

## L'importanza dell'efficienza fotosintetica per la produzione di biodiesel da alghe unicellulari

### LE ALGHE UNICELLULARI COME FONTE DI BIOCOMBUSTIBILI

Il possibile utilizzo degli organismi fotosintetici per la produzione di biocombustibili sta ricevendo un'attenzione crescente nell'ipotesi che questi possano, almeno parzialmente, sostituire i combustibili fossili (Chisti and Yan, 2011; Dismukes et al., 2008; Hannon et al., 2010; Hu et al., 2008; Malcata, 2011). Una delle possibilità più interessanti in questa direzione è la produzione di biodiesel a partire da fonti biologiche di trigliceridi. Attualmente la maggior parte del biodiesel presente sul mercato è prodotto a partire da semi di piante oleaginose quali il girasole o la soia. Utilizzare piante coltivate per questo scopo, tuttavia, presenta numerosi svantaggi il primo dei quali è una produttività limitata. Infatti, le riserve lipidiche all'interno dei semi utilizzabili per la produzione di biodiesel rappresentano soltanto il 5% dell'intera biomassa (Chisti, 2007; Jeong et al., 2004). Un'altra contro-indicazione molto importante è il fatto che l'utilizzo di piante coltivate per la produzione di biocombustibili sottrae terreno coltivabile al più tradizionale utilizzo per la produzione alimentare, sollevando molte comprensibili critiche di tipo etico (Singh et al., 2011).

Un'alternativa interessante che potenzialmente può permettere di superare queste limitazioni è lo sfruttamento di un altro gruppo di organismi fotosintetici, le microalghe. Alcune specie appartenenti a questo gruppo, infatti, hanno la capacità di accumulare grandi quantità di lipidi che possono essere estratti, processati e raffinati in combustibili liquidi quali il biodiesel direttamente utilizzabile dalle attuali infrastrutture dell'industria dei trasporti. Alcune specie

\* *Dipartimento di Biologia, Università di Padova*

di alghe sono in grado di accumulare oltre il 50% della loro biomassa sotto forma di lipidi e hanno una produttività potenziale di 10-20 volte superiore alle piante (Chisti and Yan, 2011; Hannon et al., 2010; Rodolfi et al., 2009). Una delle ragioni di questa maggiore produttività è il fatto che l'intera biomassa algale è fotosinteticamente attiva, a differenza delle piante dove alcuni tessuti come le radici e il fusto sono invece consumatori dei prodotti della fotosintesi. Le alghe, inoltre, non risentono della stagionalità tipica delle piante superiori nelle zone temperate e possono sostenere una produzione continua di biomassa per tutto l'anno. Inoltre, le alghe sono in grado di fissare l'anidride carbonica in modo molto più efficiente rispetto alle piante superiori ed è stato ipotizzato di associare la coltivazione di alghe ad impianti che producono grandi quantità di CO<sub>2</sub> per limitare la liberazione nell'atmosfera di questo gas serra (Hannon et al., 2010). Un ulteriore vantaggio delle alghe rispetto alle piante è il fatto che queste non necessitano di terreni fertili o acqua potabile e quindi gli impianti di coltivazione possono essere installati su terreni marginali eliminando la competizione con le produzioni alimentari. È quindi ormai chiaro nella comunità scientifica che le alghe rappresentano un'alternativa da tenere in assoluta considerazione per la produzione di biocombustibili su larga scala in una prospettiva a medio-lungo termine. È importante sottolineare, tuttavia, che questo elevato potenziale non è ancora efficacemente sfruttato dai sistemi di coltivazione su larga scala e che un intenso sforzo di ricerca è ancora necessario per rendere la produzione di biocarburanti una realtà economicamente competitiva (Amaro et al., 2011; Chisti and Yan, 2011; Malcata, 2011; Takeshita, 2011).

La definizione di microalghe racchiude in realtà un numero molto elevato di organismi molto diversi tra loro, adattati a vivere in condizioni ambientali molto differenti. All'interno di questa grande variabilità solo alcune specie hanno caratteristiche adatte a un loro sfruttamento per la produzione di biodiesel e per questa ragione la scelta dell'organismo da utilizzare nelle coltivazioni su larga scala è un fondamentale prerequisito per lo sviluppo di produzioni di questo tipo. È importante sottolineare che difficilmente si potrà isolare un organismo che possieda tutte le caratteristiche ideali e sarà fondamentale procedere con il miglioramento genetico delle specie di interesse per renderle ancora più produttive. In questo contesto alcune specie di alghe, come quelle appartenenti al genere *Nannochloropsis*, stanno emergendo come le più interessanti grazie ai loro buoni tassi di crescita (Sforza et al., 2010) e alla capacità di accumulare grandi quantità di lipidi che possono raggiungere anche il 60-70% del peso secco totale (Boussiba et al., 1987; Hodgson et al., 1991; Rodolfi et al., 2009). La recente disponibilità del geno-

ma di *Nannochloropsis* e lo sviluppo di metodi per introdurre modificazioni genetiche contribuiscono in modo fondamentale a rendere questo organismo probabilmente il modello più importante per lo studio della produzione dei biocombustibili in alghe (Kilian et al., 2011; Radakovits et al., 2012). Per questa ragione anche i successivi paragrafi si concentreranno su specie di *Nannochloropsis*.

#### EFFETTO DELLE DIVERSE CONDIZIONI DI ILLUMINAZIONE SULLA CRESCITA DI NANNOCHLOROPSIS

La crescita e la produttività delle colture algali sono influenzate da molti fattori il cui effetto deve essere compreso nei dettagli per riuscire a ottimizzare i sistemi di coltivazione su larga scala, i fotobioreattori. Uno dei fattori principali che influenza la crescita delle alghe è la luce, la quale fornisce tutta l'energia necessaria per supportare l'intero metabolismo. Nonostante la radiazione luminosa proveniente dal sole fornisca quantità di energia molto elevate, questa energia è distribuita su superfici molto ampie. Una bassa efficienza di utilizzo della luce, quindi, comporta la conseguente necessità di ampliare l'area occupata dal fotobioreattore incrementando i costi di costruzione e gestione rendendo il sistema non economicamente sostenibile. L'ottimizzazione dell'efficienza di utilizzo della radiazione luminosa è quindi indispensabile per rendere competitive le coltivazioni di alghe in fotobioreattori.

In natura le alghe sono esposte a condizioni di illuminazione variabili. Nelle condizioni in cui la quantità di radiazione a disposizione delle alghe è bassa, questa deve essere assorbita nel modo più efficiente possibile per garantire una buona velocità di crescita. In altre occasioni, invece, l'illuminazione può saturare la fotosintesi e quindi superare la capacità delle alghe di utilizzarla per la fissazione dell'anidride carbonica. In questo caso la radiazione luminosa in eccesso non utilizzata per le reazioni fotochimiche può portare alla formazione di forme reattive dell'ossigeno (ROS) e al conseguente stress ossidativo, dannoso per la cellula (Li et al., 2009). In queste occasioni in particolare uno dei componenti dell'apparato fotosintetico, il fotosistema II (PSII), è il preferenziale bersaglio dei danni ossidativi e deve essere continuamente riparato tramite la re-sintesi degli specifici componenti danneggiati (Nixon et al., 2010). Per prosperare in un ambiente dove l'illuminazione è una grandezza variabile, gli organismi fotosintetici hanno anche evoluto meccanismi per modulare l'efficienza di utilizzo della luce dissipando l'energia eventualmente in eccesso come calore per ridurre la formazione di ROS (Li et al., 2009). In questo contesto è importante sot-

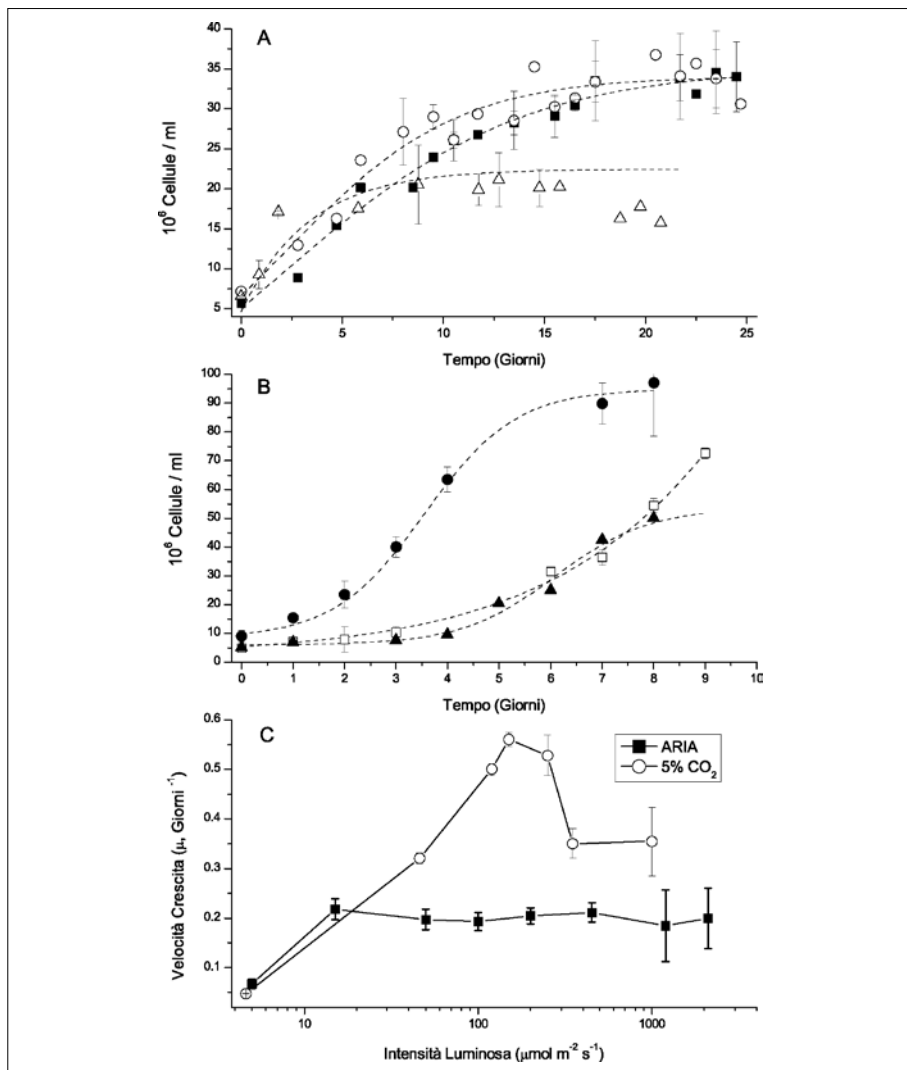


Fig. 1 Effetto dell'intensità luminosa sulla crescita di *Nannochloropsis*

A) Curve di crescita in presenza di  $\text{CO}_2$  atmosferica condotte a diverse intensità di illuminazione fornite in luce continua: le curve a 15, 100, 1200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sono rispettivamente riportate come quadrato, cerchio e triangolo. B) curve di crescita in presenza di  $\text{CO}_2$  al 5% condotte a diverse intensità di illuminazione: le curve a 15, 150, 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sono rispettivamente riportate come quadrato, cerchio e triangolo. In figura A e B è riportato il numero di cellule per millilitro di coltura in riferimento al giorno della curva di crescita. C) tasso di crescita ( $\mu$ ) calcolato durante la fase esponenziale nelle diverse curve di crescita condotte alle diverse intensità luminose in presenza di  $\text{CO}_2$  atmosferica o al 5%. Dati da (Sforza et al., 2012; Simionato et al., 2011).

tolineare che sia la riparazione dei fotosistemi danneggiati sia la dissipazione dell'energia come calore riducono l'efficienza di utilizzo della luce da parte delle cellule e quindi tali processi dovrebbero essere ridotti al minimo per poter raggiungere la più alta produttività.

La capacità di *Nannochloropsis* di rispondere a differenti condizioni di illuminazione è stata saggiata valutando l'effetto di diverse intensità luminose sulla crescita (bassa luce,  $15 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , luce di controllo,  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , alta luce,  $1200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , figura 1A, dati da (Simionato et al., 2011)). Questi dati suggeriscono che cellule di *Nannochloropsis* esposte a intensità luminose molto diverse sono in grado di mantenere delle cinetiche di crescita molto simili. Questo è possibile grazie alla capacità di *Nannochloropsis* di modulare il proprio apparato fotosintetico e ottimizzarlo in base alla quantità di luce fornita alle colture, una risposta generalmente nota come acclimatazione (Falkowski and LaRoche, 1991; Falkowski and Owens, 1980; Walters, 2005; Zou and Richmond, 2000).

Evidenze che supportano l'effettiva attivazione di una risposta di acclimatazione in queste cellule sono mostrate in figura 2 (dati da (Simionato et al., 2011)). 1-qP (Baker, 2008; Maxwell and Johnson, 2000) è un parametro che permette di valutare la capacità del fotosistema II di iniziare il trasporto degli elettroni. Quando i centri di reazione del fotosistema II sono aperti e disponibili a ricevere un fotone di luce, il valore di questo parametro è 0. Come riportato in figura 2A, in cellule esposte a intensità luminose crescenti si assiste a una progressiva crescita di 1-qP il cui valore raggiunge 1 quando i fotosistemi sono saturati e completamente chiusi, quindi non disponibili a ricevere ulteriori fotoni. Quando l'andamento di questa curva viene confrontato per cellule cresciute in regimi luminosi diversi si notano delle differenze evidenti: colture esposte ad alta luce, infatti, raggiungono la saturazione della fotosintesi a intensità di luce più elevate, suggerendo che l'apparato fotosintetico dell'alga sia modulato in modo da sfruttare una frazione di luce incidente più alta per le reazioni fotochimiche.

Nelle piante questa maggiore capacità di utilizzo dell'energia luminosa è associata a un'incrementata efficienza di fissazione dell'anidride carbonica, grazie all'aumento della concentrazione degli enzimi del ciclo di Calvin e in particolare della RuBisCO (Ballottari et al., 2007). Nella figura 2B è riportato una quantificazione di questo enzima in alghe acclimate a diverse illuminazioni la quale mostra come il contenuto di RuBisCO aumenti con l'intensità luminosa applicata alle colture durante la crescita. Questo suggerisce che le cellule in alta luce aumentino la capacità di fissare la  $\text{CO}_2$  in modo tale da sfruttare una maggiore quantità di prodotti della fase luminosa della fotosintesi.

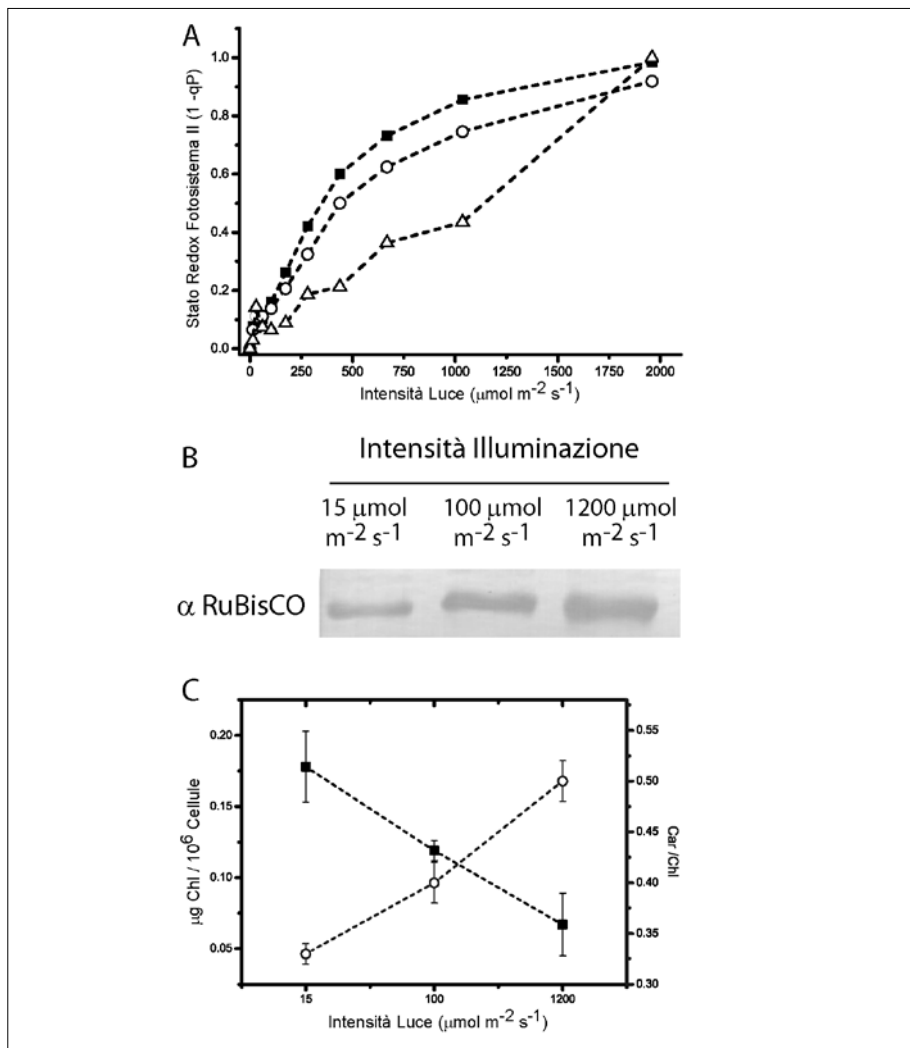


Fig. 2 Acclimatazione di *Nannochloropsis* alle differenti condizioni di intensità luminosa in presenza di diossido di carbonio in concentrazione atmosferica

A) grado di saturazione della fotosintesi in cellule adattate alle diverse intensità luminose. Il parametro 1-qP è riportato per le colture cresciute a 15 (quadrato), 100 (cerchio) e 1200 (triangolo)  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . B) Western Blot per la valutazione della presenza dell'enzima RuBisCO alla fine della fase esponenziale in cellule adattate alle diverse luci. Ciascun campione è stato caricato a parità di clorofilla (1  $\mu\text{g}$ ) e il segnale è stato rilevato usando un anticorpo specifico per la subunità L dell'enzima. C) Contenuto in pigmenti in cellule adattate alle diverse intensità luminose (fine della fase esponenziale). Sono riportate le stime relative al contenuto in clorofilla a ( $\mu\text{g Chl}/10^6$  cellule) e il rapporto carotenoidi/clorofilla. Dati da (Simionato et al., 2011)

Un'altra risposta comune delle alghe a diverse condizioni di illuminazione è la modulazione dell'assetto pigmentario, associata a una riorganizzazione dell'intero apparato fotosintetico. Il contenuto in clorofilla delle cellule cresciute a concentrazione atmosferica di  $\text{CO}_2$  è fortemente influenzato dalla quantità di fotoni che raggiungono le colture (fig. 2C). Infatti le cellule cresciute a bassa luce mostrano un accumulo maggiore di clorofilla per incrementare la loro efficienza di raccolta della radiazione, mentre nelle cellule ad alta luce si osserva la tendenza opposta. Mentre il ruolo principale della clorofilla è l'assorbimento della radiazione, un altro gruppo di pigmenti, i carotenoidi, sono fondamentali nel foto-proteggere l'apparato fotosintetico dallo stress ossidativo (Li et al., 2009) causato dall'alta luce. In accordo con questa funzione, in *Nannochloropsis* il contenuto in carotenoidi è fortemente incrementato nelle colture cresciute ad alta luce. Tutte le variazioni osservate indicano chiaramente che *Nannochloropsis* è in grado di acclimatarsi ai diversi regimi di intensità luminosa modulando il contenuto in pigmenti, in particolare accumulando clorofilla quando la radiazione incidente è limitante e invece i carotenoidi quando la luce assorbita è in eccesso, in modo tale da prevenire il più possibile i danni causati dalla formazione delle forme reattive dell'ossigeno.

I fotobioreattori per la coltivazione su larga scala delle alghe saranno verosimilmente collocati all'aperto, quindi in un ambiente naturale caratterizzato da intensità e disponibilità di luce estremamente variabili. L'organismo scelto per questo tipo di applicazioni dovrà quindi essere in grado di crescere e accumulare lipidi in differenti condizioni di illuminazione, non solo in quelle controllate tipiche di un laboratorio. La capacità di attivare una efficiente risposta di acclimatazione rappresenta, quindi, un importante parametro per l'identificazione di specie di alghe da utilizzare per le coltivazioni su larga scala. I risultati riportati nelle figure 1 e 2 mostrano come *Nannochloropsis* sia in grado di acclimatarsi a intensità luminose molto diverse e anche per questa ragione le specie di questo genere sono candidate interessanti per la produzione di biodiesel su larga scala in fotobioreattori.

#### PRODUTTIVITÀ FOTOSINTETICA DI NANNOCHLOROPSIS NELLE CONDIZIONI TIPICHE DI UN FOTOBIOREATTORE

Le valutazioni riportate fino a ora sono riferite a colture cresciute con una concentrazione di  $\text{CO}_2$  atmosferica, quindi in condizioni simili a quelle che

normalmente si trovano nell'ambiente naturale al quale le alghe si sono adattate durante l'evoluzione. Le condizioni di crescita nei fotobioreattori presentano però alcune specificità che devono essere considerate per riuscire a ottimizzare la crescita in questo ambiente artificiale.

Una delle maggiori differenze nelle coltivazioni su larga scala all'interno di fotobioreattori rispetto all'ambiente naturale è rappresentata dalla presenza di un supplemento di  $\text{CO}_2$ . Diversi studi hanno infatti mostrato che le alghe esposte a concentrazioni di anidride carbonica elevata sono in grado di sfruttare questa maggiore disponibilità per stimolare la produzione di biomassa. È quindi ormai assodato che coltivazioni su larga scala di alghe utilizzeranno una fornitura di  $\text{CO}_2$  supplementare (Bhola et al., 2011). Per questa ragione risulta molto importante verificare l'effetto delle diverse intensità luminose sulla crescita di *Nannochloropsis* in presenza di  $\text{CO}_2$  in eccesso (5%) (fig. 1B, dati da (Sforza et al., 2012)). Rispetto alle curve di crescita a concentrazione atmosferica di diossido di carbonio (fig. 1A) appare evidente come la  $\text{CO}_2$  stimoli positivamente la crescita delle alghe, aumentando sia il tasso di crescita calcolato durante i primi giorni della fase esponenziale sia la quantità di biomassa finale. È importante evidenziare come la  $\text{CO}_2$  in eccesso induca non soltanto un aumento nella produzione di biomassa nelle varie condizioni sperimentate ma alteri anche l'effetto delle diverse intensità luminose sulla crescita. Infatti, nelle cellule cresciute con  $\text{CO}_2$  la diversa intensità luminosa mostra un'influenza rilevante sul tasso di crescita, come riportato in figura 1B e a differenza di quanto visto in precedenza.

Analizzando in dettaglio l'effetto delle condizioni di illuminazione sui tassi di crescita ( $\mu$ ) in presenza o assenza di un supplemento di diossido di carbonio (fig. 1C), appare evidente che se le cellule sono cresciute a concentrazione atmosferica di  $\text{CO}_2$  la radiazione incidente risulta limitante solo nelle condizioni di luce più bassa. Con intensità maggiori di  $15 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , una quantità di luce comunque molto bassa, la crescita è invece limitata dalla disponibilità della  $\text{CO}_2$  piuttosto che dall'intensità luminosa. Se invece la  $\text{CO}_2$  è fornita in eccesso, l'effetto dell'intensità luminosa diventa preponderante e le alghe mostrano una crescita limitata dalla intensità di luce fino a  $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Al di sopra di questo valore la luce fornita risulta in eccesso e ha un effetto inibitorio sulla crescita di *Nannochloropsis*. Questo confronto, quindi, dimostra che l'effetto delle condizioni di illuminazione sulla produttività diventa molto più importante in condizioni di eccesso di  $\text{CO}_2$  che nelle condizioni naturali nelle quali le cellule sono in grado di mantenere il loro massimo tasso di crescita sotto un ampio intervallo di intensità di illuminazione.

Un'altra importante differenza tra le alghe cresciute in condizioni naturali

e in fotobioreattori è la concentrazione delle cellule nella coltura che nel secondo caso è molto più elevata. Questa concentrazione causa un'elevata densità ottica del mezzo che porta a una distribuzione molto disomogenea della luce nella coltura. Di conseguenza poche cellule sono esposte alla luce diretta e assorbono la grande maggioranza dell'energia a disposizione lasciando solo una piccola frazione residua agli strati inferiori di cellule. Gli strati di cellule più esterni sono inoltre facilmente esposti a una intensità di luce in eccesso rispetto alla loro capacità di utilizzarla per la fotosintesi e di conseguenza devono dissipare fino all'80% dell'energia assorbita sotto forma di calore per evitare danni da stress ossidativo. Queste cellule, quindi, non solo assorbono la maggior parte dell'energia a disposizione della coltura ma la utilizzano anche con bassa efficienza. Seguendo tale idea, è stato dimostrato che l'intera efficienza dei fotobioreattori aumenta quando il cammino ottico del reattore stesso è diminuito, riducendo la disomogeneità della distribuzione della luce (Xue et al., 2011). Sfortunatamente, cammini ottici molto brevi sono molto difficili da realizzare per gli impianti su larga scala per ragioni sia pratiche che economiche. Un altro fattore da considerare è che all'interno di un fotobioreattore le cellule sono continuamente sottoposte a un mescolamento. Questo determina per le alghe passaggi repentini da zone a piena luce a zone di piena ombra (Gordon and Polle, 2007). Le cinetiche di mescolamento variano molto a seconda del sistema di coltivazione utilizzato e nel caso di reattori tubulari chiusi queste sono nell'ordine dei millisecondi (Gordon and Polle, 2007) mentre per i *pond* sono di diversi ordini di grandezza più lente (Phillips and Myers, 1954).

Per riuscire a ottimizzare la produttività delle alghe in fotobioreattori è quindi importante capire come i cicli di luce/buio influenzano l'efficienza di utilizzo della luce da parte di questi organismi. Per questo motivo, *Nannochloropsis* è stata cresciuta in fotobioreattori a pannello esposti a cicli di luce/buio a frequenza modulata, in modo tale da simulare il mescolamento all'interno di un fotobioreattore (dati da (Sforza et al., 2012)). Questi esperimenti sono stati condotti in presenza di CO<sub>2</sub> e nutrienti in eccesso in modo tale da evitare inibizioni della crescita dovute ad altre carenze ed evidenziare l'effetto dell'alternanza di luce sulla crescita. Tutte le prove sono state effettuate fornendo alle colture la stessa quantità totale di fotoni, pari a 120  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  di luce continua, una quantità ancora limitante per la crescita in queste condizioni sperimentali. Una volta fissata l'intensità media di luce fornita, è stato preso in considerazione l'effetto di altri parametri quali la frequenza e l'intensità degli impulsi di luce. Come riportato in figura 3 (dati da (Sforza et al., 2012)) la scelta della frequenza applicata durante la crescita ha un effetto

importante sulle prestazioni di crescita di *Nannochloropsis*. In alcuni casi, il tasso di crescita è equivalente a quello di colture esposte a luce continua ( $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , fig. 3), dimostrando che le cellule sono in grado di sfruttare la luce pulsata con la stessa efficienza (Maxwell and Johnson, 2000). In altre condizioni, invece, quando la luce è fornita con bassa frequenza la crescita risulta inibita anche se la quantità di luce totale e l'intensità dell'impulso sono gli stessi. Risultati analoghi sono stati ottenuti sia con impulsi di 1200 che di  $350 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  suggerendo che l'intensità dell'impulso non abbia una rilevanza fondamentale sulla capacità delle alghe di utilizzare la luce in modo efficiente (fig. 3). I dati mostrano, inoltre, che le condizioni con i tassi di crescita più elevati ( $1200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  - 10 Hz and  $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  - 30 Hz) hanno in comune la stessa lunghezza della fase di illuminazione di circa 10 ms (dati da (Sforza et al., 2012)). La lunghezza dell'impulso di luce sembra quindi essere il parametro con l'influenza maggiore sulla crescita delle alghe. È interessante notare che la durata ottimale di 10 ms è in accordo con il tempo di turnover del PSII misurato in cellule algali intere (Dubinsky et al., 1986; Malcata, 2011): dopo l'assorbimento di un fotone da parte del fotosistema II sono infatti necessari 1-15 ms per ri-ossidare i trasportatori di elettroni e renderli disponibili ad accettare un altro fotone (Carvalho et al., 2011). Se il tempo di illuminazione è così breve, la maggior parte dei fotoni sono utilizzati per compiere la fotosintesi e non portano alla perdita di energia a causa della foto-inibizione o l'attivazione di meccanismi di dissipazione termica. Questi risultati dimostrano quindi come anche l'alta luce possa essere sfruttata con alta efficienza, senza creare danni all'apparato fotosintetico purché questa sia fornita per tempi molto brevi alle cellule. Al contrario, esposizioni più lunghe portano alla formazione di ROS e all'attivazione di meccanismi di dissipazione termica, portando a una perdita di efficienza del sistema. L'alternanza di cicli luce/buio può quindi, se opportunamente ottimizzata, essere di beneficio per l'efficienza fotosintetica (Gordon and Polle, 2007; Grobelaar, 2010; Kim et al., 2006; Kok, 1956; Matthijs et al., 1996; Nedbal et al., 1996; Phillips and Myers, 1954; Terry, 1986; Vejrazka et al., 2011; Xue et al., 2011), permettendo alle cellule di *Nannochloropsis* di sfruttare la luce pulsata con la stessa efficienza della luce continua della stessa intensità (Maxwell and Johnson, 2000).

#### EFFETTO DELLA LUCE SULL'ACCUMULO DI LIPIDI

Come discusso in precedenza, un organismo scelto per una produzione di

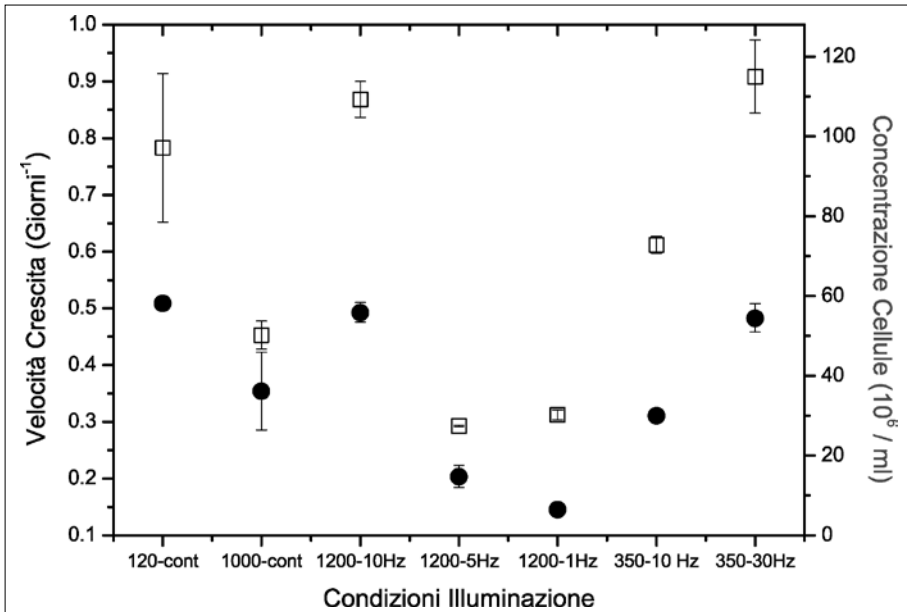


Fig. 3 Effetto dei cicli luce/buio sulla crescita di *Nannochloropsis*

In questa figura sono riportati i tassi di crescita specifici (quadrato) calcolati durante la fase esponenziale e la concentrazione cellulare (cerchio) alla fine della curva di crescita per le diverse curve condotte in diverse condizioni di luce pulsata. Dati da (Sforza. et al., 2012)

biocombustibili deve essere in grado di mantenere buoni tassi di crescita in diverse condizioni di illuminazione, ma deve anche essere in grado di produrre in modo costante la materia prima fondamentale per la produzione di biodiesel, i lipidi. In questo caso, nell'analizzare l'influenza della luce bisogna considerare non solo il suo ruolo nel metabolismo, ma anche il ruolo di segnale che influenza diversi processi all'interno della cellula (Brautigam et al., 2009; Eberhard et al., 2008; Kim et al., 2008).

Dati di letteratura suggeriscono che l'accumulo di lipidi in alghe unicellulari sia stimolato in condizioni di alta luce (Damiani et al., 2010), come evidenziato anche in specie del genere *Nannochloropsis* (Fisher et al., 1998; Solovchenko et al., 2010). Per analizzare questo problema in modo sistematico, il contenuto lipidico nelle alghe cresciute nelle varie condizioni di illuminazione e diossido di carbonio è stato valutato con metodi gravimetrici (fig. 4, dati da (Sforza et al., 2012; Simionato et al., 2011)). Quando le cellule sono cresciute a luce continua e a concentrazione atmosferica di  $\text{CO}_2$  (fig. 4A) l'accumulo di lipidi inizia durante la fase stazionaria a tutte le intensità luminose testate e alla fine della curva di crescita (25 giorni) la quantità finale di lipidi è molto simile in

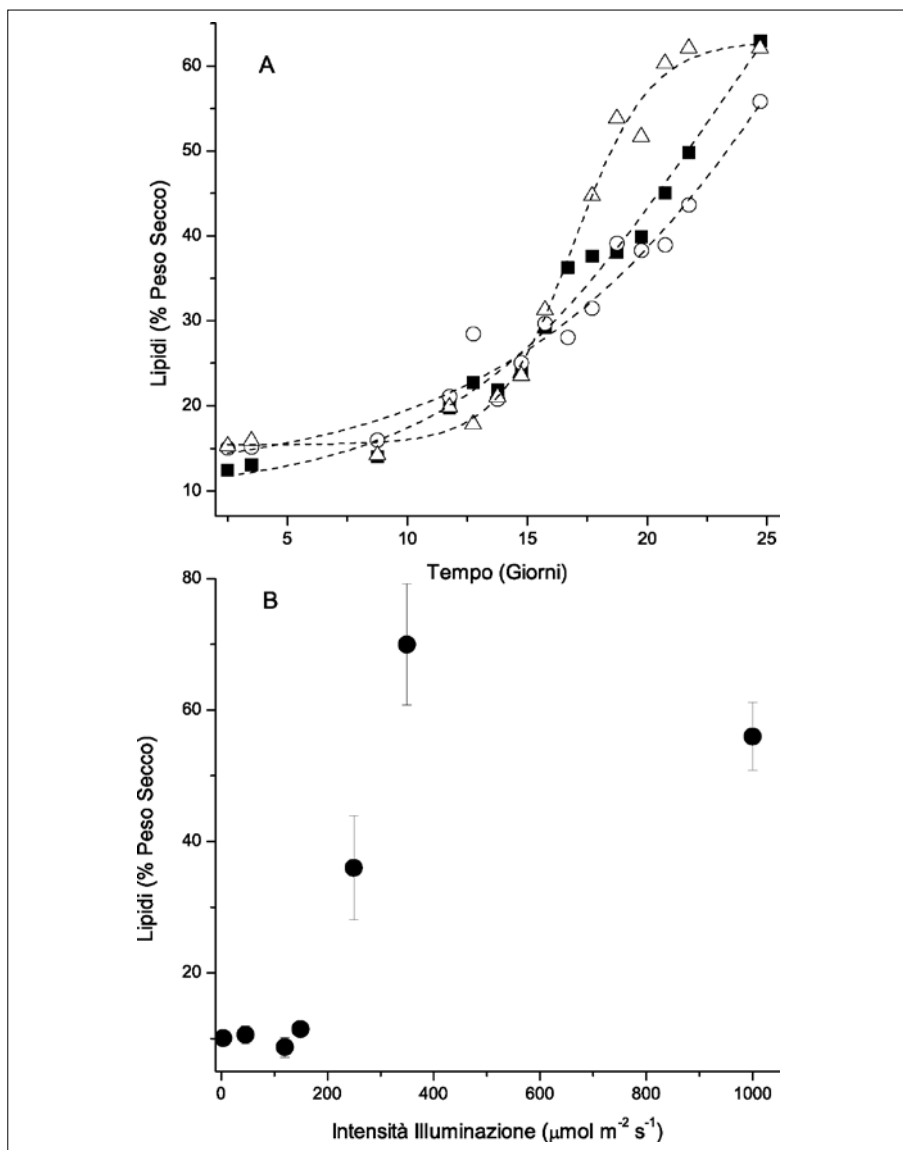


Fig. 4 *Produzione di lipidi in colture di Nannochloropsis adattate alle diverse condizioni di illuminazione*

A) percentuale di lipidi calcolata sul peso secco di colture cresciute a 15 (quadrato), 100 (cerchio) e 1200 (triangolo)  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in condizione di  $\text{CO}_2$  atmosferica. L'accumulo di lipidi è indotto durante la fase stazionaria indipendentemente dalle condizioni di illuminazione (dati da (Simionato et al., 2011)). B) quantità finale di lipidi in colture cresciute in eccesso di azoto alle diverse intensità luminose riportate in condizione di diossido di carbonio al 5% (dati da (Sforza et al., 2012))

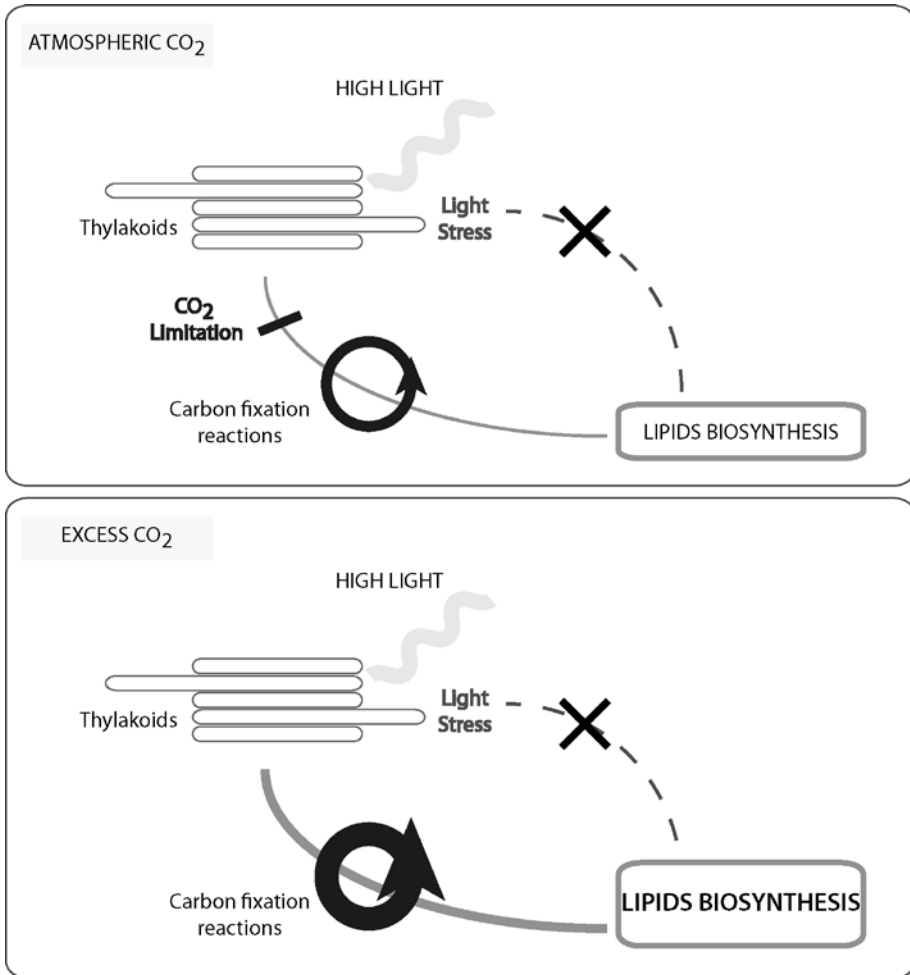


Fig. 5 Rappresentazione dell'effetto dell'alta luce sull'accumulo di lipidi in *Nannochloropsis*. In alto sono rappresentate condizioni di concentrazione atmosferica di diossido di carbonio, in basso il caso in cui questa sia fornita in eccesso

tutte le condizioni. L'accumulo pronunciato di lipidi durante la fase stazionaria è indotto dalla carenza di nutrienti tipica di questa fase (dati da (Simionato et al., 2011)). Questo risultato è in accordo con molti dati precedenti che mostrano che la carenza di nutrienti, e in particolare di azoto, stimola l'accumulo di lipidi in molte specie di microalghe (Gouveia and Oliveira, 2009; Rodolfi et al., 2009). In questi esperimenti, quindi, l'effetto della disponibilità di nutrienti sulla sintesi di lipidi è evidente, mentre l'intensità luminosa a cui le cellule

sono esposte non ha invece una particolare influenza sulla produzione finale. I risultati ottenuti sono, al contrario, profondamente diversi nel caso di colture cresciute in eccesso di diossido di carbonio (fig. 4B). In questa condizione, infatti, le cellule cresciute in bassa luce presentano un livello massimo di lipidi del 10% su peso secco corrispondente alla quantità costitutivamente presente nelle cellule. Nelle condizioni di alta luce, invece, la percentuale di lipidi raggiunge valori oltre il 60% del peso secco nonostante l'azoto sia sempre fornito in eccesso alle colture. L'effetto dell'intensità di luce sulla produzione di lipidi è quindi fortemente influenzato dalla disponibilità di diossido di carbonio. Una possibile spiegazione per queste osservazioni è che in condizioni di alta luce e  $\text{CO}_2$  atmosferica l'efficienza del ciclo di Calvin è probabilmente limitante per le alghe, come suggerito dal fatto che la crescita è limitata proprio dalla disponibilità di anidride carbonica (fig. 1A) e dal fatto che l'enzima RuBisCO si accumula con l'aumentare dell'intensità luminosa alla quale le alghe sono cresciute (fig. 2B). Di conseguenza, in queste condizioni si accumulano molecole a monte del ciclo di Calvin-Benson e c'è una conseguente diminuzione di efficienza delle reazioni fotochimiche (fig. 5). La saturazione dei fotosistemi e la generazione di stress ossidativo in alta luce non ha però effetti rilevanti di stimolo né inibizione della biosintesi di lipidi. Quando l'illuminazione intensa è combinata a un eccesso di diossido di carbonio, invece, i prodotti del ciclo di Calvin-Benson si accumulano stimolando la biosintesi dei trigliceridi (fig. 5). Per questo motivo, la disponibilità di diossido di carbonio deve essere considerata un fattore molto importante sia nella crescita delle alghe ma anche nella produzione di lipidi da parte delle stesse. Tutte le evidenze discusse finora permettono di suggerire quindi che l'intensità luminosa non abbia un'influenza diretta sull'accumulo dei lipidi in *Nannochloropsis* e che la rete di *signaling* che normalmente risponde alle diverse condizioni di illuminazione non ne influenza direttamente la biosintesi. L'effetto dell'illuminazione sull'accumulo di lipidi è piuttosto indiretto e i segnali che inducono la produzione massiccia dovrebbero essere ricercati tra quelli coinvolti nella regolazione del metabolismo del carbonio.

## RIASSUNTO

Alcune specie di alghe unicellulari sono capaci di accumulare grandi quantità di lipidi che possono essere utilizzati per la produzione di biodiesel. Questa è una interessante prospettiva per lo sviluppo di combustibili alternativi alle fonti fossili. Tuttavia, i sistemi di coltivazione delle alghe su larga scala attualmente disponibili sono ancora poco efficienti e sono necessari ulteriori sforzi di ricerca per rendere la produzione di biocombustibili da alghe una solida realtà.

La luce fornisce tutta l'energia necessaria per supportare il metabolismo delle alghe e per questa ragione l'efficienza di utilizzo della radiazione luminosa è uno dei fattori fondamentali che determina la produttività delle coltivazioni di alghe. In questo capitolo sono riviste le informazioni più recenti sull'influenza dell'illuminazione sulla crescita e la produzione di lipidi nelle microalghe. L'attenzione è focalizzata sulle specie appartenenti al genere *Nannochloropsis* che stanno emergendo come modelli per questo tipo di applicazioni grazie alla loro elevata produttività. *Nannochloropsis* è capace di crescere in condizioni di illuminazione molto diverse, caratteristica importante per le crescita in campo. Oltre all'effetto sulla crescita è stato analizzata anche l'influenza dell'illuminazione sull'accumulo di lipidi: l'intensità della radiazione non regola direttamente la loro biosintesi ma ha ugualmente una forte influenza se combinata con altri fattori quali una elevata disponibilità di anidride carbonica.

#### ABSTRACT

Some species of unicellular algae are capable of accumulating large amount of lipids which can be exploited for the production of biodiesel. Their exploitation is highly interesting in the perspective of replacing at least partially fossil fuels. Unfortunately, algae large scale cultivation systems are still largely inefficient and strong research efforts are necessary to develop competitive production of biofuels from algae.

One of the major factors influencing algae growth is light which provides all the energy supporting metabolism. For this reason a high light use efficiency is seminal for developing any competitive algae cultivation system. In this chapter the most recent work on the influence of illumination environment on algae growth and lipids production is reviewed, focusing in particular on the species belonging to the genus *Nannochloropsis*, which are emerging as models for this kind of applications thanks to their remarkable productivity. *Nannochloropsis* showed the ability of growing efficiently under a wide range of illumination conditions, a fundamental property in the perspective of cultivation in outdoor photobioreactors. Light intensity do not directly influence lipids biosynthesis but it plays a strong indirect role when combined with other factors like increased carbon dioxide supply.

#### BIBLIOGRAFIA

- AMARO H.M., GUEDES A.C., MALCATA F.X. (2011): *Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel*, «Applied Energy», 88, pp. 3402-3410.
- BALLOTTARI M., DALL'OSTO L., MOROSINOTTO T., BASSI R. (2007): *Contrasting behavior of higher plant photosystem I and II antenna systems during acclimation*, «Journal of Biological Chemistry», 282, pp. 8947-8958.
- BAKER N.R. (2008): *Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo*, «Annual Review of Plant Biology», 58, pp. 89-113.
- BHOLA V., DESIKAN R., SANTOSH S.K., KARTHIKEYAN S., SANNIYASI E., BUX F. (2011): *Effects of parameters affecting biomass yield and thermal behaviour of Chlorella vulgaris*, «Journal of Bioscience and Bioengineering», 111, pp. 377-382.
- BOUSSIBA S., VONSHAK A., COHEN Z., AVISSAR Y., RICHMOND A. (1987): *Lipid and*

- biomass production by the halotolerant microalga Nannochloropsis salina*, «Biomass», 12, pp. 37-47.
- BRAUTIGAM K., DIETZEL L., STROHER E., WORMUTH D., DIETZ K.J., RADKE., WIRTZ M.M., HELL R., DORMANN P., NUNES-NESE A., SCHAUER N., FERNIE A.R., OLIVER S.N., GEIGENBERGER P., LEISTER D., PFANNSCHMIDT T. (2009): *Dynamic plastid redox signals integrate gene expression and metabolism to induce distinct metabolic states in photosynthetic acclimation in Arabidopsis*, «Plant Cell», 21, pp. 2715-2732.
- CHISTI Y. (2007): *Biodiesel from microalgae*, «Biotechnology Advertising», 25, pp. 294-306.
- CHISTI Y., YAN J. Y. (2011): *Energy from algae: current status and future trends*, «Applied Energy», 88, pp. 3277-3279.
- DAMIANI M.C., POPOVICH C.A., CONSTELA D., LEONARDI P.I. (2010): *Lipids analysis in Haematococcus pluvialis to assess its potential use as a biodiesel feedstock*, «Bioresource Technology», 101, pp. 3801-3807.
- DISMUKES G.C., CARRIERI D., BENNETTE N., ANANYEV G.M., POSEWITZ M.C. (2008): *Acquatic phototrophs: efficient alternative to land-based crops for biofuels*, «Current Opinions in Biotechnology», 19, pp. 235-240.
- EBERHARD S., FINAZZI G., WOLLMAN F.A. (2008): *The dynamics of photosynthesis*, «Annual review of Genetics», 46, pp. 463-515.
- FALKOWSKY P.G., LA ROCHE J. (1991): *Acclimation to spectral irradiance in algae*, «Journal of Phycology», 27, pp. 8-14.
- FALKOWSKY P.G., OWENS T.G. (1980): *Light-shade adaptation: two strategies in marine phytoplankton*, «Plant Physiology», 66, pp. 592-595.
- FISHER T., BERNER T., ILUZ D., DUBINSKY Z. (1998): *The kinetics of the photoacclimation response of Nannochloropsis sp. (Eustigmatophyceae): a study of changes in ultrastructure and PSU density*, «Journal of Phycology», 34, pp. 818-824.
- GORDON J.M., POLLE J.E. (2007): *Ultrahigh bioproductivity from algae*, «Applied Microbiology and Biotechnology», 76, pp. 969-975.
- GOUVEIA L., OLIVEIRA A.C. (2009): *Microalgae as a raw material for biofuels production*, «Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology», 36, pp. 269-274.
- GROBBELAAR J.U. (2010): *Microalgal biomass production: challenges and realities*, «Photosynthesis Research», 106, pp. 135-144.
- HANNON M., GIMPEL J., TRAN M., RASALA B., MAYFIELD S. (2010): *Biofuels from algae: challenges and potential*, «Biofuels», 1, pp. 763-784.
- HODGSON P.A., HENDERSON R.J., SARGENT J.R., LEFTLEY J.W. (1991): *Patterns of variations in the lipid class and fatty acid composition of Nannochloropsis oculata (Eustigmatophyceae) during batch culture. 1. the growth cycle*, «Journal of Applied Phycology», 3, pp. 169-181.
- HU Q., SOMMERFELD M., JARVIS E., GHIRARDI M., POSEWITZ M., SEIBERT M., DARZINS A. (2008): *Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuels production: perspectives and advances*, «Plant Journal», 54, pp. 621-639.
- JEONG G.T., PARK D.H., KANG C.H., LEE W.T., SUNWOO C.S., YOON C.H., CHOI B.C., KIM H.S., KIM S.W., LEE U.T. (2004): *Production of biodiesel fuel by transesterification of rapeseed oil*, «Applied Biochemistry and Biotechnology», 113-116, pp. 747-758.
- KILIAN O., BENEMANN C.S., NIYOGI K.K., VICK B. (2011): *High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga Nannochloropsis sp.*, «Proceedings of the National Academy of Sciences, USA», 108, pp. 21265-21269.
- KIM C., MESKAUSKIENE R., APEL K., LALOI C. (2008): *No single way to understand singlet oxygen signalling in plants*, «EMBO Reports», 9, pp. 435-439.

- KIM Z.H., KIM S.H., LEE H.S., LEE C.G. (2006): *Enhanced production of astaxanthin by flashing light using Haematococcus pluvialis*, «Enzyme and Microbial Technology», 39, pp. 414-419.
- KULHEIM C., AGREN J., JANSSON S. (2002): *Rapid regulation of light harvesting and plant fitness in the field*, «Science», 297: 91-93.
- LI Z., WAKAO S., FISCHER B.B., NIYOGI K.K. (2009): *Sensing and responding to excess light*, «Annual Review of Plant Biology», 60, pp. 239-260.
- MALCATA F.X. (2011): *Microalgae and biofuels: a promising partnership?*, «Trends in Biotechnology», 29, pp. 542-549.
- MATTHIJS H.C., BALKE H., VAN HES U.M., KROON B.M., MUR L.R., BINOT R.A. (1996): *Application of light-emitting diodes in bioreactors: flashing light effects and energy economy in algal culture (Chlorella pyrenoidosa)*, «Biotechnology and Bioengineering», 50, pp. 98-107.
- MAXWELL K., JOHNSON G.N. (2000): *Chlorophyll fluorescence – a practical guide*, «Journal of Experimental Botany», 51, pp. 569-580.
- MOLINA G.E., ROBLES M.A., GIMENEZ G.A., SANCHEZ P.J., GARCIA-CAMACHO F., GARCIA SANCHEZ J.L. (1994): *Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass*, «Journal of the American Oil Chemists Society», 71, pp. 955-959.
- NIXON P.J., MICHOUX F., YU J., BOEHM M., KOMENDA J. (2010): *Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II*, «Annals of Botany», 106, pp. 1-16.
- 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. 518-521.
- PHILIPS J.N., MYERS J. (1954): *Growth rate of Chlorella in flashing light*, «Plant Physiology», 29, pp. 152-161.
- RADAKOWITS R., JINKERSON R.E., FUERSTENBERG S.I., TAE H., SETTLAGE R.E., BOORE J.L., POSEWITZ M.C. (2012): *Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga Nannochloropsis gaditana*, «Nature Communications», 3, pp. 686.
- RODOLFI L., CHINI Z.G., BASSI N., PADOVANI G., BIONDI N., BONINI G., TREDICI M.R. (2009): *Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low cost photobioreactor*, «Biotechnology and Bioengineering», 102, pp. 100-112.
- SFORZA E., BERTUCCO A., MOROSINOTTO T., GIACOMETTI G. M. (2010): *Vegetal oil from microalgae: species selection and optimization*, «Chemical Engineering Transactions», Conference Proceeding.
- SFORZA E., SIMIONATO D., BERTUCCO A., GIACOMETTI G.M., MOROSINOTTO T. (2012): *Adjusted light and dark cycles can optimize photosynthetic efficiency in algae growing in photobioreactors*, «PLOS ONE», in press.
- SIMIONATO D., SFORZA E., CORTEGGIANI C.E., BERTUCCO A., GIACOMETTI G.M., MOROSINOTTO T. (2011): *Acclimation of Nannochloropsis gaditana to different illumination regimes: effects on lipids accumulation*, «Bioresource Technology», 102, pp. 6026-6032.
- SINGH A., NIGAM P.S., MURPHY J.D. (2011): *Renewable fuels from algae: an answer to debatable land based fuels*, «Bioresource Technology», 102, pp. 10-16.
- SOLOVCHENKO A., KHOZIN-GOLDBERG I., RECHT L., BOUSSIBA S. (2011): *Stress-induced changes in optical properties, pigment and fatty acid content of Nannochloropsis sp.: implications for non-destructive assay of total fatty acids*, «Marine Biotechnology», 13, pp. 527-535.

- TAKESHITA T. (2011): *Competitiveness, role and impact of microalgal biodiesel in the global energy future*, «Applied Energy», 88, pp. 3481-3491.
- TERRY K.L. (1986): *Photosynthesis in modulated light: quantitative dependence of photosynthetic enhancement on flashing rate*, «Biotechnology and Bioengineering», 28, pp. 988-995.
- VEJRAZKA C., JANSSEN M., STREETFLAND M., WIJFFELS R.H. (2011): *Photosynthetic efficiency of Chlamydomonas reinhardtii in flashing light*, «Biotechnology and Bioengineering», 108, pp. 2905-2913.
- WALTERS R.G. (2005): *Towards an understanding of photosynthetic acclimation*, «Journal of Experimental Botany», 56, pp. 435-447.
- XUE S., SU Z., CONG W., (2011): *Growth of Spirulina platensis enhanced under intermittent illumination*, «Biotechnology», 151, pp. 271-277.
- ZOU N., RICHMOND A. (2000): *Light-path length and population density in photoacclimation of Nannochloropsis sp. (Eustigmatophyceae)*, «Journal of Applied Phycology», 12, pp. 349-354.