

ROBERTO BASSI\*, SILVIA BERTEOTTI\*, MATTEO BALLOTTARI\*,  
ALESSANDRO ALBORESI\*, NICO BETTERLE\*, LUCA DALL'OSTO\*

## Domesticazione delle alghe unicellulari per la produzione di biocombustibili in fotobioreattore

### I. IL PROBLEMA ENERGETICO E L'ENERGIA SOLARE

La società si trova attualmente di fronte a un grave problema energetico: la popolazione mondiale è cresciuta da 2,5 miliardi nel 1950 a 7 miliardi nel 2011, e si prevede che raggiungerà i 9 miliardi nel 2050, accompagnata da un aumento della domanda energetica: si stima che gli attuali 14 TW consumati annualmente per le attività antropiche, raddoppieranno nel 2050. Al momento, la domanda energetica globale è soddisfatta per l'80% da combustibili fossili come petrolio, carbone e gas naturale. Mentre le riserve di combustibili fossili di alta qualità si stanno esaurendo, il livello di composti inquinanti volatili come benzene, formaldeide e acetaldeide aumenta assieme alle concentrazioni atmosferiche dei gas a effetto serra: anidride carbonica ( $\text{CO}_2$ ), monossido di carbonio (CO), ossidi d'azoto ( $\text{NO}_x$ ) e di-ossidi di zolfo ( $\text{SO}_2$ ).

A causa sia della carenza in energia, che rischia di limitare lo sviluppo mondiale, sia dei problemi ambientali associati alla combustione del petrolio, è necessario trovare una o più fonti energetiche alternative ai combustibili fossili. Fonti disponibili con preferenza tra quelle " $\text{CO}_2$ -free", cioè la cui combustione non porti a un aumento di  $\text{CO}_2$  atmosferica.

Fra le fonti energetiche disponibili sulla superficie terrestre quella più abbondante è la luce solare, con i suoi 178000 TW per anno. La tecnologia attualmente disponibile per raccoglierla: pannelli solari termici o i fotovoltaici al silicio, è efficiente ma non è ancora abbastanza economica per competere con i combustibili fossili. Inoltre, produce calore o elettricità, energie subito

\* Dipartimento di Biotecnologie, Università di Verona

disponibili ma non facilmente accumulabili, né utilizzabili come combustibili per veicoli terrestri o aerei.

Altre fonti energetiche rinnovabili, come quella geotermica o l'eolica, riescono a soddisfare solo una piccola percentuale della richiesta energetica globale, dato che non sono presenti in modo costante nel tempo e/o in un'area precisa.

I paesi aderenti al Protocollo di Kyoto hanno fissato l'obiettivo di diminuire le proprie emissioni di CO<sub>2</sub> entro il 2020, adottando politiche di risparmio energetico e utilizzando alternative ai combustibili fossili.

Il 60% dei combustibili fossili oggi scoperti si sono formati 120-80 milioni di anni fa dalla decomposizione anaerobica di depositi di organismi fotosintetici, come alghe e piante superiori. La fotosintesi è dunque all'origine dei combustibili fossili, e può essere sfruttata tuttora per la produzione di biocombustibili "CO<sub>2</sub>-free". I biocombustibili sono una fonte energetica promettente. Oltre al legname, tuttora il biocombustibile più usato, il bioetanolo e il biodiesel, prodotti da colture agrarie, appartengono ai cosiddetti combustibili di prima generazione, e hanno già trovato una collocazione nel mercato dell'energia. Il Brasile è il primo produttore di bioetanolo (46.2% della produzione mondiale, con 28.2 milioni di tonnellate nel 2008), seguito dagli Stati Uniti (19.97 milioni di tonnellate nel 2008). Il bioetanolo è ricavato da piante con elevato contenuto di zuccheri solubili, come la barbabietola o la canna da zucchero, o da piante ricche in amido, come il mais. Gli zuccheri disponibili sono trasformati in etanolo durante il processo di fermentazione alcolica ad opera di lieviti. Il secondo biocombustibile, per livello di produzione su scala mondiale, è il bio-diesel di prima generazione, ottenuto da oli vegetali, principalmente di soia, palma e colza. L'Europa è il paese leader con 4,9 milioni di tonnellate prodotte nel 2008, pari al 58% della produzione mondiale.

Tuttavia, i biocombustibili di prima generazione non sono la chiave per risolvere il problema energetico: la questione "*fuel vs food*" riassume i rischi legati allo sfruttamento dei terreni agricoli per la produzione di biocombustibili, che avverrebbe a scapito della produzione alimentare. Infatti, la produzione di biocombustibili di prima generazione sfrutta terreni fertili altrimenti destinati all'agricoltura, diminuendo così la produzione globale di cibo. Per ottenere 49 miliardi di litri di bioetanolo è stato consumato circa il 40% del mais prodotto negli Stati Uniti, coltivato su 13 milioni di ettari di terreno, facendo di conseguenza lievitare i prezzi della granella di mais sui mercati internazionali. Il rialzo del costo della materia prima (grano e cereali) ha causato rincari dei prodotti derivati: +30% per la pasta, +15% per i dolci, +

pane, e un aumento del prezzo dei foraggi e della carne (Naik et al., 2010). Un'analoga considerazione può essere fatta per la produzione di biodiesel da soia e colza. In sostanza: trasformare il cibo in biocombustibili non è una strategia sostenibile.

La progressiva sostituzione dei derivati del petrolio o del carbone con forme alternative di energia garantirebbe la sostenibilità ambientale dei processi produttivi globali. In quest'ottica, il biodiesel di terza generazione da microalghe, rappresenta una promettente possibilità. Si tratta di un combustibile rinnovabile, biodegradabile, dal costo competitivo con i combustibili tradizionali, a zero emissioni di gas a effetto serra. Soprattutto, per la produzione di tale biomassa non vengono sfruttati terreni destinati all'alimentazione umana.

Affinché l'utilizzo di biodiesel di terza generazione possa estendersi su larga scala, è però necessario superare alcuni limiti produttivi. Lo scopo della ricerca biotecnologica in questo campo è sviluppare una tecnologia per la produzione di grandi quantità di biomassa algale minimizzando i costi di costruzione e gestione degli impianti per la coltivazione delle alghe, "i fotobioreattori". Le alghe unicellulari che si trovano nell'ambiente naturale si sono appunto evolute per vivere nei corpi acquosi nelle condizioni "naturali" cioè a luce bassa e a bassa densità cellulare. Le condizioni nei fotobioreattori sono opposte e rendono la crescita delle alghe molto inefficiente.

È necessario perciò domesticare le specie algali per (i) una migliore efficienza nell'uso della luce, e per (ii) incrementare la quantità in lipidi accumulati, al fine di abbattere i costi legati alla costruzione e gestione degli impianti fotobioreattori, e al trattamento della biomassa.

## 2. LE MICROALGHE COME RISORSA DI ENERGETICA ALTERNATIVA AL PETROLIO

Le alghe costituiscono un gruppo eterogeneo formato da più di 40.000 specie, aventi fenotipi molto variegati, e distribuite in tutti gli ecosistemi (fig. 1).

I biocombustibili ottenibili da alghe sono di diverse tipologie: bio-diesel, dall'estrazione delle riserve lipidiche cellulari; bio-etanolo, dalla fermentazione di idrolizzati algali; bio-gas dalla digestione anaerobica della biomassa; isoprene, dall'attività della isoprene sintasi di piante il cui gene può essere espresso nelle alghe (Schenk et al., 2007; Adams et al., 2008; Kim et al., 2011; Bruhn et al., 2011; Lindberg et al., 2010). In particolare, per biodiesel s'intende una miscela di esteri metilici di acidi grassi (FAME: *Fatty Acid*

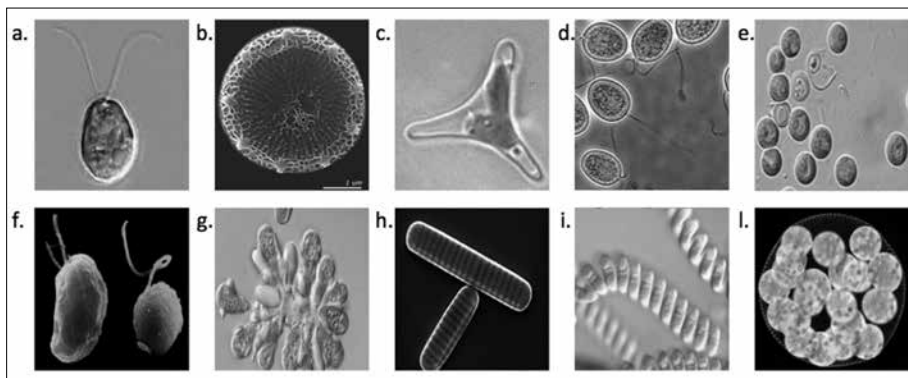


Fig. 1 Biodiversità nelle microalghe. a. *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophytes); b. *Thalassiosira pseudonana* (Diatoms); c. *Phaeodactylum tricornutum* (Diatoms); d. *Dunaliella salina* (Chlorophyceae); e. *Chlorella vulgaris* (Chlorophytes); f. *Guillardia theta* e *Bigelowiella natans* (Cryptomonads); g. *Botryococcus brauni* (Chlorophyceae); h. *Fragilariopsis cylindrus* (Diatoms); i. *Arthrospira maxima* (Cyanophyceae); l. *Volvox carteri* (Chlorophytes).

<https://wiki.umn.edu/IBS8102/030410-Molnar>; <http://www.rbg Syd.nsw>; <http://genome.jgi-psf.org>; [http://www.cambia.org.au/daisy/eos/4274/version/default/part/AttachmentData/data/2i6cv9w2\(2\)](http://www.cambia.org.au/daisy/eos/4274/version/default/part/AttachmentData/data/2i6cv9w2(2)); Henrik Lange e Gerhard Dieckmann (Alfred-Wegener Institute for Polar and Marine Research, Germany); Charles University in Prague; Dr. Geoff McFadden (University of Melbourne, Australia)

*Methyl Ester*) ottenuta dalla reazione di trans-esterificazione di trigliceridi con metanolo, in presenza di un catalizzatore alcalino (KOH, NaOH o  $\text{CH}_3\text{O-Na}$ ). Come prodotto secondario della reazione si ottiene glicerina, che dopo raffinazione, può essere venduta all'industria farmaceutica e cosmetica, o essere riutilizzata nel bioreattore come fonte di carbonio per la crescita di nuova biomassa algale.

Le alghe, con la fotosintesi, sono in grado di convertire la luce solare in biomassa, una forma d'immagazzinamento di energia chimica di lunga durata. A seconda della specie algale, dal 30% all'70% della biomassa è costituita da oli e quindi da biodiesel per trans-esterificazione (Chisti, 2007; Hu et al., 2008). A parità di superficie di produzione, le microalghe permetterebbero di produrre 20-300 volte più biodiesel rispetto alle colture vegetali tradizionali. Il concetto è ancora più chiaro se si confrontano questi dati: il biodiesel prodotto dalla soia ha una resa di circa 450 litri/ettaro/anno, da girasole la resa sale a 952 litri/ettaro/anno, quantità nettamente inferiori rispetto a quelle ottenibili da alghe: 45,000 ai 137,000 litri/ettaro/anno. Basterebbe quindi un decimo dell'area oggi occupata dalle colture di soia, per soddisfare l'intera domanda di carburanti degli Stati Uniti. In

conclusione, le alghe unicellulari sono la fonte più promettente di biomassa a lungo termine (Chisti, 2007).

Produrre biocombustibili da alghe presenta molteplici vantaggi rispetto alle “*energy crops*” vegetali:

- I. La coltivazione algale non compete con le colture alimentari. Le alghe possono crescere in aree incolte, non fertili, marginali e anche in strutture galleggianti su specchi d'acqua.
- II. La coltivazione di alghe non comporta la dispersione nell'ambiente né di pesticidi, né di fertilizzanti. Si evita così la contaminazione del suolo e l'eutrofizzazione dei corpi idrici.
- III. Le microalghe possono vivere in acqua di mare, acque salmastre o reflui di scarto agricoli, industriali e civili. Dal punto di vista ambientale, la coltivazione estensiva di alghe è molto più sostenibile rispetto a quella delle colture alimentari convenzionali.
- IV. La durata del ciclo vitale delle alghe (ore) è molto breve se confrontata con quello delle specie agrarie (tipicamente un anno solare). Le alghe si riproducono durante tutto l'anno, permettendo un veloce *turn-over* e un'elevata resa in biomassa.
- V. Molte alghe sono mixotrofe, in grado cioè di sfruttare composti organici come fonte di carbonio e in questa maniera possono crescere anche al buio.
- VI. La maggior parte della biomassa cellulare algale è fotosinteticamente attiva. Nelle piante, invece, la fotosintesi avviene esclusivamente nelle foglie, che rappresentano solo il 10-40% dell'intera biomassa vegetale.
- VII. La fotosintesi delle alghe non è facilmente saturata dal livello di  $\text{CO}_2$ : aumenta, invece, con la concentrazione di  $\text{CO}_2$ . Le microalghe possono vivere a concentrazioni di  $\text{CO}_2$  fino al 18%, che possono acquisire sia dall'atmosfera, sia dall'acqua sotto forma di  $\text{HCO}_3^-$ . Le piante invece, che assorbono la  $\text{CO}_2$  dall'atmosfera, sono limitate nella sua captazione dal livello di apertura degli stomi i quali vengono tenuti tendenzialmente chiusi per evitare la disidratazione. È stato stimato che il livello di organizzazione della  $\text{CO}_2$  algale è circa 10 volte più alta di quella di una foresta in clima temperato (Otsuki, 2001).
- VIII. La  $\text{CO}_2$  può essere fornita anche da fumi di combustione, come quelli prodotti dalle centrali elettriche a carbone, che si caratterizzano per un elevato carico inquinante. Lo sfruttamento di questi fumi permetterebbe di accoppiare processi industriali inquinanti a bioreattori per la crescita di biomasse algali. La Seambiotic Ltd in Israele è la prima industria che ha messo appunto questo impianto, producendo additivi alimentari ad alto valore aggiunto (Omega-3 e altri acidi grassi), mangimi per pe-

scicoltura, e biodiesel ([www.seambiotic.com](http://www.seambiotic.com)). Altri impianti pilota sono in fase di sperimentazione in Giappone.

Considerando il progressivo impoverimento dei giacimenti di combustibili fossili e il conseguente aumento del prezzo dei combustibili tradizionali, l'utilizzo delle microalghe come fonte di biocarburanti sta diventando un'opzione sempre più promettente per investimenti industriali (Formighieri e Bassi, 2011).

### 3. PRODUTTIVITÀ ALGALE IN LABORATORIO E NEGLI IMPIANTI INDUSTRIALI

Le alghe convertono l'energia solare in energia chimica attraverso la fotosintesi. La produttività teorica massima in biomassa è di 77 g per m<sup>2</sup> per giorno (280 tonnellate per ettaro per anno) (Melis, 2009). Tale valore è 25 volte maggiore rispetto alla produttività teorica massima stimata per le piante vascolari. In laboratorio la resa reale in biomassa algale non è molto diversa dalla stima teorica.

Al momento i sistemi più utilizzati per la coltivazione di masse algali su larga scala sono le vasche aperte (*open ponds*), poiché facili da costruire, adatte a incrementi del volume di produzione, poco costose, aventi produttività massima in biomassa pari a 10-25 g per m<sup>2</sup> per giorno. Si tratta di stagni artificiali, nei quali alghe, acqua e sostanze nutritive circolano lungo un canale circolare, grazie a un sistema di pale che garantisce il flusso e la continua miscelazione della biomassa (fig. 2 A). Gli stagni sono solitamente poco profondi (15-20 cm) perché le alghe hanno bisogno di luce solare, la quale può però, penetrare nella coltura algale per una profondità molto limitata a causa dell'alta concentrazione dei pigmenti nelle cellule stesse. La coltura di alghe in vasche aperte procede *in continuo*: un flusso costante di biomassa algale è prelevato dal sistema e sostituito con mezzo di crescita fresco, in modo da stabilizzare il tasso di crescita e la resa del sistema.

Un diverso sistema colturale prevede il ricorso a fotobioreattori (fig. 2 B-D), sistemi chiusi, tubulari, di capienza variabile, in cui il rimescolamento della coltura è garantito da un flusso d'aria, arricchita in CO<sub>2</sub>, insufflato dal fondo del recipiente. Si tratta di sistemi sicuramente più costosi rispetto alle vasche aperte, che tuttavia presentano considerevoli vantaggi:

- permettono un migliore controllo delle condizioni di crescita (pH e temperatura); può essere regolata la concentrazione della CO<sub>2</sub> disponibile; è possibile il ricircolo della biomassa ed è minore la perdita d'acqua per evaporazione;
- è minore il rischio di contaminazione da microorganismi che interferiscono con la crescita algale: la crescita è più riproducibile;

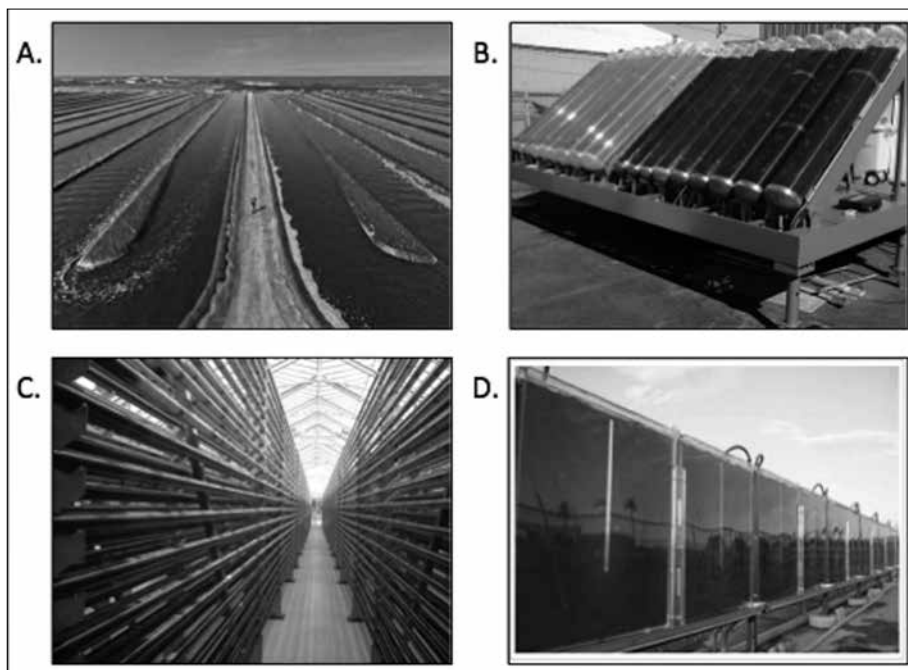


Fig. 2 Sistemi impiantistici per la coltivazione di microalghe: A. Open ponds; B. Fotobioreattori tubulari verticali; C. Fotobioreattori tubulari orizzontali. D. Fotobioreattori piatti a pannello. <http://www.algae.wur.nl/UK/>

- la biomassa raggiunge concentrazioni cellulari circa 30 volte più elevate rispetto alle vasche aperte, è pertanto minore il volume di mezzo colturale da processare per la raccolta della biomassa. Il risparmio è considerevole, poiché le fasi di centrifugazione o filtrazione, necessari per la raccolta delle alghe, sono fra i passaggi più costosi dell'intero processo produttivo;
- possono essere illuminati anche lateralmente, oltre che da sopra, assicurando un maggiore apporto di energia e di superficie illuminata rispetto al volume.

Nonostante gli indubbi vantaggi, gli elevati costi d'investimento di un fotobioreattore, possono essere giustificati solo se la produttività del sistema è molto alta. A questo può contribuire un intervento di *domesticazione* delle microalghe, al fine di individuare ceppi modificati e altamente produttivi.

Il sistema ottimale (come si vede nella figura 3, rappresentato in modo schematico) (Singh e Dhar, 2011) è quello di produrre in maniera integrata diversi biocombustibili, biomassa fertilizzante, e co-prodotti a elevato valore aggiunto ( $\beta$ -carotene, vitamina B, chetocarotenoidi come l'astaxantina). Per

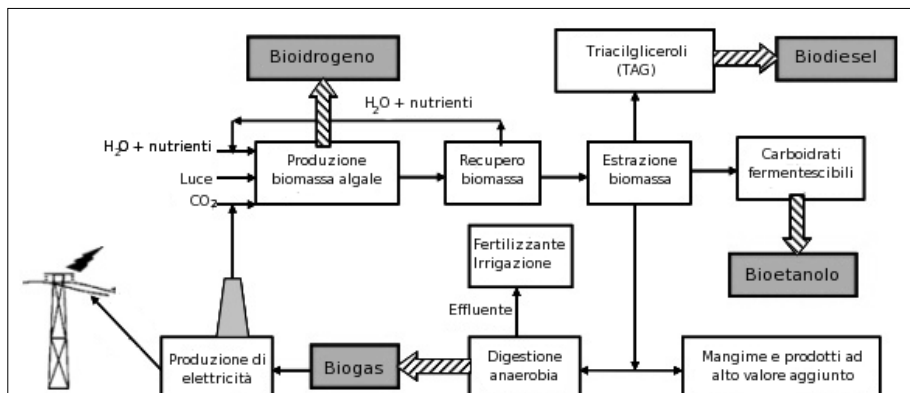


Fig. 3 Rappresentazione schematica della produzione integrata di biocombustibili, biomassa fertilizzante, e prodotti ad alto valore aggiunto (Singh e Dhar 2011)

arrivare a ciò è necessario superare alcuni punti critici, individuando metodi efficienti per la raccolta e la disidratazione della biomassa, legando la produzione al trattamento di reflui inquinanti, e selezionando ceppi efficienti, aventi elevate rese in biomassa e contenuto lipidico.

#### 4. LA DOMESTICAZIONE DELLE MICROALGHE

Da quanto esposto sopra sembrerebbe che la produzione di bioenergia da alghe unicellulari non sia un problema e che si tratti solo di sviluppare un sistema industriale adeguato. Sfortunatamente non è così: la produttività algale per volume d'impianto installato è tuttora molto bassa, inferiore a quella teoricamente attesa, tanto da rendere economicamente insostenibile la produzione industriale. Le ragioni appaiono complesse, la loro comprensione e il superamento degli attuali limiti del sistema richiedono un importante sforzo intellettuale e sperimentale. La posta in gioco è la possibilità di vivere usando energia pulita, eco-compatibile ed eco-sostenibile. È chiaro che le alghe unicellulari che si trovano nel nostro ambiente naturale sono, appunto, evolute per vivere nei corpi idrici nelle condizioni "naturali" cioè a luce bassa e a bassa densità cellulare. Le condizioni nei fotobioreattori (elevata densità cellulare ed elevate intensità luminose) sono opposte e rendono la crescita delle alghe molto inefficiente. Questo non è un problema nuovo: l'uomo già circa 10.500 anni fa cominciò a coltivare le piante trovate in natura. Per migliorare la resa, cominciò a selezionare cereali e legumi provvisti di tratti morfologici e nutrizionali migliori (Doebley et al., 2006).



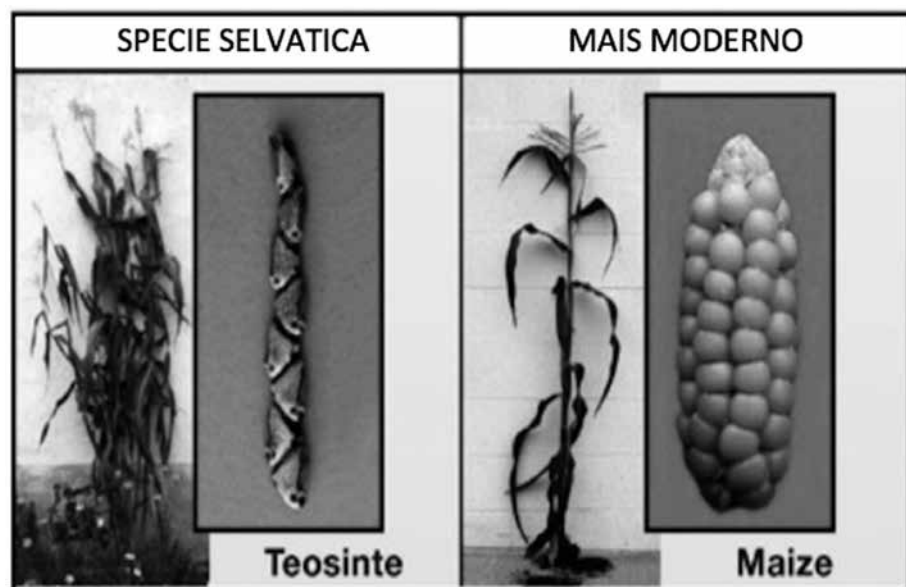


Fig. 4 Confronto fra mais moderno e la specie selvatica *Teosinte*; quest'ultima rappresenta il punto di partenza del processo di domesticazione che ha portato all'attuale granoturco (Doebley et al., 2006)

Le specie oggi coltivate sono il risultato di numerosi cicli di selezione fenotipica, incrocio, e mutagenesi. Ad esempio il mais è stato domesticato dalla specie selvatica *Teosinte*, processo che ha permesso di incrementare la densità di crescita e la resa in granella delle colture in campo (fig. 4). Per le microalghe oggi è necessario perseguire una nuova “rivoluzione verde”, una svolta analoga a quella avvenuta per le piante a interesse agronomico, che ha permesso di triplicare la produttività di mais e frumento, e quindi soddisfare il fabbisogno nutrizionale dei primi anni 30.

Lo stesso va fatto per le alghe, con la differenza che le loro dimensioni microscopiche le rendono inadatte a una selezione effettuata da agricoltori e richiedono uno studio in laboratorio da parte di genetisti e microbiologi.

La domesticazione delle alghe è quindi un processo necessario, per produrre biocombustibili su larga scala. Per individuare ceppi a elevata produttività in fotobioreattore, è necessario sia selezionare ceppi algali con caratteristiche peculiari, sia introdurre nuovi alleli con procedimenti di mutagenesi e di ingegneria genetica.

Il presupposto alla base della domesticazione delle specie algali è i) che esse siano facilmente coltivabili in laboratorio, e ii) che vi sia una buona

conoscenza della biologia dell'alga stessa, in particolare in termini di ciclo vitale, ecologia, fisiologia, biochimica e genetica. Per una rapida domesticazione è importante avere la possibilità di operare la segregazione di alleli diversi, attraverso la riproduzione sessuale, al fine di selezionare quelli più vantaggiosi. È necessario poi definire protocolli di trasformazione genetica, in modo da poter introdurre DNA esogeno nella cellula, e individuare sistemi marcatori efficienti per la selezione dei trasformanti. Su queste basi è evidente che ben poche specie algali soddisfano tutti questi requisiti: praticamente solo *Chlamydomonas reinhardtii* (Merchant et al., 2007), per cui è nota la procedura di induzione della gametogenesi, formazione di zigoti e segregazione. Per altre specie algali come *Nannochloropsis*, *Dunaliella salina*, *Hematococcus pluvialis* e *Clorella vulgaris*, sono conosciuti metodi d'inserimento di DNA esogeno e selezione dei trasformanti. È urgente che la biologia di base di molte specie algali sia approfondita con metodi genetici per rendere il processo di domesticazione più veloce ed efficiente.

La mutagenesi e la modificazione genetica delle alghe sono interventi necessari per rimuovere le limitazioni economiche e produttive che ancora gravano sulla produzione di biocarburanti. In particolare questi sono gli interventi che contribuiranno al miglioramento della produttività delle alghe unicellulari in fotobioreattore:

- aumento dell'efficienza fotosintetica nell'uso della luce, per permettere un maggiore accumulo di biomassa;
- aumento dell'efficienza nella cattura della CO<sub>2</sub>, per rimuovere la limitazione nella diffusione della CO<sub>2</sub> e per permettere un pieno utilizzo dell'energia luminosa assorbita;
- aumento del contenuto in olio della biomassa algale, e la modulazione della composizione in acidi grassi, per ottenere una migliore qualità di carburante;
- la produzione di composti ad alto valore aggiunto e proteine ricombinanti d'interesse chimico-farmaceutico, al fine di ammortizzare più velocemente i costi degli impianti.

Attualmente si possono manipolare geneticamente in modo efficace circa 25 specie, principalmente alghe verdi, rosse e diatomee (Hallmann, 2007). Fra queste vi sono membri del genere *Chlorella spp.* caratterizzati da una rapida crescita della biomassa (tempo di duplicazione di circa 5 ore); *Dunaliella spp.* la quale produce β-carotene, additivo utilizzato nella mangimistica e nell'industria alimentare; *Nannochloropsis spp.* caratterizzata da un contenuto in olio fra i più elevati (28-68% su peso secco (Campbell, 2008)).

## 5. EFFICIENZA DI UTILIZZO DELLA LUCE

Il maggior limite da superare per massimizzare la produttività algale riguarda l'efficienza nell'utilizzazione della luce: più dell'80% dei fotoni incidenti non sono utilizzati nella fotosintesi, poiché buona parte dell'energia assorbita è dissipata come calore (*Non Photochemical Quenching* - NPQ) e come fluorescenza. Tale fenomeno diventa tanto maggiore quanto più aumenta la densità cellulare nella coltura, allontanando la possibilità di raggiungere alte concentrazioni di biomassa, necessarie alla sostenibilità economica del sistema. Ciò è dovuto all'evoluzione delle alghe avvenuto nell'ambiente naturale, in cui vi è bassa densità cellulare, limitata disponibilità di luce e sostanze minerali. Le alghe possiedono un efficiente sistema antenna per la raccolta della luce solare, che contiene centinaia di molecole di clorofilla. Questo sistema di raccolta della luce, indispensabile per la crescita a profondità elevate, rappresenta una grande limitazione per la crescita in fotobioreattore, in quanto l'alta concentrazione di pigmenti (clorofilla e carotenoidi) conferisce un'elevata densità ottica alla coltura e causa un completo assorbimento della luce da parte degli strati superficiali della coltura. Il risultato è la presenza di un gradiente di luce all'interno del fotobioreattore: la maggior parte dell'energia luminosa incidente è assorbita dal primo strato superficiale di cellule, le quali non sono in grado di utilizzarla se non in minima parte per il loro metabolismo. L'eccesso di luce attiva meccanismi specifici per dissipare l'energia in eccesso in calore (dissipazione termica), in particolare si attiva un meccanismo chiamato *Non-Photochemical Quenching* (NPQ). Inoltre l'eccesso di energia provoca fotoinibizione, con conseguente perdita in produttività. Negli strati più profondi della coltura la luce è debole o assente, limitando la fotosintesi. Le cellule, peraltro respirano consumando composti organici, e quindi dissipano energia metabolica. Solo lo strato cellulare intermedio si trova in condizioni d'illuminazione ottimali per l'attività fotosintetica, e dà il massimo contributo alla produttività della coltura cellulare (fig. 5) (Formighieri e Bassi, 2011).

Una strategia di miglioramento dell'utilizzo della luce è diretta a combinare una riduzione del contenuto in pigmenti per cellula (per garantire una maggiore omogeneità dell'illuminazione nel fotobioreattore) e una diminuzione del livello di NPQ (per ridurre la frazione di energia assorbita dissipata in calore).

Da quanto sopra descritto, appare chiaro come sia necessario limitare la dissipazione termica dell'energia assorbita dalle alghe per migliorare l'efficienza di conversione della luce in biomassa. Tutti gli organismi fotosintetici possiedono un sistema molecolare capace di dissipare l'ener-

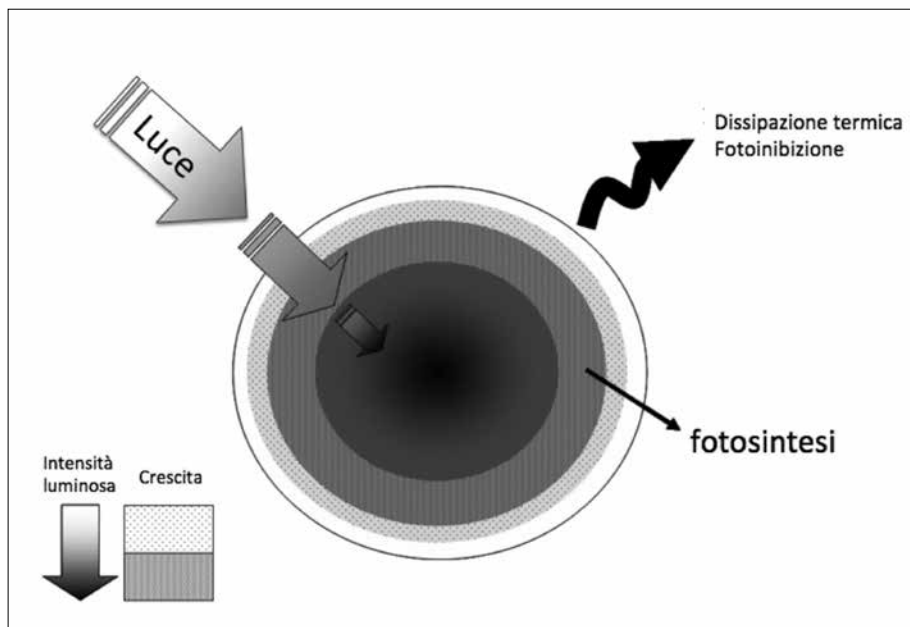


Fig. 5 Schema di fotobioreattore tubolare in sezione trasversale. Una coltura del ceppo selvatico (*wild-type*) assorbe la maggior parte della luce negli strati superficiali a causa dell'alto contenuto di pigmenti per cellula. La luce assorbita è in eccesso ed è dissipata termicamente dai meccanismi di fotoprotezione della cellula. Al centro della coltura la luce è debole o assente. Solo lo strato cellulare intermedio si trova in condizioni ottimali per l'attività fotosintetica, e dà il massimo contributo alla produttività della coltura cellulare

gia assorbita come calore (NPQ) (De Bianchi et al., 2010). La proteina LhcSR è deputata a questa funzione nelle alghe verdi e nelle diatomee (Peers et al., 2009).

Questa viene accumulata in risposta alle condizioni di luce a cui la cellula è stata esposta durante la crescita (Bonente et al., 2011) e una volta accumulata, catalizza la dissipazione termica (NPQ), anche a luci relativamente basse. Questa è una risposta delle alghe unicellulari alle condizioni naturali dove, per evitare la fotoinibizione, preferiscono bloccare la fotosintesi e migrare verso zone meno illuminate della colonna d'acqua. Normalmente la maggior parte delle specie algali si posizionano in zone in cui vi sono circa  $200 - 300 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$  quindi condizioni luminose al di sotto dell'intensità di saturazione della fotosintesi, mentre in una giornata soleggiata sono disponibili sulla superficie  $2000 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$  circa. Lo studio di NPQ e delle proteine che regolano questa funzione sarà d'importanza fondamentale nella domesticazione delle alghe per la produzione di biocombustibili.

## 6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

A tutt'oggi, i biocombustibili più usati a livello mondiale sono il bioetanolo e il biodiesel, derivati entrambi da biomasse vegetali. Queste fonti energetiche, dette "biocombustibili di prima generazione" gravano sulla filiera alimentare, poiché la loro produzione sottrae terreni destinati alle coltivazioni alimentari. Le biomasse algali consentirebbero di aggirare il problema, permettendo di ottenere biodiesel di terza generazione. Le alghe oggi utilizzate in ambito industriale sono ceppi selvatici (*wild-type*) provenienti dall'ambiente naturale. Le microalghe sono utilizzate come "*cell-factory*" per produrre composti ad alto valore aggiunto e proteine ricombinanti destinate all'industria farmaceutica. Il costo unitario di produzione è però eccessivo quando lo scopo principale è la produzione di biomassa, e quindi di biocombustibili rinnovabili ed eco-sostenibili. Affinché la coltivazione algale possa diventare una realtà economicamente competitiva, è necessaria la domesticazione, cioè la selezione di ceppi algali con peculiari caratteristiche e con nuovi tratti, introdotti attraverso approcci di mutagenesi e ingegneria genetica. I timori dell'opinione pubblica sulle questioni della biosicurezza potranno essere controbilanciati dagli indubbi vantaggi legati all'utilizzo di alghe transgeniche per la produzione di biocombustibili, considerando anche che tali organismi sono fatti crescere in ambienti chiusi e circoscritti, come i fotobioreattori. È inoltre facilmente dimostrabile che un'alga ingegnerizzata per crescere ottimamente in fotobioreattore, non potrà sopravvivere in ambiente naturale a causa dell'incapacità di assorbire abbastanza luce e di essere fotoprotetta per NPQ.

Oltre a quelle elencate sopra, ci sono altre strategie per aumentare ulteriormente la produttività delle colture algali. Una di queste consiste nello sfruttamento della caratteristica di molte alghe unicellulari di essere mixotrofe, in grado cioè di utilizzare composti organici come fonte di carbonio, riuscendo così a crescere anche al buio. In tal modo si avrebbe un incremento considerevole nella produzione di biomassa algale. Il carbonio organico da fornire alle microalghe potrebbe anche derivare dalla degradazione di materiale lignocellulosico. L'energia ricavabile dalla conversione della cellulosa è potenzialmente enorme, poiché si tratta di un materiale abbondante, a bassissimo costo, la cui produzione non interferisce con le coltivazioni a scopo alimentare. Tale materiale è una fonte alternativa di biomassa, e comprende gli scarti agricoli/industriali, i residui cartacei, i rifiuti solidi urbani derivanti dalla raccolta differenziata o le cosiddette *energy-crop*, ossia colture erbacee a basso costo di mantenimento, quali *Miscanthus sp.* Queste tipologie di biomasse lignocellulosiche vengono solitamente eliminate per combustione o compostaggio.

Per liberare gli zuccheri contenuti nella matrice lignocellulosica è necessario trovare un metodo efficiente e poco costoso per rompere le pareti cellulari dei vegetali. Lo scopo è liberare la cellulosa immersa nello scheletro polimerico della matrice vegetale, rendendola disponibile per enzimi o agenti chimici, ottenendo così una fonte di carbonio più facilmente utilizzabile dalle microalghe. Sono state proposte diverse strategie di pre-trattamento: processi fisici, come la triturazione meccanica; processi chimici, come l'idrolisi acida; processi fisico-chimici, come lo *steam explosion*. Quest'ultima è la tecnica più utilizzata e consiste in un trattamento idrotermico con vapore saturo ad alta pressione (160°C-260°C; 4,83 MPa) e un successivo abbassamento repentino di pressione. Grazie a questo pre-trattamento, le fibrille di cellulosa si estraggono dalla matrice emicellulosica, permettendo così di raggiungere circa il 90% di efficienza nella successiva fase idrolitica. Tuttavia i trattamenti appena descritti sono ancora troppo costosi, lenti, poco efficienti e/o portano alla formazione di sostanze inibitorie degli enzimi idrolitici quali i furani e alcuni composti fenolici.

Una tecnica alternativa di pretrattamento delle biomasse lignocellulosiche, che sta aprendo interessanti prospettive, prevede il ricorso a sistemi biologici. Numerosi funghi e microrganismi sono capaci di degradare i componenti della parete cellulare, convertendola in zuccheri. Alcuni batteri sono in grado di colonizzare una vasta gamma di nicchie ecologiche. Esistono ceppi cellulolitici in grado di resistere a condizioni ambientali estreme, come esempio temperature molto alte (specie ipertermofile) o molto basse (specie psicrofile), o elevate acidità (specie acidofile) (Maki et al., 2009). Non solo questi ceppi abitano ambienti con caratteristiche fisico-chimiche simili alle condizioni di un processo impiantistico, ma molto spesso sono in grado di produrre enzimi che offrono diversi vantaggi biotecnologici e industriali rispetto agli enzimi mesofili. In particolare, gli enzimi ipertermofili sono più facili da purificare tramite trattamento termico, e la loro termostabilità è spesso correlata a un'alta resistenza ai denaturanti chimici. Oltre a ciò, poter condurre reazioni enzimatiche ad alte temperature permette di evitare contaminazioni microbiche, di abbassare la viscosità del mezzo, e spesso di raggiungere rese più alte (Unsworth et al., 2007).

Sfruttando enzimi "estremofili" per la degradazione della parete cellulare, si potrebbe migliorare notevolmente il processo di pre-trattamento, combinando sistemi chimico-fisici e biologici. Diverse specie di batteri e archaea termoresistenti, in grado di utilizzare glucani per crescere, sono tutt'ora al centro di studi finalizzati all'utilizzo di queste specie nella produzione industriale. Tra questi figurano membri del regno degli Archaea, come *Thermococ-*

*cales*, *Sulfolobales*, ed eubatteri ipertermofili quali *Thermotogales* e *Clostridiales* (Haki, 2003).

La ricerca biotecnologica sull'utilizzo di enzimi termoresistenti per la degradazione della parete cellulare potrà contribuire all'eliminazione di alcuni punti critici della produzione di bioenergia a partire da residui ligno-cellulosici, e potrà contribuire allo sviluppo di filiere miste alimentari/bio-energetiche.

Concludendo, l'utilizzo di ceppi algali modificati per la produzione di biocombustibili rinnovabili e composti di alto valore aggiunto, rappresenta sicuramente una interessante e promettente prospettiva su cui investire risorse e ricavare uno stile di vita più pulito, rispettoso dell'ambiente e dotato di grandi risorse energetiche (Formighieri e Bassi, 2011).

#### RINGRAZIAMENTI

Gli studi commentati in questo articolo sono stati finanziati dalla comunità europea (Progetti “*Sunbiopaths*” e “*Harvest*”), dal ministero delle politiche agricole (Progetti “Idrobio” e “Biomassval”) e dalla Fondazione CARIVERO-NA (Progetto “Biomasse di oggi e di domani”).

#### RIASSUNTO

La società moderna si trova di fronte a un grave problema energetico: la popolazione mondiale è cresciuta da 2,5 miliardi nel 1950 a 7 miliardi nel 2011, e con essa è aumentata la domanda energetica, soddisfatta per 80% dai combustibili fossili. Per evitare una crisi energetica globale, è ormai evidente la necessità di incrementare l'uso di fonti energetiche alternative.

L'utilizzo di biomassa da microalghe per la produzione di biocarburanti, rinnovabili, biodegradabili, competitivi e zero emissioni di gas a effetto serra è un'interessante prospettiva, poiché la produzione di biomassa algale non compete per le terre coltivabili o per la domanda di cibo.

Il compito della ricerca biotecnologica in questo campo è la domesticazione di specie algali per una migliore efficienza d'uso della luce e per aumentare il contenuto di lipidi. Questo permetterà di ridurre i costi di costruzione e gestione degli impianti fotobioreattori e del trattamento della biomassa.

#### ABSTRACT

Modern society is facing a serious energy problem: the world's population has grown from 2.5 billion in 1950 to 7 billion in 2011, and with it increased energy demand,

satisfied by the use of fossil fuels for 80%, but they are rapidly running out. To avoid a global energy crisis, it is now a clear need to increase the use of alternative energy sources. The use of biomass of microalgae for the biofuels production, renewable, biodegradable, competitive and zero greenhouse gas emissions is a perspective shared since production with algae does not compete for arable land or for need for food.

The task of biotechnological research in this field is the domestication of algal species for better light-use efficiency and for increasing the lipid content. This will minimize the costs of construction and management of the photobioreactor installations and biomass treatment.

## BIBLIOGRAFIA

- ADAMS JM, GALLAGHER J A., DONNISON IS (2008): *Fermentation study on Saccharina latissima for bioethanol production considering variable pre-treatments*, «Journal of Applied Phycology», 21, pp. 569-574.
- BONENTE G., BALLOTTARI M., TRUONG T.B., MOROSINOTTO T., AHN T.K., FLEMING G.R., NIYOGI K.K., BASSI R. (2011): *Analysis of LhcSR3, a protein essential for feedback de-excitation in the green alga Chlamydomonas reinhardtii*, «PLoS biology», 9.
- BRUHN A., DAHL J., NIELSEN H.B., NIKOLAISEN L., RASMUSSEN M.B., MARKAGER S., OLESEN B., ARIAS C., JENSEN P.D. (2011): *Bioenergy potential of Ulva lactuca: biomass yield, methane production and combustion*, «Bioresource technology», 102, pp. 2595-604.
- CAMPBELL M.N. (2008): *Biodiesel: Algae as a Renewable Source for Liquid Fuel*, «Guelph Engineering Journal», 1, pp. 2-7.
- CHISTI Y. (2007): *Biodiesel from microalgae*, «Biotechnology advances», 25, pp. 294-306.
- DE BIANCHI S, BALLOTTARI M, DALL'OSTO L, BASSI R. (2010): *Regulation of plant light harvesting by thermal dissipation of excess energy*, «Biochemical Society Transactions», 38, pp. 651-660.
- DOEBLEY J.F., GAUT B.S., SMITH B.D. (2006): *Review The Molecular Genetics of Crop Domestication*, «Cell», 127, pp. 1309-1321.
- FORMIGHIERI C., BASSI R. (2011): *Algae as a new biomass resource – possibilities and constraints*, in *Encyclopedia of Sustainability Science and Technology (ESST)*, Springer Publishing.
- HAKI G. (2003): *Developments in industrially important thermostable enzymes: a review*, «Bioresource Technology», 89, pp. 17-34.
- HALLMANN A. (2007): *Algal Transgenics and Biotechnology*, «Transgenic Plant Journal», 1, pp. 81-98.
- HU Q., SOMMERFELD M., JARVIS E., GHIRARDI M., POSEWITZ M., SEIBERT M., DARZINS A. (2008): *Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances*, «The Plant journal: for cell and molecular biology», 54, pp. 621-39.
- KIM N.J., LI H., JUNG K., CHANG H.N., LEE P.C. (2011): *Ethanol production from marine algal hydrolysates using Escherichia coli KO11*, «Bioresource technology», 102, pp. 7466-9.
- MAKI M., LEUNG K.T., QIN W. (2009): *The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass*, «International journal of biological sciences», 5, pp. 500-16.
- MELIS A. (2009): *Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: Minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency*, «Plant Science», 177, pp. 272-280.



- LINDBERG P., PARK S., MELIS A. (2010): *Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using Synechocystis as the model organism*, «Metabolic Engineering», 12, pp. 70-79.
- MERCHANT S.S., PROCHNIK S.E., VALLON O., HARRIS E.H., KARPOWICZ S.J., WITMAN G.B., TERRY A., SALAMOV A., FRITZ-LAYLIN L.K., MARÉCHAL-DROUARD L., *et al.* (2007): *The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions*, «Science», 318, pp. 245-251.
- NAIK S.N., GOUD V.V., ROUT P.K., DALAI A.K. (2010): *Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review*, «Renewable and Sustainable Energy Reviews», 14, pp. 578-597.
- OTSUKI T. (2001): *A study for the biological CO<sub>2</sub> fixation and utilization system*, «The Science of the total environment», 277, pp. 21-5.
- PEERS G., TRUONG T.B., OSTENDORF E., BUSCH A., ELRAD D., GROSSMAN A.R., HIPPLER M., NIYOGI K.K. (2009): *An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis*, «Nature», 462, pp. 518-21.
- SCHENK P.M., KRUSE O., HANKAMER B. (2007): *Engineering photosynthetic light capture : impacts on improved solar energy to biomass conversion*, «Plant Biotechnology Journal», 5, pp. 802-814.
- SINGH N.K., DHAR D.W. (2011): *Microalgae as second generation biofuel. A review*, «Agronomy for Sustainable Development», 31, pp. 605-629.
- UNSWORTH L.D., VAN DER OOST J., KOUTSOPOULOS S. (2007): *Hyperthermophilic enzymes--stability, activity and implementation strategies for high temperature applications*, «The FEBS journal», 274, pp. 4044-56.

