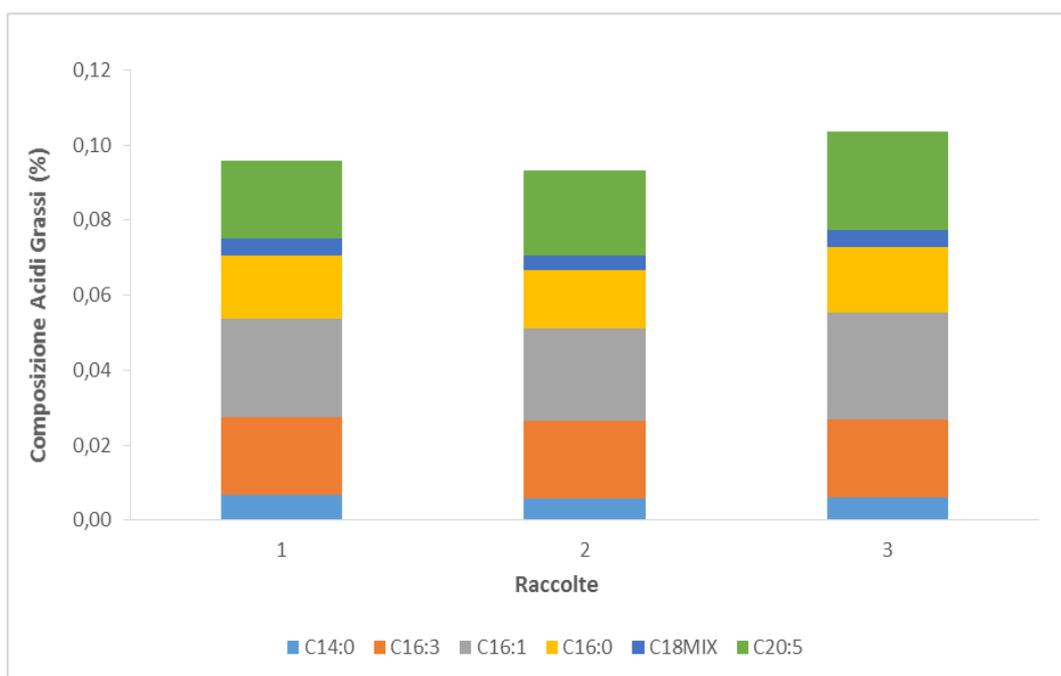


Fig. 19 Acidi grassi totali (%)

C 14:0 acido miristico, C 16:3 acido esadecatrienoico, C 16:1 acido palmitoleico C 16:0 acido palmitico, C 20:5 acido eicosapentaenoico

## 5 Discussione

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la possibilità di ottenere colture di *Phaeodactylum tricornutum* ad alto contenuto polisaccaridico e lipidico, da inserire nel contesto di ricerca e di produzione di Micoperi Blue Growth.

La composizione delle microalghe, sia in termini di metaboliti primari che secondari, varia nel tempo al variare delle caratteristiche chimico-fisiche del terreno implicando, in un contesto industriale, la necessità di raccogliere la biomassa in archi temporali ben precisi in base al contenuto che si vuole ottenere in quantità maggiori.

In particolare, è risaputo che nelle microalghe quando l'azoto cellulare diminuisce a livelli tali da non permettere la sintesi delle proteine e le divisioni, le cellule grazie all'attività fotosintetica accumulano i polisaccaridi e i lipidi, come composti di riserva da utilizzare quando l'azoto diventa nuovamente disponibile (Dragone et al., 2011). La carenza di azoto determina pertanto il raggiungimento di una minore densità della coltura e, in un contesto di produzione di biomassa, è necessario valutare attentamente quali livelli del nutriente utilizzare per ottenere una biomassa abbondante con alti livelli dei prodotti di riserva desiderati.

La crescita e la composizione di *P. tricornutum* sono state seguite allestendo le colture in due diversi terreni di coltura: uno ricco in azoto, denominato N, per mezzo del quale si è voluta incrementare la crescita e la biomassa, ed uno a ridotto contenuto di azoto, denominato N/3, per indurre la produzione di lipidi e polisaccaridi.

A conferma di ciò il massimo valore di peso secco ottenuto è stato nella condizione N (2.63 g/L) rispetto al valore di 1.91 g/L ottenuto nella condizione N/3. Quindi, aggiungendo un elevato contenuto di N alle colture abbiamo effettivamente incrementato i valori di biomassa. Nella condizione N/3 le colture arrestano prima la crescita ed entrano in una fase di crescita stazionaria, come dimostrato anche da Uslu et al., 2014. Tuttavia lo scopo finale di questa tesi non era l'ottimizzazione della quantità di biomassa ma del suo contenuto polisaccaridico e lipidico.

Al contrario del peso secco, un maggiore incremento del contenuto polisaccaridico e lipidico è stato misurato nella condizione a ridotto contenuto di azoto e l'andamento

osservato nel corso della crescita può essere messo in relazione con la disponibilità di azoto nel terreno.

Nella condizione N/3 l'incremento del pool polisaccaridico si registra, infatti, subito dopo la deplezione dell'azoto nel terreno raggiungendo un picco con valori del 20% al giorno 7, mentre nella condizione N il valore massimo lo abbiamo al giorno 4. Questo può essere spiegato da un mancato utilizzo dell'azoto, evidenziato dal suo lento uptake causato da una fase di latenza della coltura. I lipidi, invece, aumentano nella condizione N il giorno 16, in condizioni di inoltrata carenza di azoto. Al diminuire dei polisaccaridi, quindi, nelle cellule si verifica un aumento dei lipidi.

Parallelamente ad una biomassa inferiore e ad un aumento di lipidi e polisaccaridi, la limitazione di azoto causa una diminuzione della quantità di clorofilla a prodotta dalla diatomea riscontrata anche in letteratura (Chauton et al., 2014).

Vari studi sono stati effettuati sulla composizione di *Phaeodactylum tricornutum* tra cui due lavori (Mus et al., 2013 e Uslu et al., 2014) in cui la diatomea è stata sottoposta a varie concentrazioni di azoto mantenendo, comunque, una condizione ricca in azoto e una in riduzione. Tramite analisi effettuate alla fine della fase stazionaria è stato osservato un aumento lipidico subito dopo l'aumento dei carboidrati che, nel frattempo, diminuiscono: questa inversione dei pool avviene in quanto il carbonio stoccato nei carboidrati viene utilizzato nella produzione dei lipidi (Mus et al., 2013).

Per quanto riguarda la composizione in termini di monomeri dei polisaccaridi, nelle nostre colture è stato notato un aumento del glucosio che diventa preponderante dopo che è stato esaurito l'azoto nel terreno.

La condizione N/3 al giorno 9 è costituita per il 99% da glucosio che risulta essere il componente dei polisaccaridi di riserva del fitoplancton (Handa, 1969), rappresentati in questa specie dalla crisolaminarina, un glucano  $\beta$  1,3.

Al giorno 16 sia le colture nella condizione N che in quella N/3 sono costituite in prevalenza da glucosio con percentuali rispettivamente del 91% e 97%.

In tutte e due le condizioni, invece, quando l'azoto nel terreno è ancora abbondante, la composizione dei monomeri presenta una maggiore varietà in quanto sono presenti diversi monomeri e, tra quelli identificati, il glucosio è il più abbondante, seguito dal mannosio e dal ramnosio.

Studi precedenti sulla composizione qualitativa dei carboidrati di *Phaeodactylum tricornutum* non sono presenti in letteratura, l'unico studio che effettua un'analisi qualitativa dei polisaccaridi di una diatomea riguarda *Skeletonema costatum* (Biersmith et al., 1998) dove è stato notato lo stesso andamento, con una maggioranza di glucosio e mannosio.

Analisi qualitative sono anche state effettuate sulla porzione lipidica di *Phaeodactylum tricornutum*, andando a caratterizzare la sua frazione di acidi grassi totali.

Nei primi due giorni studiati, le concentrazioni degli acidi grassi risultano uguali in entrambe le condizioni con una preponderanza di acido palmitoleico (C 16:1) e palmitico (C 16:0). L'acido C 20:5, ossia l'acido eicosapentaenoico (EPA) è il più importante a scopo commerciale e risulta aumentare con la diminuzione dell'azoto nel terreno, raggiungendo il picco il giorno 16. Tuttavia nella condizione N/3 il contenuto è inferiore alla coltura N ed inoltre rimane presente in quantità minori rispetto al C 16:1 e al C16:0 in entrambe le condizioni.

La coltura in condizione N al giorno 16 è costituita da: 15% di C 16:1, 4% C 16:0, 4% C 20:5; mentre la condizione N/3 è costituita da: 25% C 16:1, 15% C 16:0 e da 2% C 20:5.

In letteratura è stato trovato uno studio (Yongmanitchai et al., 1990) nel quale colture di *Phaeodactylum tricornutum* sono state allestite con varie concentrazioni di azoto e, nella condizione che più si avvicina alla nostra coltura N/3, è stata riscontrata una dominanza dell'acido palmitoleico, seguito dal palmitico e dall'EPA.

Valori contrastanti invece sono stati ritrovati nella maggior parte dei lavori presi in considerazione (Benavides et al., 2013; Torzillo et al., 2012) dove l'EPA è il principale acido grasso contenuto in *Phaeodactylum tricornutum* seguito dal C 16:0 e dal C 16:1. La composizione da noi ottenuta risulta uguale alle altre citate in letteratura, variando solo le percentuali.

In base ai risultati sull'andamento di polisaccaridi e lipidi ottenuti dall'esperimento appena discusso, si è scelto il terreno con minore concentrazione di azoto per avviare un fotobioreattore da 70 L.

L'utilizzo di un PBR ha permesso di effettuare una coltura in semicontinuo, raccogliendo 1/3 della biomassa per tre volte, a cui seguiva l'aggiunta di terreno nuovo

ogni volta. Le raccolte venivano effettuate quando l'azoto nel terreno veniva esaurito e sulla biomassa di ogni raccolta è stata analizzata la composizione di *Phaeodactylum tricornutum* in termini di proteine, polisaccaridi e lipidi.

Utilizzando questo metodo di coltura è interessante notare l'aumento della biomassa nel corso del tempo: il valore ottenuto al momento della prima raccolta era di 0,75 g/L, quello della seconda di 0,92 g/L e quello della terza di 0,98 g/L. Tuttavia, visto il massimo valore di biomassa raggiunto nell'esperimento precedente dalla condizione N/3 (1,91 g/L) si può pensare che se la coltura fosse stata monitorata per un arco di tempo maggiore si sarebbe potuta ottenere una concentrazione di biomassa maggiore di 0,98 g/L. Nonostante ad ogni raccolta aumentasse la biomassa, la produttività del sistema è rimasta pressoché costante: 0,026 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> nella prima raccolta, 0,028 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> nella seconda e 0,021 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> nella terza. I valori del tasso di crescita dopo ogni raccolta, invece, diminuiscono con valori pari a 0,022 μ<sup>-1</sup> nella prima raccolta, 0,008 μ<sup>-1</sup> nella seconda e 0,006 μ<sup>-1</sup> nella terza.

I risultati sulla composizione in termini dei composti biochimici più abbondanti in *Phaeodactylum tricornutum* sono stati mediamente: 50 % di proteine, 30 % lipidi, 17% polisaccaridi.

In altri studi (Benavides et al., 2013) è stata vista la composizione di *Phaeodactylum tricornutum* in colture che avevano raggiunto diverse concentrazioni di biomassa: concentrazioni più basse sono risultate essere ottimali per la produzione di biomassa con il 50% di contenuto proteico; il valore dei carboidrati non sembrava risentire della concentrazione della biomassa al contrario del contenuto lipidico che aumentava con l'aumentare della biomassa.

Il nostro contenuto lipidico risulta conforme con quanto ottenuto nello studio precedentemente citato ossia il 30% mentre la nostra coltura ha mantenuto un contenuto proteico simile nel corso delle tre raccolte (50%) indipendentemente dal valore della biomassa raggiunto.

Per quanto riguarda i polisaccaridi abbiamo un valore del 20%, costante nelle prime due raccolte, che possono essere confrontate con i valori del giorno 9 della coltura N/3 in batch; al contrario nella terza raccolta si è verificato un leggero calo.

L'andamento della composizione monomerica dei polisaccaridi rispecchia molto quello registrato nella coltura N/3 in batch, ossia una elevata concentrazione di glucosio. Questo risultato è positivo in quanto il glucosio è il componente della crisolaminarina, il composto polisaccaridico di *P. tricornutum* in cui sono state dimostrate proprietà bioattive.

Visto l'obiettivo della tesi incentrato sulla quantità polisaccaridica, il fatto di avere ottenuto in colture di volume elevato, effettuate in PBR, risultati paragonabili a quelli della coltura batch dimostra che le condizioni di coltura scelte erano idonee.

Per quanto riguarda invece gli acidi grassi totali, nel PBR abbiamo ottenuto un aumento del C 20:5 e del C 16:3, tuttavia l'acido maggiormente presente rimane il C 16:1 in tutte e tre le raccolte; si può sottolineare come la differenza di concentrazione raggiunta non abbia influenzato la composizione di questa porzione lipidica, come anche notato da Torzillo et al., 2012 su colture in PBR a diverse concentrazioni di biomassa.

In conclusione con questo lavoro è stato individuato il terreno migliore per la produzione di polisaccaridi e lipidi e sono state valutate le tempistiche di produzione di questi composti in *Phaeodactylum tricornutum*. Inoltre abbiamo dimostrato che sia contenuti che tempistiche sono riproducibili in un sistema industriale chiuso per produrre biomassa ad alto valore commerciale. Il risultato principale è stato quello di poter mantenere alti i livelli di polisaccaridi cellulari, anche in colture semicontinue, tuttavia sarebbe interessante monitorare la coltura per un arco di tempo maggiore di quanto fatto sino ad ora. Questo permetterebbe di vedere quale sia il livello massimo di biomassa che *Phaeodactylum tricornutum* può raggiungere in PBR e di caratterizzare meglio le variazioni di composizione con l'aumentare del tempo e al variare della densità della biomassa.

## 6 Bibliografía

- Ación Fernández, F. G., Fernández Sevilla, J. M., Sánchez Pérez, J., Molina Grima, E., Chisti, Y.** (2001). Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: Assessment of design and performance. *Chemical Engineering Science*, **56(8)**: 2721–2732.
- Alekseeva, S. A., Shevchenko, N. M., Kusaykin, M. I., Ponomorenko, L. P., Isakov, V. V., Zvyagintseva, T. N., Likhoshvai, E. V.** (2005). Polysaccharides of diatoms occurring in Lake Baikal. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **41(2)**: 185–191.
- Amaro, H. M., Barros, R., Guedes, C., Sousa-Pinto, I., Malcata, F. X.** (2013). Microalgal compounds modulate carcinogenesis in the gastrointestinal tract. *Trends in Biotechnology*, **31(2)**: 92–98
- An, C., Yazaki, T., Takahashi, H., Kuda, T., Kimura, B.** (2012). Diet-induced changes in alginate- and laminaran-fermenting bacterial levels in the caecal contents of rats. *Journal of Functional Foods*, **5(1)**: 389–394.
- Atalah, E., Cruz, C. M. H., Izquierdo, M. S., Rosenlund, G., Caballero, M. J., Valencia, A., Robaina, L.** (2007). Two microalgae *Cryptocodinium cohnii* and *Phaeodactylum tricorutum* as alternative source of essential fatty acids in starter feeds for seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, **270(1-4)**: 178–185.
- Barsanti, L., Gualtieri, P.** (2010) *Algae Anatomy, Biochemistry and Biotechnology. Second edition (ed. Taylor & Francis Group)*
- Becker, E. W.** (2013). Microalgae for Aquaculture: Nutritional Aspects. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, **1**: 671–691.
- Benavides S., A. M., Torzillo, G., Kopecký, J., Masojídek, J.** (2013). Productivity and biochemical composition of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in tubular photobioreactors and open ponds. *Biomass and Bioenergy*, **54**: 115–122.
- Ben-Amotz, A., Katz, A., Avron, M.** (1982). Accumulation of  $\beta$ -carotene in halotolerant algae: purification and characterization of  $\beta$ -carotene- rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, **18(4)**: 529–537.
- Biersmith, A., Benner, R.** (1998) Carbohydrates in phytoplankton and freshly produced dissolved organic matter. *Marine Chemistry*. **63(1-2)**: 131-144
- Bligh, E.G., Dyer, W.J.** (1959). A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911–917.
- Carlozzi, P.** (2003). Dilution of solar radiation through “Culture” lamination in photobioreactor rows facing south- north: A way to improve the efficiency of light

- utilization by cyanobacteria (*Arthrospira platensis*). *Biotechnology and Bioengineering*, **81(3)**: 305–315.
- Carvalho, A.P., Malcata, F.X.** (2005) Optimization of  $\omega$ -3 fatty acid production by microalgae: crossover effects of CO<sub>2</sub> and light intensity under batch and continuous cultivation modes. *Marine Biotechnology* **7(4)**: 381-388
- Chauton, M.S., Olsen, Y., Vadstein, O.** (2013) Biomass production from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*: Nutrient stress and chemical composition in exponential fed-batch cultures. *Biomass and Energy* **58**: 87-94
- Chen, P., Min, M., Chen, Y., Wang, L., Li, Y., Chen, Q., Ruan, R.** (2009). Review of the biological and engineering aspects of algae to fuels approach. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, **2(4)**: 1–30.
- Darzens, A., Pienkos, P., Edey, L.; BioIndustry Partners NREL** (2010) Current status and potential for algal biofuels production. *Bioenergy Task 39 Report*
- Domergue, F., Spiekermann, P., Lerchl, J., Beckmann, C., Kilian, O., Kroth, P. G., Heinz, E.** (2003). New insight into *Phaeodactylum tricornutum* fatty acid metabolism. Cloning and functional characterization of plastidial and microsomal  $\Delta$ -12 fatty acid desaturases. *Plant Physiology*, **131**:1648–1660.
- Dragone, G., Fernandes, B.D., Abreu, A.P. Vicente, A.P., Teixeira, J.A.** (2011) Nutrient limitation for increasing starch accumulation in microalgae. *Applied Energy*. **88 (10)**: 3331-3335
- Dubinsky, Z., Matsukawa, R., Karube, I.** (1995) Photobiological aspects of algal mass culture. *J. Mar. Biotechnol.* **2**: 61–65.
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F.,** (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* **28**: 350–356.
- Falciatore a., Bowler C.** (2002) Revealing the molecular secrets of marine diatoms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**:109–133
- Falkowski P.G., Barber R.T., Smetacek V.** (1998) Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production. *Chemistry and biology of the oceans* **281**: 200-206
- Fu, W., Wichuk, K., Brynjólfsson, S.** (2015). Developing diatoms for value-added products: challenges and opportunities. *New Biotechnology*, **32(5)**: 547-551.
- Geider, R., La Roche, J.** (2002). Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *European Journal of Phycology*, **37(1)**: 1–17.

- Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., De Cooman, L.** (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology*, **24(6)**: 1477–1486.
- Grobbelaar, J. U.** (2013). Inorganic Algal Nutrition. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, 123–133.
- Guillard R.R.L.e Ryther J.H.** (1962) Studies of marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervaceae* Cleve. *Gran. J. Microbiol* **8**: 229-239
- Hamilton, M. L., Haslam, R. P., Napier, J. a., Sayanova, O.** (2014). Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricornutum* for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Metabolic Engineering*, **22**: 3–9.
- Handa., N., Yanagi., K.** (1969) Studies on water-extractable carbohydrates of the particulate matter from the northwest Pacific Ocean. *Mar. Biol.* (**4**): 197-207
- Haugl, A., Myklestad, S.** (1976). Polysaccharides of Marine Diatoms with Special Reference to Chaetoceros Species. *Marine Biology*, **222**: 217–222.
- Hockin, N. L., Mock, T., Mulholland, F., Kopriva, S., Malin, G.** (2012). The Response of Diatom Central Carbon Metabolism to Nitrogen Starvation Is Different from That of Green Algae and Higher Plants. *Plant Physiology*, **158(1)**: 299–312.
- Hu, Q.** (2013) Environmental effects of Cell Composition, *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, 114–122.
- Kim, S.M., Jung, Y., Kwon, O., Cha, K. H., Um, B., Chung, D., Pan, C.** (2012) A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **166**: 1843-1855
- Kuda, T., Enomoto, T., Yano, T.** (2009). Effects of two storage  $\beta$ 1-3 glucans , laminaran from *Eicenia bicyclis* and paramylon from *Euglena gracili* , on cecal environment and plasma lipid levels in rats. *Journal of Functional Foods*, **1(4)**: 399–404.
- Kuda, T., Fujii, T., Hasegawa, A., Okuzumi, M.** (1992). Effect of degraded products of laminaran by *Clostridium ramosum* on the growth of intestinal bacteria. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**: 1307–1311.
- Kuda, T., Kosaka, M., Hirano, S., Kawahara, M., Sato, M., Kaneshima, T., Kimura, B.** (2015). Effect of sodium-alginate and laminaran on *Salmonella typhimurium* infection in human enterocyte-like HT-29-Luc cells and BALB/c mice. *Carbohydrate Polymers*, **125**: 113–119.
- Li, Y., Han, D., Sommerfeld, M., Hu, Q.** (2011). Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp.

- (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. *Bioresource Technology*, **102(1)**: 123–129.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265–275.
- Markou, G., Angelidaki, I., Georgakakis, D.** (2012). Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **96(3)**: 631–645.
- Martino, A. De, Meichenin, A., Shi, J., Pan, K., Bowler, C.** (2007). Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions. *Journal of Phycology*, **43(5)**: 992–1009.
- Myklestad, S., Haug, A., Larsen, B.** (1972). Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. II. Preliminary investigation of the Extracellular polysaccharide. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* **9**: 137–144.
- Mus, F., Toussaint, J., Cooksey, K.E., Fields, M.W., Gerlach, M., Peyton, B.M., Carlson, R.P.** (2013) Physiological and molecular analysis of carbon source supplementation and pH stress-induced lipid accumulation in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**:3625–3642
- Nishida, I., Murata, N.** (1996). Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: The Crucial Contribution of Membrane Lipids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* **47**: 541-568
- Pádua, D., Rocha, E., Gargiulo, D., Ramos, A. A.** (2015). Bioactive compounds from brown seaweeds: Phloroglucinol, fucoxanthin and fucoidan as promising therapeutic agents against breast cancer. *Phytochemistry Letters*, **14**: 91–98.
- Paul, C., Min, M., Yifeng, C., Liang, W., Yecong, L., Qin, C., Chenguang, W., Yiqin, W., Xiaoquan, W., Yanling, C., Shaobo, D., Hennessy, K., Xiangyang, L., Yuhuan, L., Yingkuan, W., Martinez, B., Ruan, R.** (2009) - Review of the biological and engineering aspects of algae to fuels approach. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering* **2**: 1-30.
- Posten, C.** (2009) Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Eng. Life Sci.* **9**: 165–177.
- Richmond, A.** (1999) Physiological principles and modes of cultivation in mass production of photoautotrophic microalgae. *Chemicals from Microalgae* (ed. Z. Cohen): 353–386.
- Strickland, J.D.H., Parson, T.R.** (1972). A practical Handbook of seawater analysis, Fisheries Research Board of Canada. Bulletin N.167, 310 pp.Ottawa

- Torzillo, G., Faraloni, C., Silva, A. M., Kopecký, J., Pilný, J., Masojídek, J.** (2012). Photoacclimation of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in photobioreactors and open ponds. *European Journal of Phycology*, **47(2)**: 169–181.
- Tredici, M.R., Chini Zittelli, G., Rodolfi, L.** (2010) Photobioreactors. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. **(6)**: 3821–3838.
- Uslu, L., Ak, B., Isik., O., Durmaz., Y.** (2014) Effect of light path length and nitrogen deficiency on the biochemical composition of *Phaeodactylum tricornutum*. *Fresenius environmental bulletin* **23 (6)**: 1309-1313
- Wang, W., Wang, S. X., Guan, H. S.** (2012). The antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides: An overview. *Marine Drugs*, **10(12)**: 2795–2816.
- Wilhelm, C., Jakob, T.** (2011). From photons to biomass and biofuels: evaluation of different strategies for the improvement of algal biotechnology based on comparative energy balances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **92(5)**: 909–919.
- Yongmanitchai, W., Ward, O. P.** (1991). Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, **57(2)**: 419–425.
- Zittelli, G. C., Biondi, N., Rodolfi, L., Tredici, M. R.** (2013). Photobioreactors for Mass Production of Microalgae. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, 225-265

## 7 Ringraziamenti

Sono trascorsi due anni dall'inizio di questa mia nuova avventura, due anni pieni di avvenimenti personali e cambiamenti. Di questi due anni uno è trascorso tra i corridoi del laboratorio di fisiologia vegetale tra vari tirocini e trasferimenti di materiale e altro da Ortona con la scritta "Tesi vale o Phaeo Vale"! Quindi mi sento di dover ringraziare varie persone.

Un grazie va alla mia famiglia: mamma, papà e Mery. Avete sempre riposto fiducia in me, mi avete spinto a fare di più e sempre meglio e questo lavoro è frutto dei vostri insegnamenti. Siamo una famiglia strana, non normale probabilmente che in questi due anni ne ha viste delle belle e ha sentito tremare la terra sotto i piedi spesso ma ci siamo ancora tutti e quattro. Grazie! "Il fasciame di tutta la creazione è amore e l'amore combacia con il significato di tutte le cose: la felicità".

Ringrazio la Prof.ssa Rossella Pistocchi per avermi pazientemente seguita e formata, soprattutto in quest'ultimo periodo di stesura della tesi.

Ringrazio il Dott. Silvio Bartolotti per avermi concesso la possibilità di svolgere questo magnifico lavoro presso la sede operativa di Micoperi ad Ortona.

Ringrazio il Dott. Guido Emiliani per avermi accolta sin da subito in Micoperi Blue Growth e fatta sentire parte di questo grande progetto di cui ne è il capo.

Ringrazio la Dott.ssa Franca Guerrini, con la sua materna presenza mi ha sempre incoraggiata ad andare avanti, grazie!

Ringrazio tutto lo staff di Micoperi e Micoperi Blue Growth di Ortona per avermi allietato le giornate lavorative di quei quattro mesi trascorsi lì, tra piante e risate. Grazie di cuore.

Grazie a Matilde, la mia correlatrice per aver avuto pazienza con me (è stato un duro lavoro, lo so!) e per essersi fidata.

Grazie a Matteo, senza i suoi insegnamenti non avrei affrontato quest'esperienza in maniera così produttiva per il mio futuro lavorativo e la mia persona.

Un particolare grazie va a Flavio e Tonia. Giornate intere a lavorare intensamente in laboratorio tra mille risate e mille problemi. Avete apprezzato il meglio di me,

accettando il peggio di me. Non mi avete mai fatta sentire fuori luogo e avete dato il massimo di voi per insegnarmi tanto e nel migliore dei modi: la maggior parte di quello che ho appreso lo devo a voi e al vostro tempo investito su di me. Ricorderò per sempre quei momenti con nostalgia e felicità insieme. Grazie.

Grazie alle mie compagne di laboratorio a Ravenna: Martina e Federica, per le risate e le depressioni condivise.

Grazie Barbara, mi vuoi davvero bene e mi hai insegnato che la passione verso qualcosa va inseguita fino alla fine. Mi hai trasmesso la voglia di rischiare per ottenere quel che si vuole nella vita e... che si studia con le matite temperate!

Un grazie alle mie coinquiline: donne più pazienti e problematiche di loro non le ho ancora incontrate.

Grazie ad Eleonora e alla sua saggezza trentennale ormai. Non mi abbandonerai, vero?

Grazie alla Socia presente in ogni mia giornata e scelta da, ormai, 12 anni.

E poi grazie a Marco, Strazio, Enrico, Pelo, Maurizio e a tutta la compagnia del profondo sud: vi voglio bene e mi mancate sempre. E' bello vedere che siamo ancora tutti insieme e tutti uguali da quel fatidico primo anno di Liceo.

Grazie a Donatella, affidabile come pochi.

Grazie alla Vi, alla sua macchinina, ai suoi selfie e alle nostre interminabili telefonate a parlare sempre delle solite cose con le solite lamentele: solo noi!!!

Grazie alle colleghe cartole, ci siamo un po' perse ma non dimenticherò mai le risate a lezione e i ritardi di Federica!!!

E poi grazie Frans, credo di volerti bene.