



Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani

PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA

SUS-MIRRI.IT

# Caso studio: coltivazione della microalga *Haematococcus pluvialis* per la produzione di astaxantina

16 Gennaio 2024

ENEA CR PORTICI

Docente: Dott.ssa Patrizia Casella

Responsabile dell'UO 11: Ing. Molino Antonio





Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA



## Progetto VALUEMAG

Valuable products from algae using new magnetic  
cultivation and extraction techniques

ID:745695



Avvio 1 Aprile 2017  
Fine 31 Luglio 2020

Coordinato da National Technical University of  
Athens (NTUA)

Finanziamento 100%  
€ 4.789.000



Bio Based Industries Joint  
Undertaking (Horizon 2020)

call BBI-2016-R09 "Exploiting algae and other  
aquatic biomass for production of molecules for  
pharma, nutraceuticals, food additives and cosmetic  
applications

### Consorzio



### Obiettivi

- ✓ Lo sviluppo di un nuovo sistema di coltivazione innovativo basato sull'uso di nanoparticelle magnetiche (mPBR) in grado di ridurre i costi di produzione
- ✓ La riduzione dei costi di produzione delle microalghe e l'implementazione dell'estrazione e della purificazione di prodotti di alto valore derivanti dal metabolismo delle microalghe.
- ✓ L'implementazione dell'estrazione fluida supercritica con anidride carbonica (CO<sub>2</sub>-SFE) come tecnica di estrazione innovativa e sicura di prodotti microalgali di alto valore



Finanziato dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero dell'Università e della Ricerca

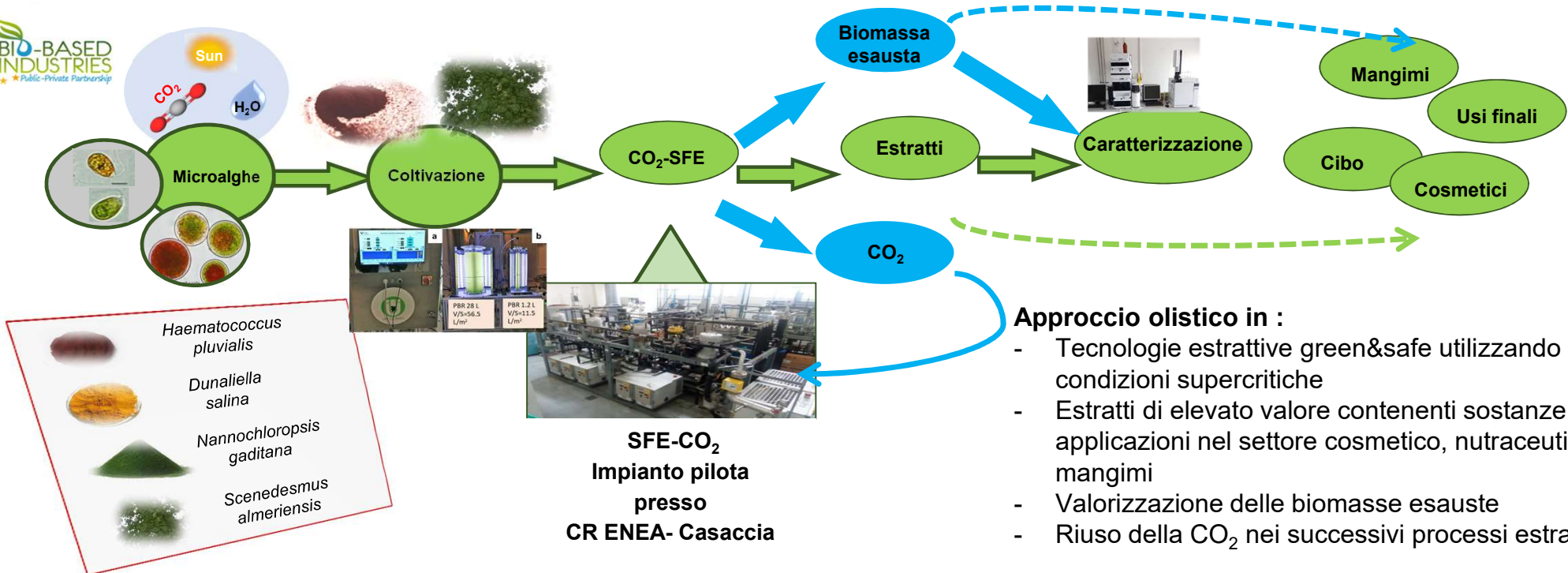


Italiadomani  
PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA



# Background di ricerca – progetto VALUEMAG

Progetto EU - H2020: VALUEMAG - Valuable products from algae using new magnetic cultivation and extraction techniques – Grant Agreement ID:745695



## Approccio olistico in :

- Tecnologie estrattive green&safe utilizzando la CO<sub>2</sub> in condizioni supercritiche
- Estratti di elevato valore contenenti sostanze per applicazioni nel settore cosmetico, nutraceutico e dei mangimi
- Valorizzazione delle biomasse esauste
- Riuso della CO<sub>2</sub> nei successivi processi estrattivi





Finanziato dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero dell'Università e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA

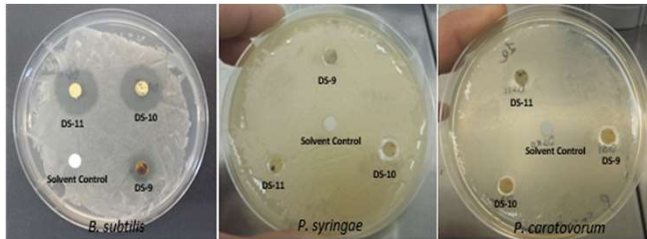


## Background di ricerca – progetto VALUEMAG

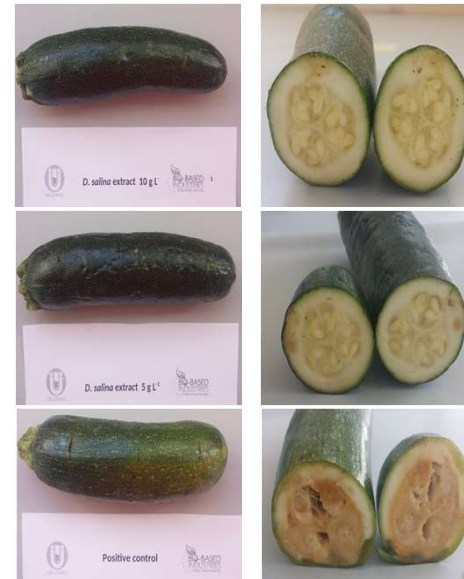


Progetto EU - H2020: VALUEMAG - Valuable products from algae using new magnetic cultivation and extraction techniques – Grant Agreement ID:745695

Test in vitro sull'attività antibatterica degli estratti ricchi di beta-carotene ottenuti dalla microalga *Dunaliella salina*



Test in vitro sull'attività antibatterica degli estratti di beta-carotene ottenuti dalla microalga *D. salina* contro il patogeno *Pectobacterium carotovorum*



Test in vitro sull'attività antibatterica degli estratti ricchi di beta-carotene ottenuti dalla microalga *Dunaliella salina* contro il patogeno *Pseudomonas syringae*





Finanziato dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero dell'Università e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA



# KET4STEM

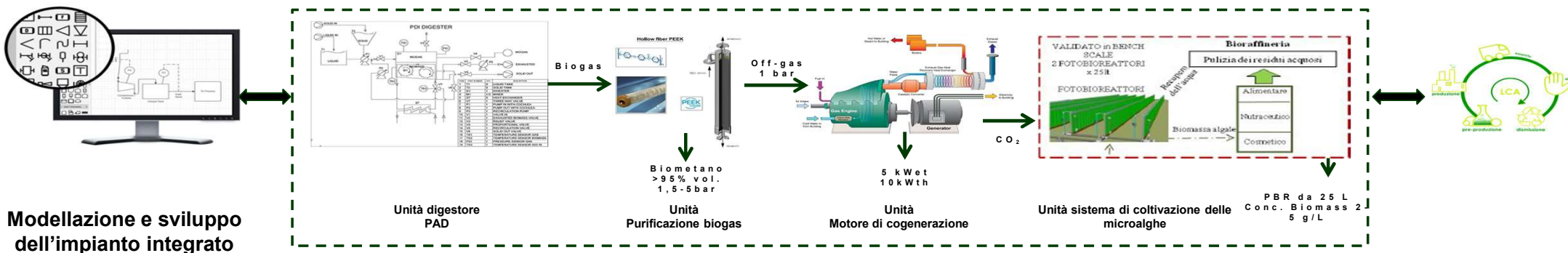
Key Enabling Technologies for organic waSTE and Microalgae valorization

## KET4STEM - Key Enabling Technologies for organic waSTE and Microalgae valorization

Attività di supporto alle SME sulla coltivazione delle microalghe per il sequestro della CO<sub>2</sub> proveniente da processi di digestione anaerobica

**Progetto PON Enterprises and Competitiveness – FESR 2014-2020 - Attività Finanziata al 100%**

Attività di consulenza scientifica relativa alla valutazione economica e ambientale di un impianto di produzione di biogas con la cattura di CO <sub>2</sub> in uscita attraverso un impianto di crescita microalgale e la valorizzazione delle microalghe per le applicazioni nel settore della nutraceutica, della cosmesi e dell'alimentazione animale	GREENFUEL	Durata 29/04/2021 – 26/11/2021
Attività di consulenza scientifica relativa allo sviluppo di tecnologie avanzate, basate sul sequestro dell'anidride carbonica rilasciata dagli impianti di digestione pressurizzata, al fine di ridurre i costi, altrimenti elevati, relativi alla coltivazione di specie microalgali selezionate da destinare al settore nutraceutico, cosmetico e mangimistico.	ECOENERGY	Durata 18/02/2020 – 09/12/2021
Attività di consulenza in relazione allo studio delle prestazioni della tecnologia PAD per la produzione di biometano pressurizzato e degli scenari di mercato dei bioprodotti	EDILGEN	Durata: 08/11/2019 – 02/11/2021



Modellazione e sviluppo dell'impianto integrato



Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA

SUS-MIRRI.IT

- *Haematococcus pluvialis*



Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA



## Haematococcus pluvialis

- *Haematococcus lacustris* (Girod-Chantrons) Rostafinski (Chlorophyceae, Volvocales) o *Haematococcus pluvialis* è una microalga di acqua dolce.
- Appartiene alla classe delle Cloroficee.
- Possiede un ciclo di vita molto particolare che la rende non facilmente coltivabile in condizioni standard per tale motivo possiamo definirla una specie «fastidiosa»
- Il ciclo cellulare è divisibile tra una fase mobile ed una non mobile
- Nel passaggio tra la fase mobile e quella non mobile la microalga può subire fasi di incistamento in particolare in condizioni sfavorevoli e di stress in cui si può riscontrare un alto tasso di mortalità delle cellule
- Propriamente durante queste fasi di stress ambientale, la microalga accumula un potente antiossidante, come l'astaxantina

Turchetti, Benedetta, Annamaria Bevivino, Patrizia Casella, Claudia Coleine, Giovanna E. Felis, Carolina Elena Girometta, Antonio Molino et al. "Selected Case Studies on Fastidious Eukaryotic Microorganisms: Issues and Investigation Strategies." *Diversity* 15, no. 7 (2023): 862.



Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA

SUS-MIRRI.IT

- Ciclo di vita della microalga *H. pluvialis*





Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA

SUS-MIRRI.IT

# Haematococcus pluvialis – ciclo di vita

## a) Cellula mobile

b) Divisione cellulare della cellula mobile

c-d-e) La cellula mobile perde i flagelli (sporangio) si divide fino a 8 zoospore

## f) Cellula non mobile

g) Sporangio (cellula non mobile) con 2 aplanospore

h-i-j) sporangio con fino a > 20 aplanospore

k) sporangio con 4 zoospore

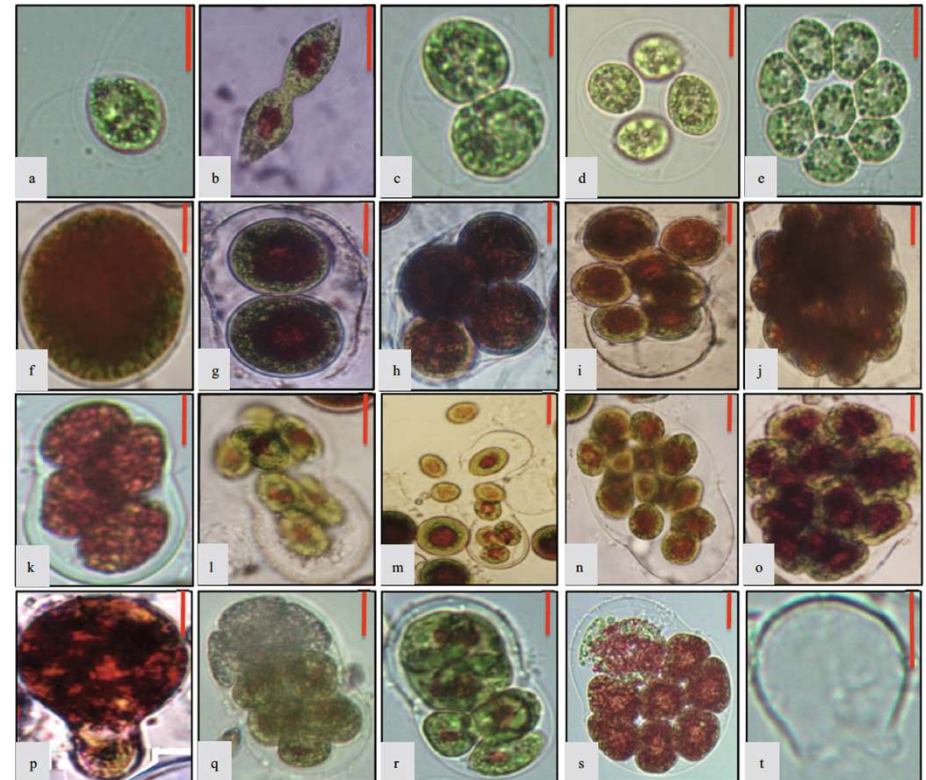
m) Rilascio delle zoospore che diventeranno future cellule mobili

n-o) sporangio con 16 e >20 zoospore

p) Divisione cellulare nella cellula non mobile

q-r) divisione non sincronizzata

s-t) autolisi delle zoospore e teca



Zhang, C., Liu, J., & Zhang, L. (2017). Cell cycles and proliferation patterns in *Haematococcus pluvialis*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 35(5), 1205-1211.

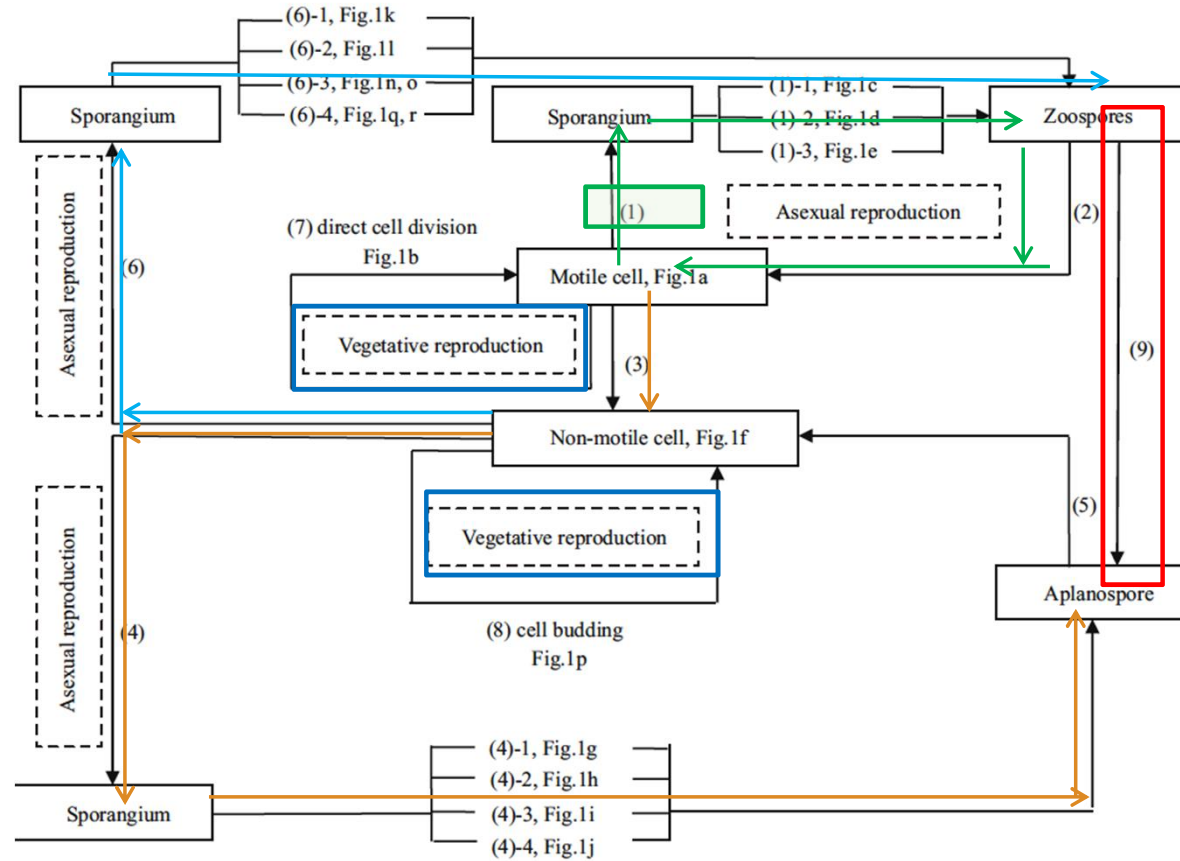


Meccanismo di divisione cellulare occasionale (divisione vegetativa)

Condizioni favorevoli

Condizioni sfavorevoli

Condizioni adatte



Condizione di stress



Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca

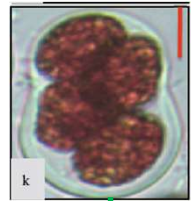


Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA

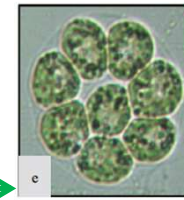
SUS-MIRRI.IT

## Haematococcus pluvialis – ciclo di vita

In condizioni di crescita favorevole,  
*H. pluvialis* produce zoospore



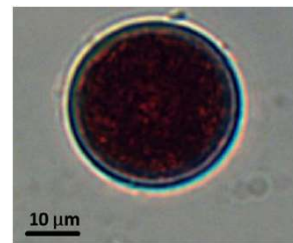
In condizioni non favorevoli  
produce aplospore



Condizioni di stress

Cellule mobili

Condizioni di  
favorevoli



Aplanospora che accumula astaxantina  
(condizioni di stress)

Zhang, C., Liu, J., & Zhang, L. (2017). Cell cycles and proliferation patterns in *Haematococcus pluvialis*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 35(5), 1205-1211.

Pereira, S., & Otero, A. (2020). *Haematococcus pluvialis* bioprocess optimization: Effect of light quality, temperature and irradiance on growth, pigment content and photosynthetic response. *Algal Research*, 51, 102027.



Finanziato dall'Unione europea  
NextGenerationEU



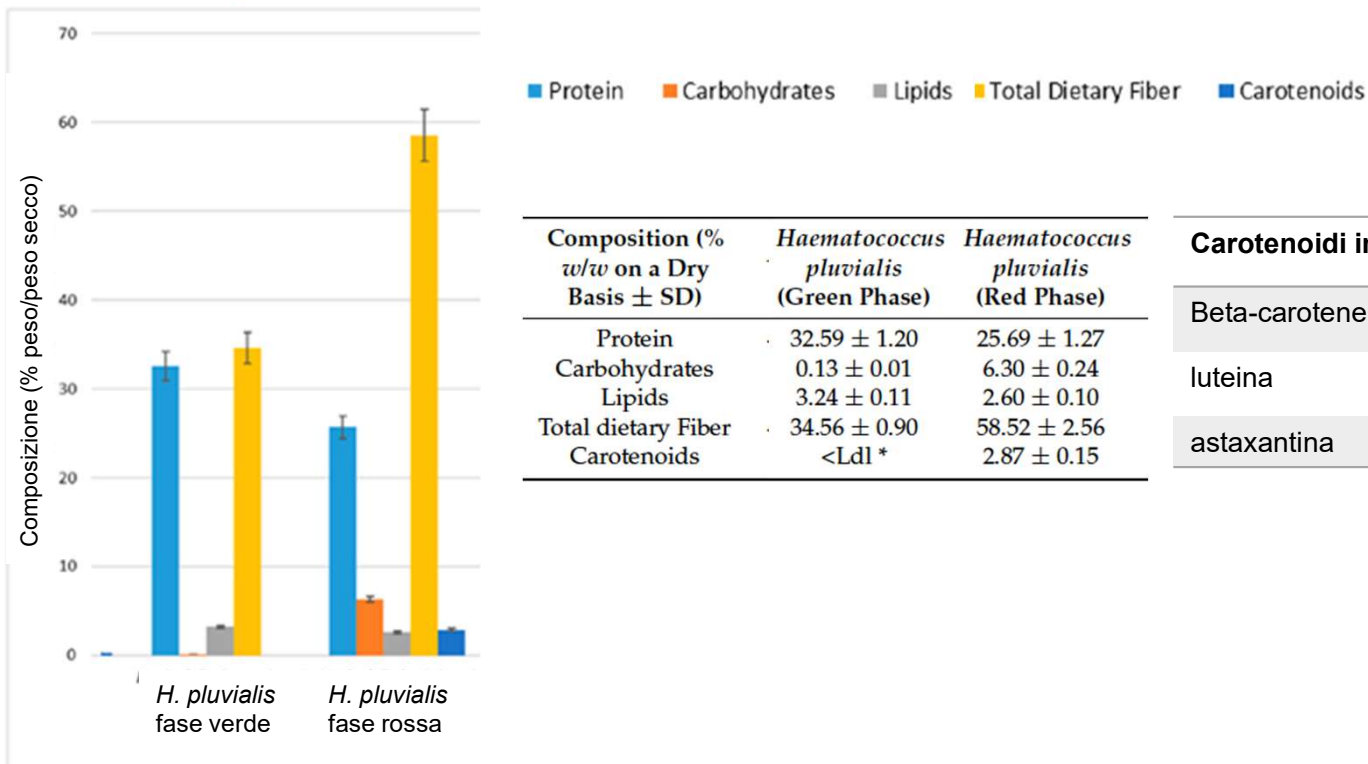
Ministero dell'Università e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA



## Composizione del contenuto cellulare di *Haematococcus pluvialis*



Composition (% w/w on a Dry Basis ± SD)	<i>Haematococcus pluvialis</i> (Green Phase)	<i>Haematococcus pluvialis</i> (Red Phase)
Protein	32.59 ± 1.20	25.69 ± 1.27
Carbohydrates	0.13 ± 0.01	6.30 ± 0.24
Lipids	3.24 ± 0.11	2.60 ± 0.10
Total dietary Fiber	34.56 ± 0.90	58.52 ± 2.56
Carotenoids	<Ldl *	2.87 ± 0.15

Carotenoidi in <i>H. pluvialis</i> fase rossa	mg/g su peso secco
Beta-carotene	0.6
luteina	0.99
astaxantina	20.01

Molino, A., Iovine, A., Casella, P., Mehariya, S., Chianese, S., Cerbone, A., ... & Musmarra, D. (2018). Microalgae characterization for consolidated and new application in human food, animal feed and nutraceuticals. *International journal of environmental research and public health*, 15(11), 2436.



Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca

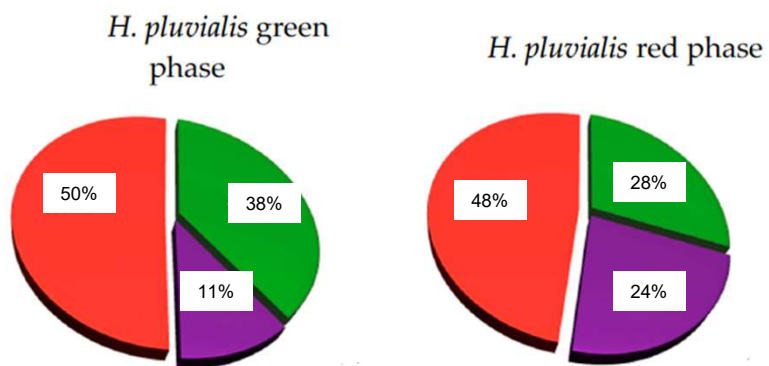


Italiadomani

PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA



## Composizione del contenuto cellulare di *Haematococcus pluvialis*



Acidi grassi	% su acidi grassi totali	
	H. pluvialis fase verde	H. pluvialis fase rossa
Acido palmitico (SFA)	27%	22%
Acido linoleico (PUFA)	13%	31%
Acido linoleico (PUFA)	37%	0,09%

**In rosso:** acidi grassi polinsaturi

**In viola:** acidi grassi monoinsaturi

**In verde:** acidi grassi saturi





Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



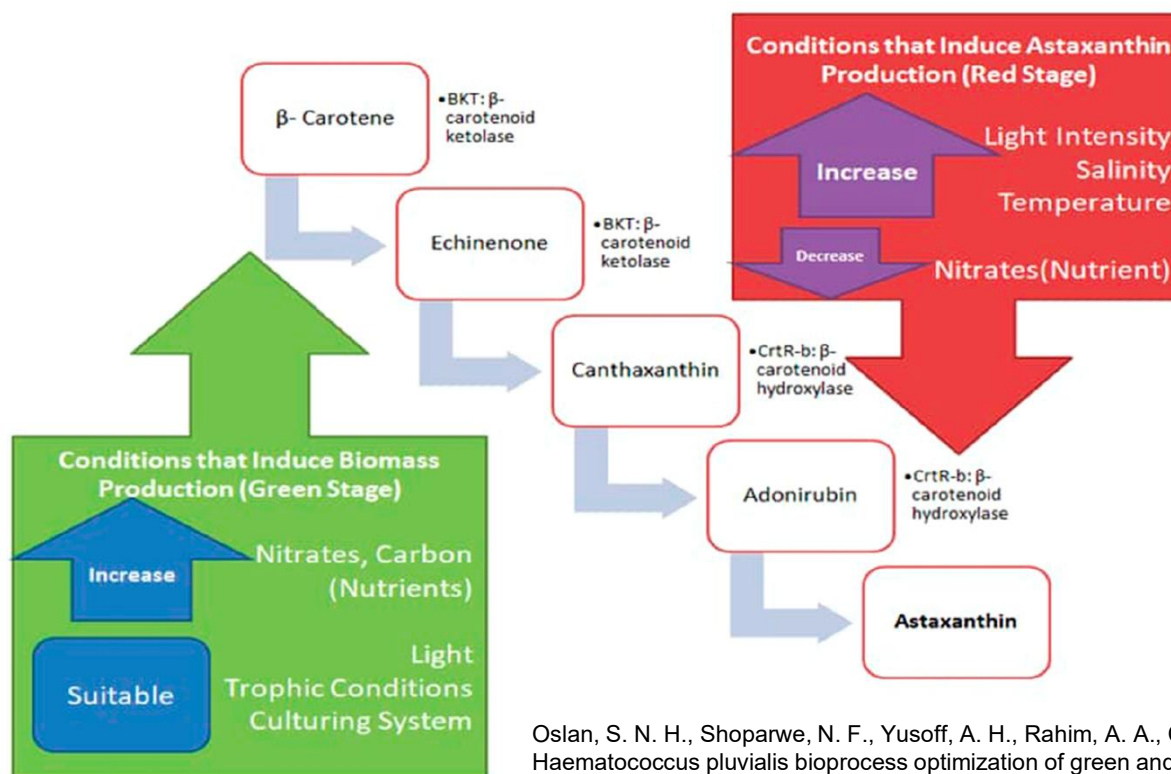
Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA

SUS-MIRRI.IT

- Condizioni di crescita per la produzione di astaxantina



## Strategie per la produzione di astaxantina



Oslan, S. N. H., Shoparwe, N. F., Yusoff, A. H., Rahim, A. A., Chang, C. S., Tan, J. S., ... & Mohamed, M. S. (2021). A review on *Haematococcus pluvialis* bioprocess optimization of green and red stage culture conditions for the production of natural astaxanthin. *Biomolecules*, 11(2), 256.



Finanziato dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero dell'Università e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA



## Temperatura ottimale per la crescita della microalga e la produzione di astaxantina

Nelle condizioni testate da Wan et al., 2014, la crescita della microalga *H. pluvialis* è stata testata a diverse temperature, da 8 °C a 33 °C.

La temperatura limite risulta essere 33 °C sia per la produzione della biomassa (A) sia della produzione di astaxantina (B)

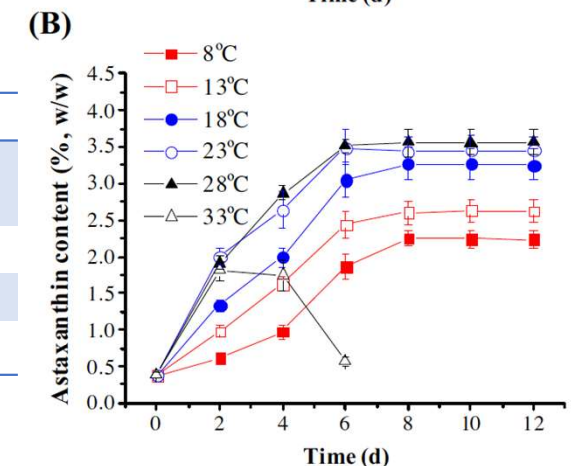
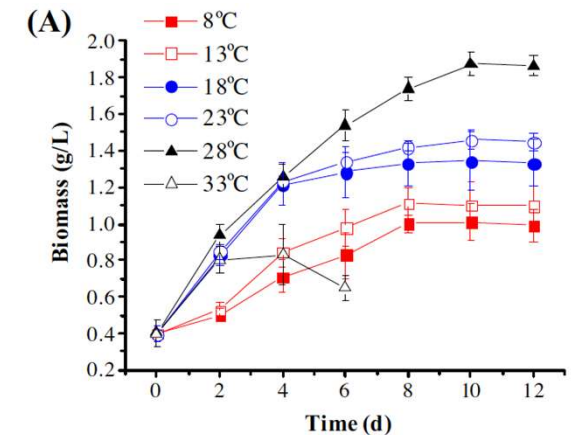
Le migliori concentrazione della microalga sono state ottenute nell'intervallo di temperatura 18 - 28 °C

La temperatura ottimale per la produzione della biomassa e dell'astaxantina risulta essere 28 °C

### Parametri

Sistema di coltivazione	PBR tubulare di vetro cilindrico con fondo conico
Volume	1 L
Illuminazione	continua
Intensità	250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ .

Wan, M., Zhang, J., Hou, D., Fan, J., Li, Y., Huang, J., & Wang, J. (2014). The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light–dark cyclic cultivation. *Bioresource technology*, 167, 276-283.





Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA



## Salinità

Nelle condizioni testate da Li et al., 2022, la crescita della microalga *H. pluvialis* è stata testata a diverse concentrazioni di NaCl (1-2-4 g/L).

I test sulla crescita della microalga e sul contenuto di astaxantina a queste concentrazioni sono stati effettuati ad intensità luminose più elevate (250  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) in modo tale da indurre la produzione di astaxantina

Gli autori hanno dimostrato come la microalga possa tollerare queste concentrazioni di NaCl e come il contenuto di astaxantina aumenti dipendentemente dall'aumentare del contenuto di NaCl fino a 2 g/l.

Parametri	
Sistema di coltivazione	PBR tubulare di vetro cilindrico con fondo conico
Volume	3 L
Temperatura	25 °C
Intensità	30 ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) (250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ induzione prod. Astaxantina)

Treatment	Biomass ( $\text{g L}^{-1}$ )	Astaxanthin content ( $\text{mg g}^{-1}$ )
Control (high light)	$1.3 \pm 0.01$	$12.18 \pm 0.12$
1 $\text{g L}^{-1}$ NaCl	$1.37 \pm 0.07$	$20.78 \pm 0.43^{***}$
2 $\text{g L}^{-1}$ NaCl	$1.53 \pm 0.03^{**}$	$25.92 \pm 0.66^{***}$
4 $\text{g L}^{-1}$ NaCl	$0.67 \pm 0.01^{**}$	$17.26 \pm 0.71^{**}$

Li, Q., You, J., Qiao, T., Zhong, D. B., & Yu, X. (2022). Sodium chloride stimulates the biomass and astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* via a two-stage cultivation strategy. *Bioresource Technology*, 344, 126214.



Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



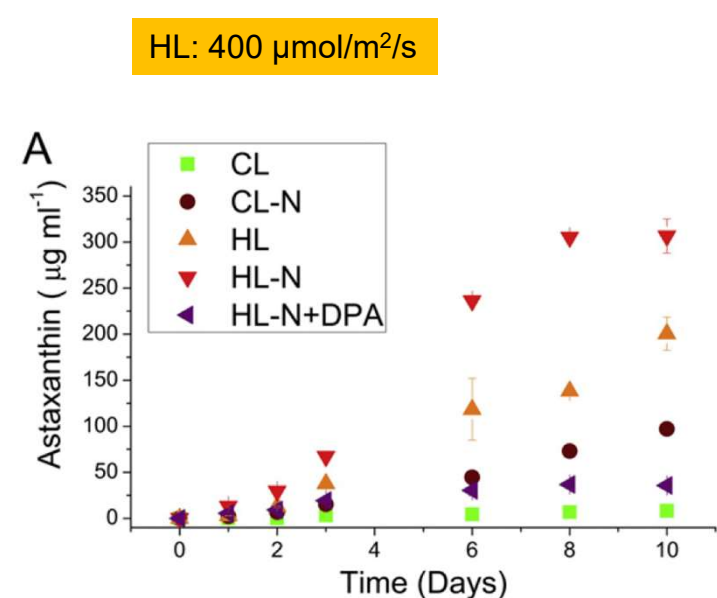
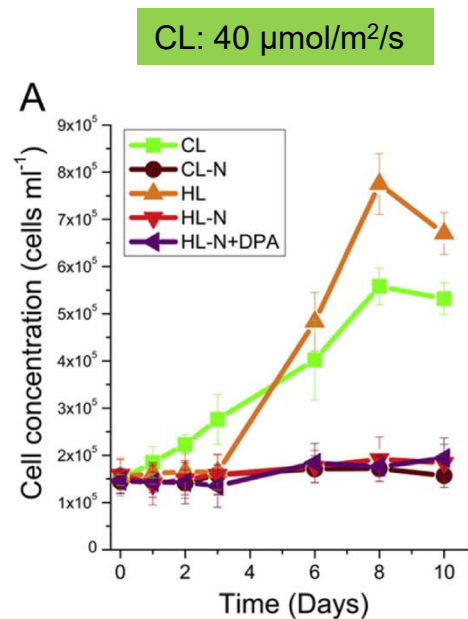
Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA



## Effetto dell'inedia dei nutrienti sulla produzione di astaxantina

Nelle condizioni testate da Scibilia et al., 2015:

- la concentrazione della microalga *H. pluvialis* è maggiore alla bassa (CL) ed alta (HL) intensità luminosa ed in presenza di nutrienti di azoto (17.65 mM nitrato di sodio)
- Inversamente, la concentrazione di astaxantina è maggiore quando l'intensità luminosa è alta (HL) ed in assenza di nitrati (HL -N)







Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



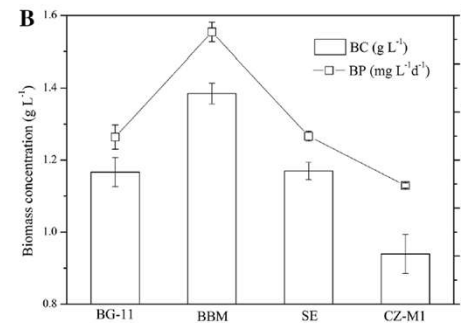
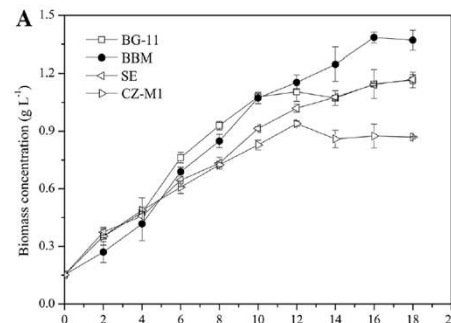
Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA



## Mezzo di crescita più idoneo per la produzione dell'astaxantina

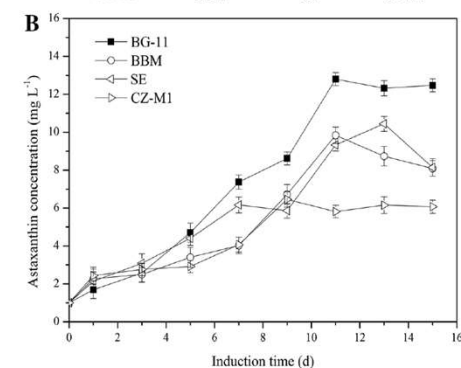
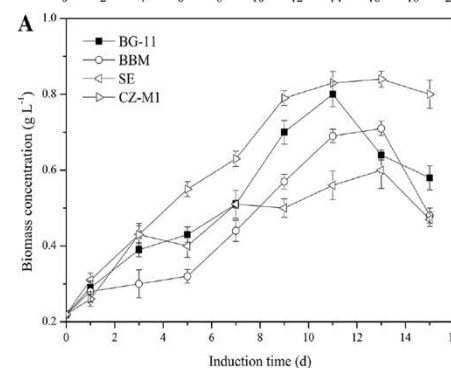
**Table 1** The compositions of various freshwater algal culture media

Chemical component	CZ-M1	SE	BG-11	BBM
NaNO <sub>3</sub>	750 mg	250 mg	1.5 g	250 mg
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	75 mg	75 mg	75 mg	75 mg
CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	25 mg	25 mg	36 mg	25 mg
NaCl	25 mg	25 mg	–	25 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	75 mg	75 mg	40 mg	–
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	175 mg	175 mg	–	175 mg
Na <sub>2</sub> EDTA	–	0.2 mg	1 mg	0.75 mg
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5 mg	0.5 mg	–	9.7 µg
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.17 mg	–	–	–
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	69.5 µg	–	–	–
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	12.35 µg	–	–	–
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61 µg	2.86 mg	2.86 mg	–
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	2.5 µg	80 µg	79 µg	–
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	287 µg	0.22 mg	222 µg	5 µg
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	–	1.86 mg	1.81 mg	41 µg
Co (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	–	50 µg	49 µg	2 µg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	–	0.39 mg	0.39 mg	4 µg
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	–	–	20 mg	–
Citric acid	–	–	6 mg	–
Ferric ammonium citrate	–	–	6 mg	–
Vitamin B <sub>1</sub>	–	–	–	1 mg
Biotin	–	–	–	0.25 µg
Vitamin B <sub>12</sub>	–	–	–	0.15 µg
Total volume	1 L	1 L	1 L	1 L



30 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>

La concentrazione e la produttività più alta è stata ottenuta utilizzando il Bold Basal Medium



100 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>

La concentrazione più alta di astaxantina è stata ottenuta utilizzando il BG11

Zhao, Y., Yue, C., Geng, S., Ning, D., Ma, T., & Yu, X. (2019). Role of media composition in biomass and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* under two-stage cultivation. *Bioprocess and biosystems engineering*, 42, 593-602.



## Produzione di astaxantina in condizioni di elevata intensità luminosa

- la produzione di astaxantina necessita di una fase di induzione innescata prevalentemente da intensità luminose più elevate rispetto a quelle testate per la crescita della biomassa.
- Nella maggior parte degli studi, le intensità luminose vengono incrementate di un ordine di grandezza 10 volte maggiore dell'intensità luminosa per la crescita della biomassa

Cultivation Conditions				Production of Bioactive Compounds (mg/g)				Reference
LI (Lux)	CT (Days)	WV (mL)	AFR (mL/min)	Astaxanthin	Lutein	$\beta$ -Carotene	Fatty Acids	
7290	15	400	120	~4	na *	na	Na	[35]
5832	15	400	120	~6.4	na	na	Na	[36]
5400	4	30	~7	8.87 $\pm$ 2.7	na	na	Na	[61]
16,200	4	30	~7	9.27 $\pm$ 1.0	na	na	Na	[61]
2500	14	1200	50					Il nostro caso studio

LI: Light intensity; CT: Cultivation time; WV: Working volume; AFR: Aeration flow rate; na \*: data was not available.



Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA

SUS-MIRRI.IT

- Caso studio



Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA



## Publicazioni

- Sanjeet, M., Antonio, M., Angela, I., Chianese, S., & Musmarra, D. (2018). Cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin recovery in a bubble column photo bioreactor. In *Proceedings of BioSD 2018*. IND.



antioxidants



Article

### An Integrated Strategy for Nutraceuticals from *Haematococcus pluvialis*: From Cultivation to Extraction

Sanjeet Mehariya <sup>1,2</sup>, Neeta Sharma <sup>3</sup>, Angela Iovine <sup>1,2</sup>, Patrizia Casella <sup>2</sup>, Tiziana Marino <sup>1</sup>, Vincenzo Larocca <sup>3</sup>, Antonio Molino <sup>2</sup> and Dino Musmarra <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Engineering, University of Campania "Luigi Vanvitelli", Real Casa dell'Annunziata, Via Roma 29, 81031 Aversa (CE), Italy; sanjeet.mehariya@unicampania.it (S.M.); angela.iovine@unicampania.it (A.I.); tiziana.marino@unicampania.it (T.M.)

<sup>2</sup> ENEA, Italian National Agency for New Technologies, Energy and Sustainable Economic Development, Department of Sustainability-CR Portici, P. Enrico Fermi, 1, 80055 Portici (NA), Italy; patrizia.casella@enea.it (P.C.); antonio.molino@enea.it (A.M.)

<sup>3</sup> ENEA, Italian National Agency for New Technologies, Energy and Sustainable Economic Development, Department of Sustainability-CR Trisaia, SS Jonica 106, km 419 + 500, 75026 Rotondella (MT), Italy; neeta.sharma@enea.it (N.S.); vincenzo.larocca@enea.it (V.L.)

\* Correspondence: dino.musmarra@unicampania.it; Tel.: +39-081-5010387

Received: 27 June 2020; Accepted: 31 August 2020; Published: 3 September 2020



**Abstract:** The aim of this study was to develop an effective integrated cultivation system for *Haematococcus pluvialis* as a source of bioactive compounds such as astaxanthin, lutein, proteins, and fatty acids (FAs). The Chlorophyta *H. pluvialis* was cultivated in a vertical bubble column photobioreactor (VBC-PBR) under batch mode, allowing switching from green to red phase for astaxanthin induction. The combined effect of light intensity and nutrients on bioactive compound formation was investigated. Results showed that growth under lower nutrients availability and light intensity led to a higher concentration of biomass. Growth under high light intensity with an appropriate concentration of nitrate, sulfate, phosphate and magnesium led to ~85% and ~58% higher production of total carotenoids and fatty acids, respectively. Under high stress conditions, ~90% nitrate and phosphate consumption were observed.

**Keywords:** microalgae; astaxanthin; lutein; fatty acids; antioxidant; extraction; algal extract



Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA

SUS-MIRRI.IT

## Obiettivo

- Valutare due fasi di crescita della fase verde della microalga *Haematococcus pluvialis* nel PBR V/S 56.5 l/m<sup>2</sup>
- Studiare l'effetto di due diverse intensità luminose (bassa ed alta), luce blu, sulla produzione di composti bioattivi da parte della microalga *H. pluvialis*





Finanziato dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero dell'Università e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA

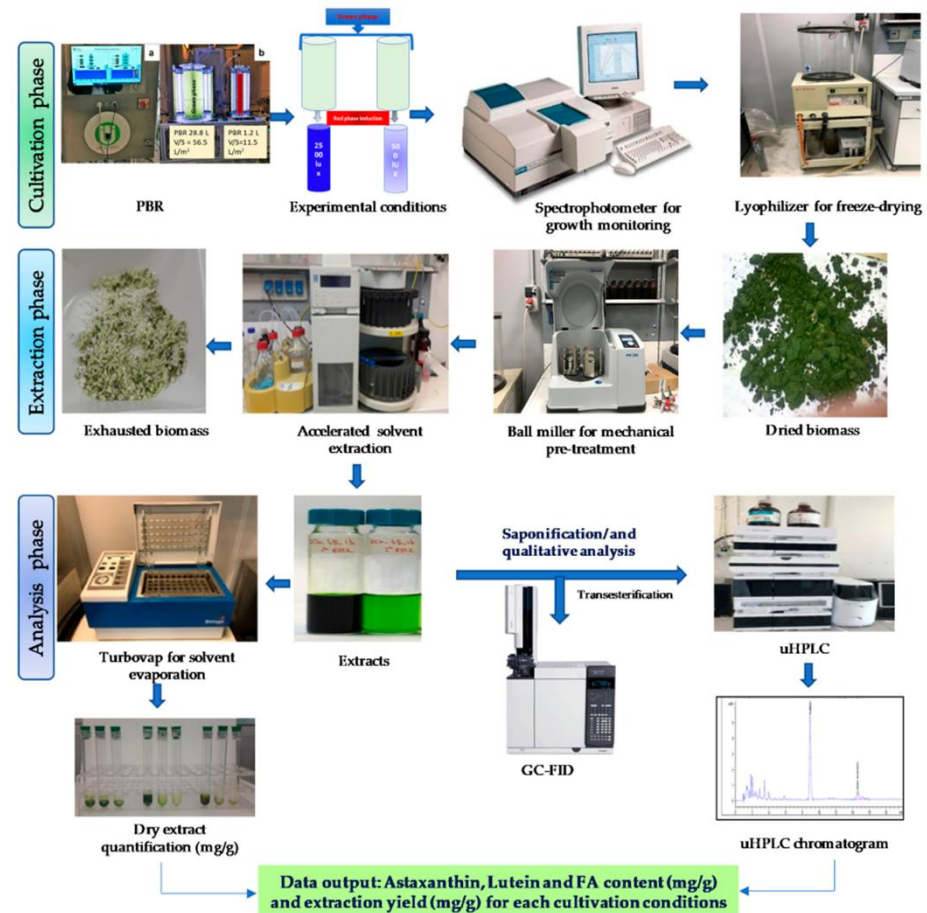


# Disegno sperimentale

1° coltivazione

2° estrazione

3° fase analitica



Mehariya, S., Sharma, N., Iovine, A., Casella, P., Marino, T., Larocca, V., ... & Musmarra, D. (2020). An integrated strategy for nutraceuticals from *Haematococcus pluvialis*: From cultivation to extraction. *Antioxidants*, 9(9), 825.



Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA



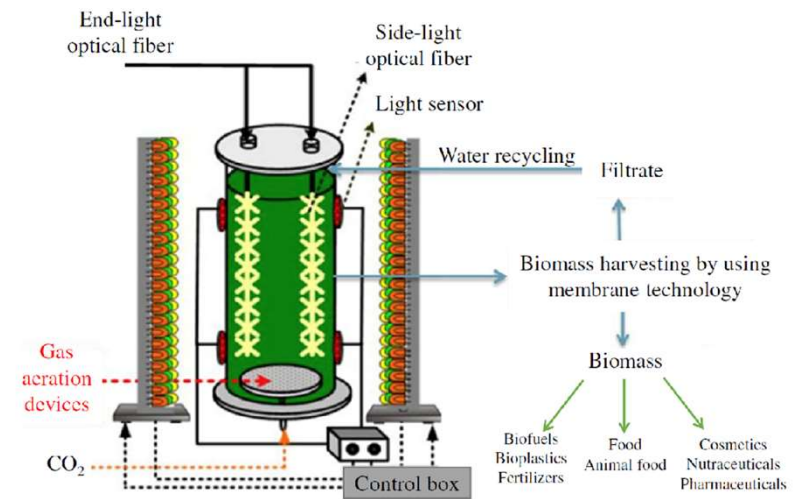
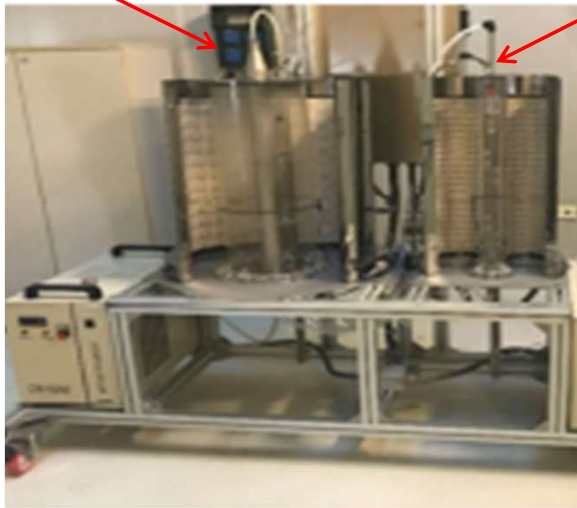
## Schema dell'impianto

PBR

Altezza = 680 mm;  
Diametro esterno = 250 mm;  
spessore = 10 mm  
Rapporto volume superficie (V/S)=  
56.5 L/m<sup>2</sup>.

PBR

Altezza = 680 mm;  
Diametro esterno = 60 mm;  
spessore = 10 mm  
Rapporto volume superficie  
(V/S)= 11.5 L/m<sup>2</sup>.



Molino, A., Mehariya, S., Iovine, A., Casella, P., Marino, T., Karatza, D., ... & Musmarra, D. (2020). Enhancing biomass and lutein production from *Scenedesmus almeriensis*: effect of carbon dioxide concentration and culture medium reuse. *Frontiers in Plant Science*, 11, 415.



Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA



## Mezzo di crescita

### Mezzo di crescita (BG-11 ) Concentrazione elementi

$\text{Na}_2\text{EDTA}$  ( $2.7 \times 10^{-9}$  mM),  
 $\text{NaNO}_3$  ( $1.8 \times 10^{-5}$  mM),  
 $\text{K}^2\text{HPO}_4$  ( $2.3 \times 10^{-7}$  mM),  
 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  ( $6.2 \times 10^{-7}$  mM),  
 $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  ( $2.4 \times 10^{-7}$  mM),  
 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  ( $3.12 \times 10^{-8}$  mM),  
 $\text{C}_6\text{H}_8\text{FeNO}_7$  ( $2.29 \times 10^{-8}$  mM),  
 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ( $1.89 \times 10^{-7}$  mM)

Un volume di 10 mL contenente i seguenti elementi, è stato aggiunto al mezzo per ottenere le concentrazioni finali:

$\text{H}_3\text{BO}_3$  ( $4.63 \times 10^{-5}$  mM),  
 $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  ( $9.15 \times 10^{-6}$  mM),  
 $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  ( $7.72 \times 10^{-7}$  mM),  
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  ( $1.89 \times 10^{-6}$  mM),  
 $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  ( $3.16 \times 10^{-7}$  mM),  
 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  ( $1.70 \times 10^{-7}$  mM)



Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA

SUS-MIRRI.IT

## Inoculo – *H. pluvialis*

- L'inoculo è stato coltivato in flask usando il mezzo di crescita BG-11 medium.
- La crescita dell'inoculo è avvenuta a 28 °C, ad un'illuminazione di 250 mol fotoni/m<sup>2</sup>/s usando una lampada a luce bianca 3000K



- Inizio della coltivazione in fase verde in fotobioreattore bubble column



Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani

PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA

SUS-MIRRI.IT

## Condizioni di crescita in fase verde

### Condizioni di crescita

Temperature (° C):

28 ° C

pH:

7.5-8.5

Luce:

Bianca

Intensità  
(lux sulla superficie):

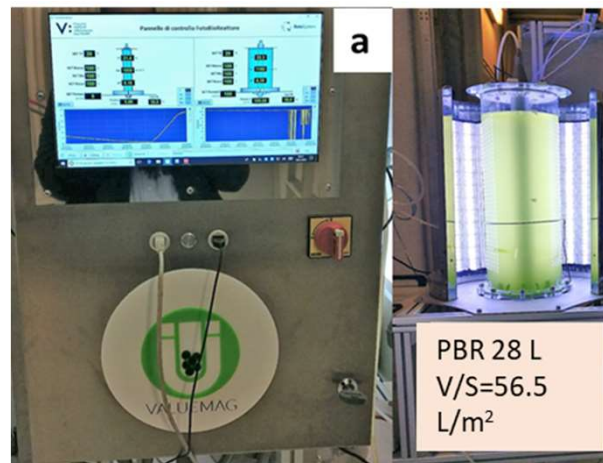
4000

Intensità  
(mol photons/m<sup>2</sup>/s):

100

Flusso ml/min

300







Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



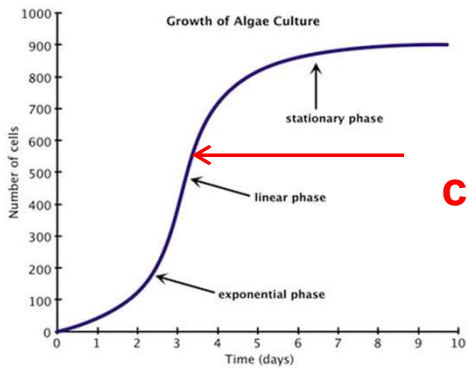
Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



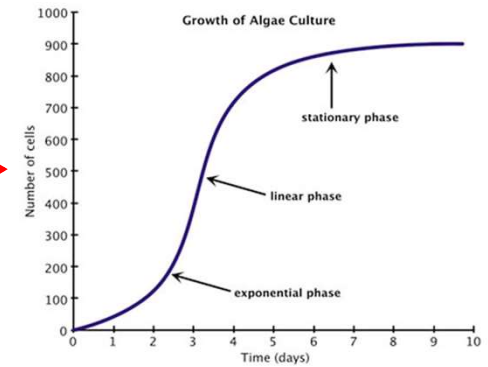
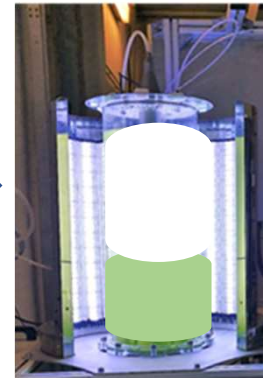
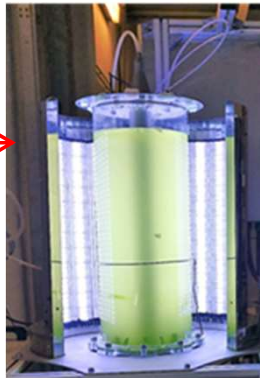
Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA



## Disegno sperimentale – FASE VERDE



**Stop  
crescita**



**1° fase di crescita**

**2° fase di crescita**

**Raccolta 70% del  
volume della  
biomassa prodotta**



**70% BG-11 mezzo  
30% coltura 1° fase  
di crescita**



Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca

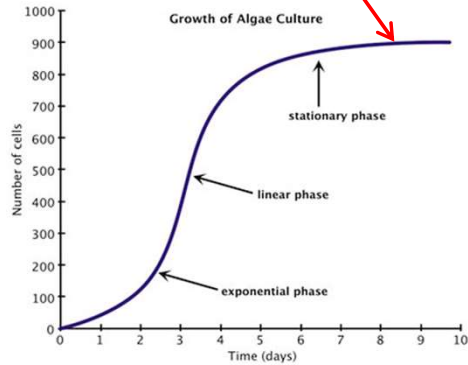
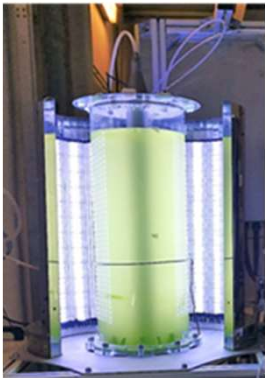


Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA

SUS-MIRRI.IT

## Dalla fase verde alla fase rossa

### Fine 2° fase di crescita verde



La biomassa prodotta (coltura liquida) è stata trasferita dal fotobioreattore da 28 L (V/S 56.5 L/m<sup>2</sup>) al fotobioreattore da 1.2 L (V/S 11.5 L/m<sup>2</sup>)

Nel fotobioreattore da 1.2 L (V/S 11.5 L/m<sup>2</sup>) la microalga passa dalla fase verde del ciclo di vita a quella rossa sotto l'effetto di un aumento dell'intensità luminosa



Finanziato dall'Unione europea  
NextGenerationEU



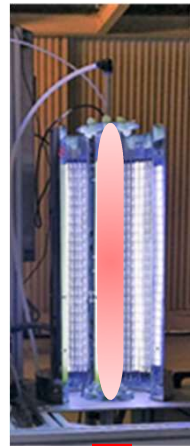
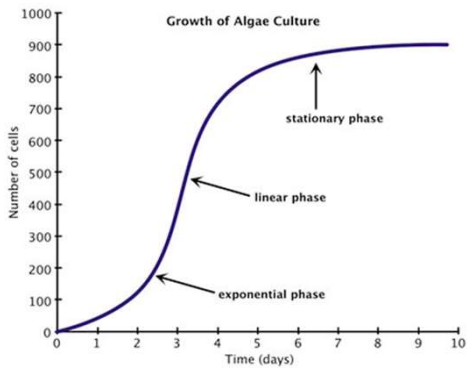
Ministero dell'Università e della Ricerca



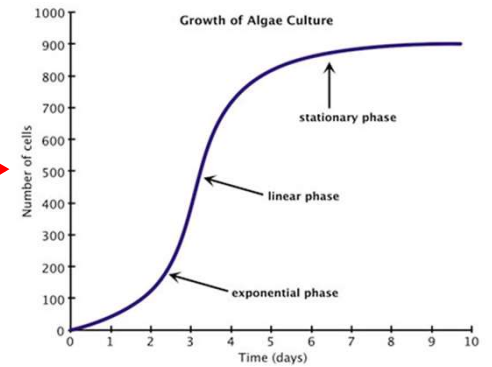
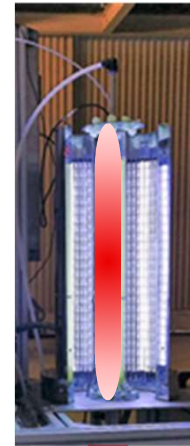
Italiadomani  
PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA



## Disegno sperimentale – FASE ROSSA



*versus*



**Monitoraggio della crescita all'intensità di 500 lux**

**Monitoraggio della crescita all'intensità di 2500 lux**

**Raccolta biomassa prodotta**



Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA



## Condizioni di crescita in fase rossa

### Condizioni di crescita

Temperature (° C): 28 ° C

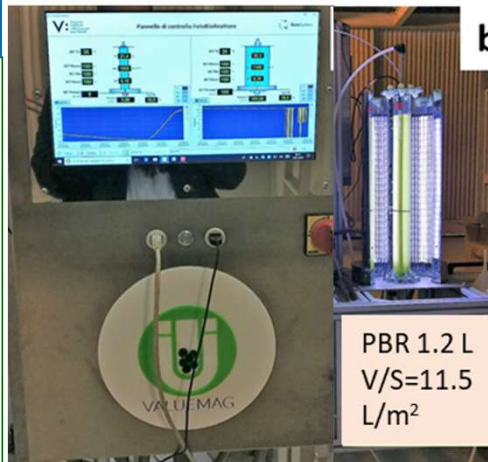
pH: 7.5-8.5

Flusso ml/min 300

Luce: Blu

Intensità  
(lux sulla superficie): 500

Intensità  
(mol photons/m<sup>2</sup>/s): 55



### Condizioni di crescita

Temperature (° C): 28 ° C

pH: 7.5-8.5

Flusso ml/min 300

Luce: Blu

Intensità  
(lux sulla superficie): 2500

Intensità  
(mol photons/m<sup>2</sup>/s): 280



Finanziato dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero dell'Università e della Ricerca



Italiadomani

PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA



# Misure della crescita della microalga *S. almeriensis*

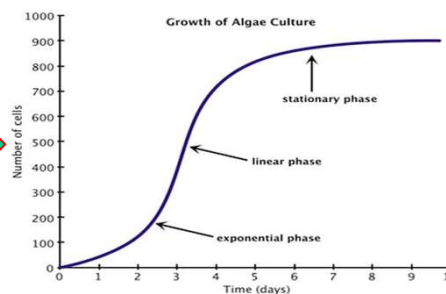
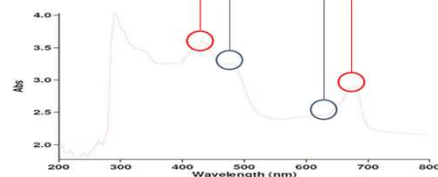


Coltura *H. pluvialis*



Chlorophyll-a (at 420 nm and 690 nm)

Chlorophyll-b (at 480 and 620 nm)



Source: <https://www.e-education.psu.edu/egee439/node/694>

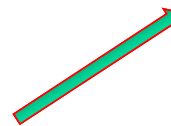
Misura della crescita della microalga



*H. pluvialis* biomassa secca



Concentrazione della microalga (g/L) =  $0,0867 * A - 0,1868$







Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani

PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA

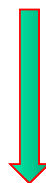


## Misure del contenuto dei cationi/anioni nel mezzo di crescita



Coltura *H. pluvialis*

→ Filtrazione →



Filtrato

→ Misura cationi ed anioni tramite Dionex ICS-1100

*H. pluvialis*  
biomassa umida

→



*Haematococcus  
pluvialis*  
biomassa secca

→

Estrazione accelerata con  
solvente



Contenuto di carotenoidi  
e acidi grassi

Resa estrattiva



Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani

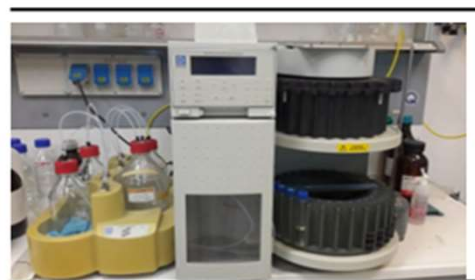
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA



## Estrazione dei carotenoidi e dei lipidi nella biomassa prodotta



*Estrazione  
accelerata con  
solvente*



### Condizioni operative

Solvente	etanolo
Temperatura °C	67
Pressione (bar)	100
Tempo di estrazione (min)	20-30
Cicli di estrazione	2

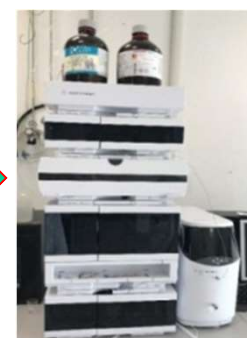
*H. pluvialis* biomassa secca



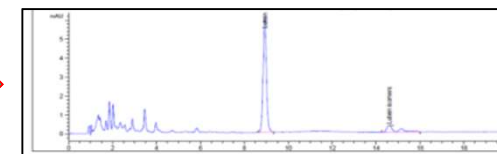
Agilent GC-FID per l'analisi degli  
acidi grassi



*H. pluvialis*  
estratti



Agilent 1290 Infinity II uHPLC per  
l'analisi della luteina





Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA

SUS-MIRRI.IT

- Risultati



Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



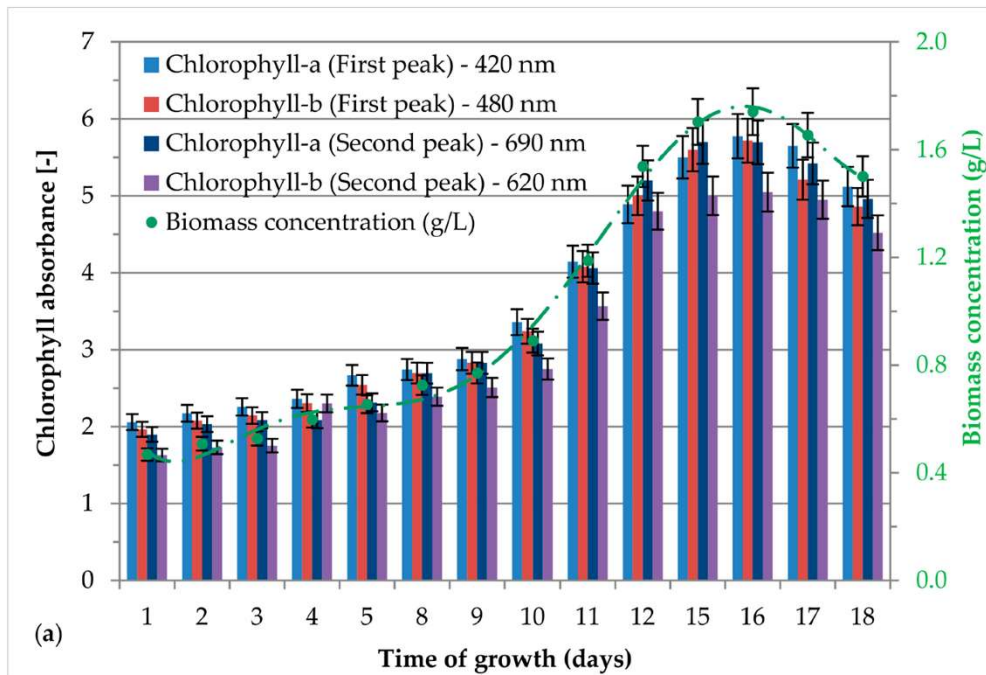
Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA



## 1° Fase verde - Crescita della microalga *Haematococcus pluvialis* (Fase verde) in PBR with V/S =56.5 l/m<sup>2</sup>

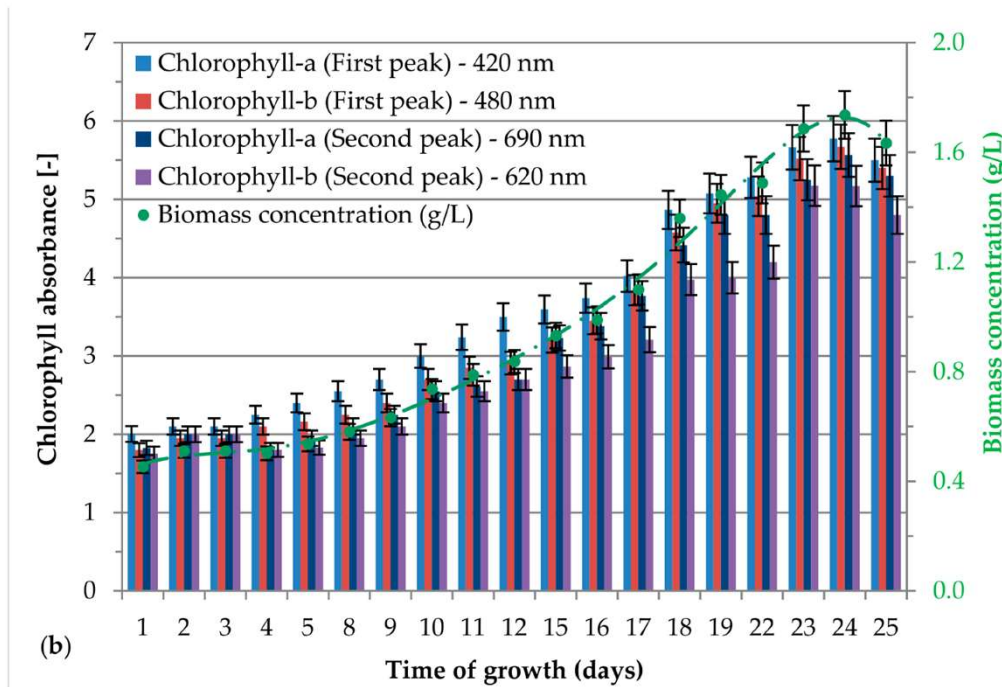


- L'andamento della curva di crescita della biomassa (g/L) riflette l'andamento delle clorofille alle diverse lunghezze d'onda di assorbimento
- La curva di crescita è costituita da una fase esponenziale da 0 a 9 giorni (9 giorni), fase lineare da 9 a 16 giorni (5 giorni), fase stazionaria/declino da 16 a 18 giorni (2 giorni).
- La massima concentrazione della microalga *H. pluvialis* è stata ottenuta al 16esimo giorno di coltivazione.
- La massima concentrazione ottenuta equivale a 1.7 g/L

Mehariya, S., Sharma, N., Iovine, A., Casella, P., Marino, T., Larocca, V., ... & Musmarra, D. (2020). An integrated strategy for nutraceuticals from *Haematococcus pluvialis*: From cultivation to extraction. *Antioxidants*, 9(9), 825.



## 2° fase verde - crescita della microalga *Haematococcus pluvialis* (Fase verde) in PBR with V/S =56.5 l/m<sup>2</sup>



- Nella seconda fase verde è stata ottenuta la stessa concentrazione pari a 1.7 g/L al giorno 24.
- Rispetto alla prima fase di crescita, nella seconda si osserva una fase più prolungata della crescita della microalga.
- La curva di crescita è costituita da una fase esponenziale da 0 a 12 giorni (12 giorni), fase lineare da 12 a 24 giorni (12), fase stazionaria/declino da 16 a 18 giorni (2 giorni).
- In questa seconda fase verde la fase esponenziale e lineare hanno una durata maggiore con un andamento più rallentato rispetto alla prima fase della coltura





Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA



# Consumo di nutrienti tra la 1° e la 2° fase di crescita della microalga *Haematococcus pluvialis* (Fase verde) in PBR with V/S =56.5 l/m<sup>2</sup>

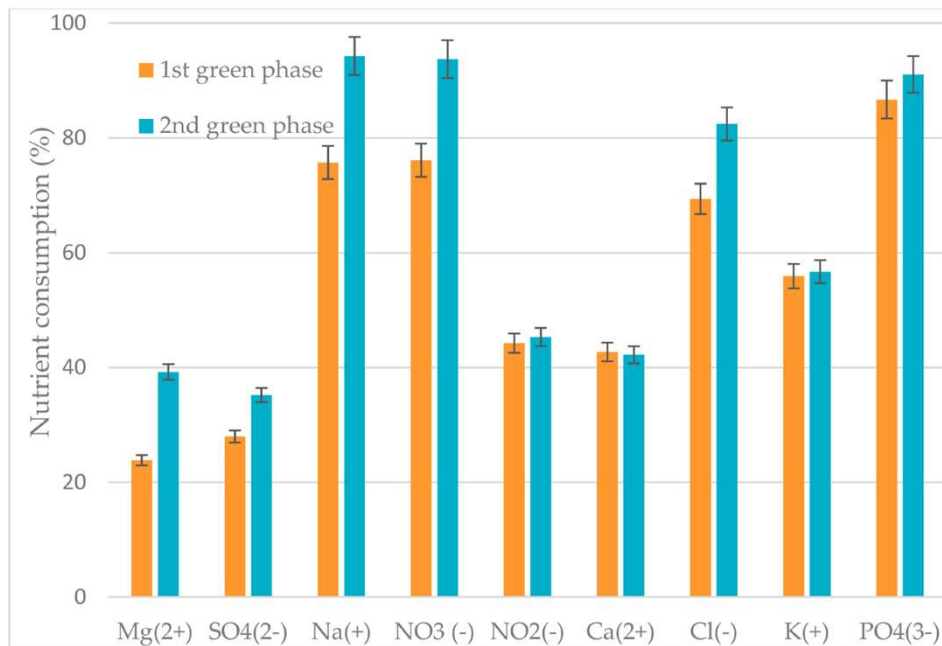


Tabella: concentrazione (mM) e quantità (mg) iniziale nella prima fase 1°-GP e nella 2° -GP

Nutrients	1st GP-C (mM)	1st GP-Q (mg)	2nd GP-C (mM)	2nd GP-Q (mg)
Mg <sup>2+</sup>	0.22 ± 0.01	36.12 ± 1.63	0.21 ± 0.01	55.12 ± 2.65
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.12 ± 0.01	92.68 ± 4.63	0.11 ± 0.01	106.71 ± 5.34
Na <sup>+</sup>	10.36 ± 0.26 <sup>a</sup>	5049.8 ± 126.25	7.98 ± 0.36 <sup>a</sup>	4842.6 ± 217.92
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.71 ± 0.07 <sup>b</sup>	2256.8 ± 90.27	1.31 ± 0.06 <sup>b</sup>	2136.2 ± 96.13
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0.10 ± 0.00	56.00 ± 2.52	0.08 ± 0.00	49.64 ± 2.23
Ca <sup>2+</sup>	1.25 ± 0.06 <sup>c</sup>	597.52 ± 26.89	1.08 ± 0.05 <sup>c</sup>	513.85 ± 3.12
Cl <sup>-</sup>	2.10 ± 0.08 <sup>d</sup>	1449.6 ± 57.98	1.66 ± 0.08 <sup>d</sup>	1359.5 ± 67.98
K <sup>+</sup>	0.36 ± 0.02	223.16 ± 10.04	0.30 ± 0.02	187.9 ± 9.40
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0.17 ± 0.01	386.4 ± 17.39	0.12 ± 0.01	299.06 ± 14.95

GP-C: Green Phase-Concentration, GP-Q: Green Phase-Quantity. Letters <sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>c</sup>, <sup>d</sup> identified for each group the statistical significantly value ( $p < 0.05$ ).

- Il consumo di nutrienti è stato maggiore nella seconda fase rispetto alla prima.
- Sodio, nitrati e fosfati sono stati i nutrienti più consumati durante la seconda fase.
- Il consumo di sodio, nitrato, calcio, e cloro è significativamente differente tra la prima e la seconda fase verde ( $p < 0.05$ ).



Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



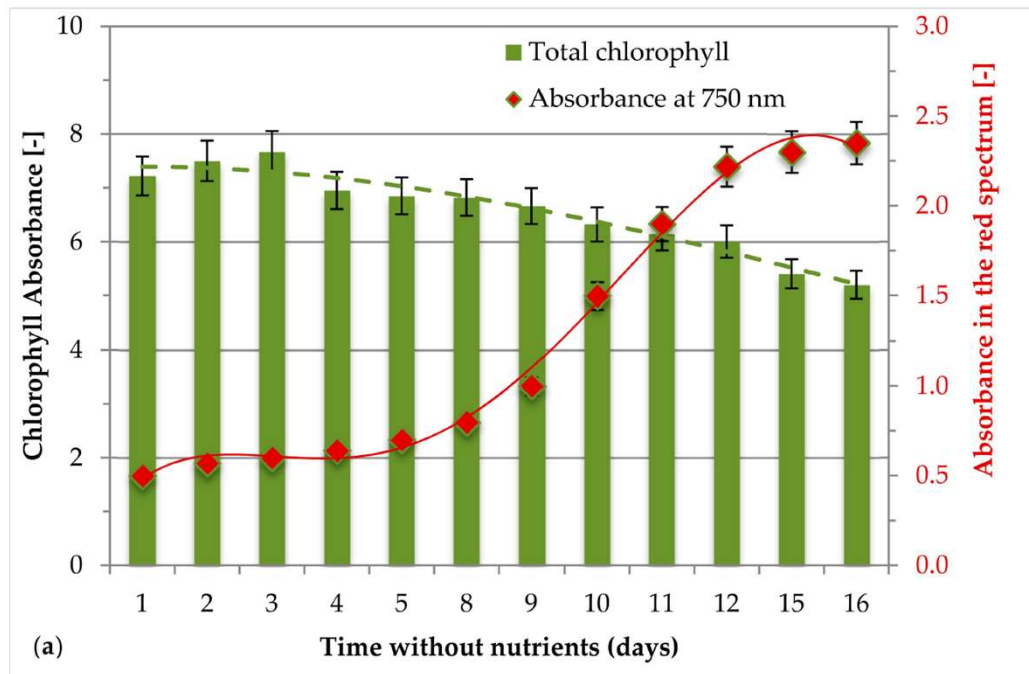
Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA



## Assorbanza della clorofilla durante la fase rossa a 2500 lux (280 mol/s/m<sup>2</sup>) luce blu (Intensità della luce più alta)



- Il contenuto totale di clorofilla è stato ottenuto sommando le assorbanze della clorofilla a, b
- L'assorbanza a 750 nm è stata utilizzata per monitorare la fase rossa in quanto corrisponde allo spettro del rosso.
- L'andamento della clorofilla totale durante la fase rossa non è crescente come la fase verde passando da 7 (1 giorno di crescita) a 5 (16esimo giorno di crescita)
- L'aumento dell'assorbanza a 750 nm evidenzia l'accumulo di astaxantina che raggiunge il picco a 16 giorni con un valore pari a 2.5 circa.



Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



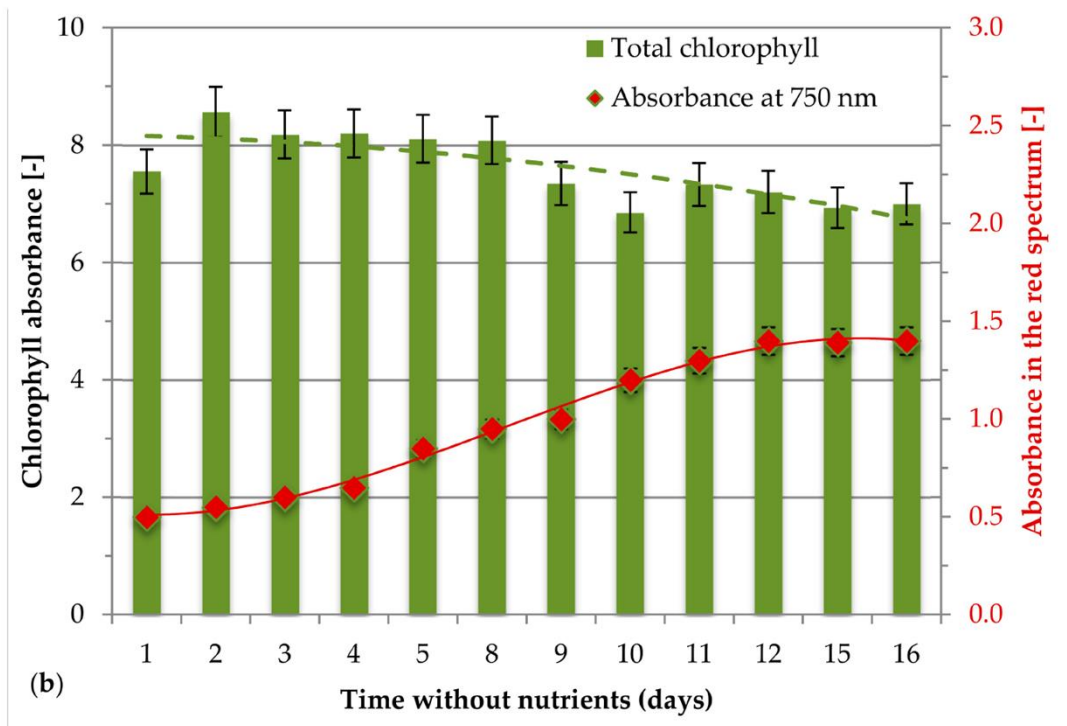
Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA



## Assorbanza della clorofilla durante la fase rossa a 500 lux (55 mol/s/m<sup>2</sup>) luce blu (Intensità della luce più bassa)



- L'andamento della clorofilla totale è paragonabile a quello riscontrato nella fase rossa ad alta intensità luminosa
- Dopo 16 giorni, l'assorbanza a 750 nm è circa 1,5
- L'andamento della clorofilla totale non è crescente come nella fase verde passando da 7.5 (1 giorno di crescita) a 7 (16esimo giorno di crescita)
- In questa situazione di intensità luminosa più bassa l'andamento decrescente delle clorofille non è netto come nella fase rossa a 2500 lux.



Finanziato dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero dell'Università e della Ricerca

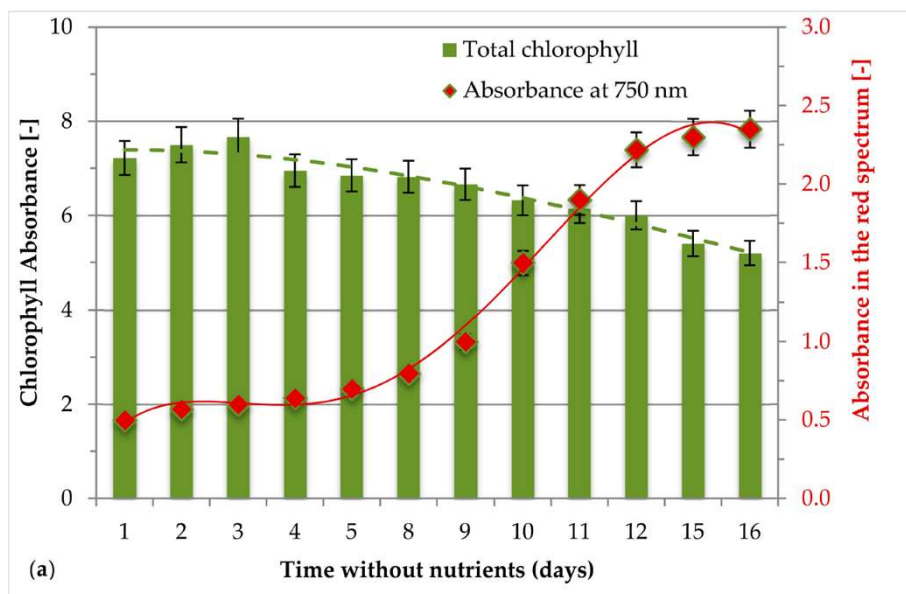


Italiadomani  
PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA

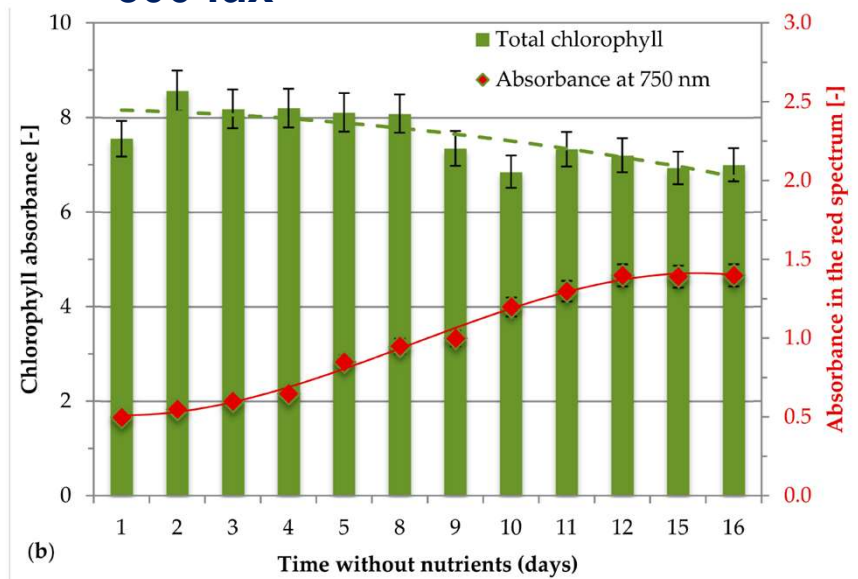


## Confronto dell'andamento crescita tra i due stadi di fase rossa

### 2500 lux



### 500 lux







Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



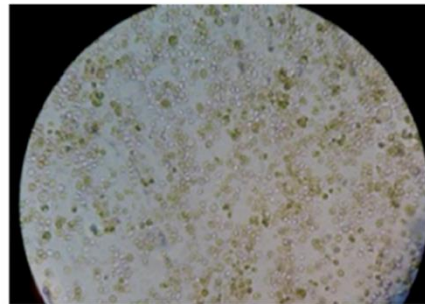
Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA

SUS-MIRRI.IT

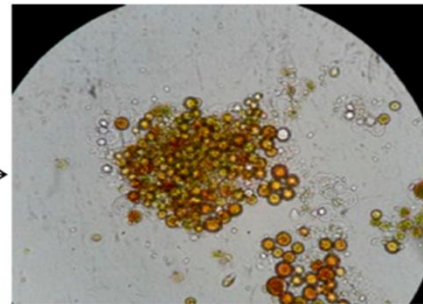
## Immagini dei due stadi della microalga *H. pluvialis* in fase rossa

2500 lux

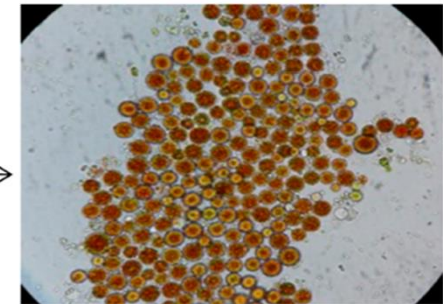
[a]



Day 0



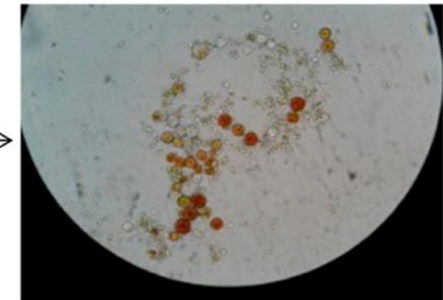
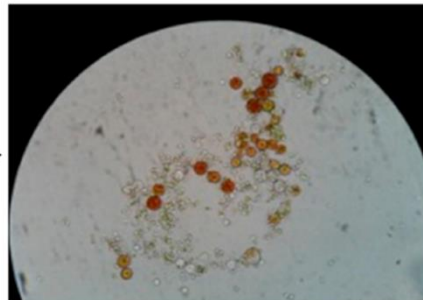
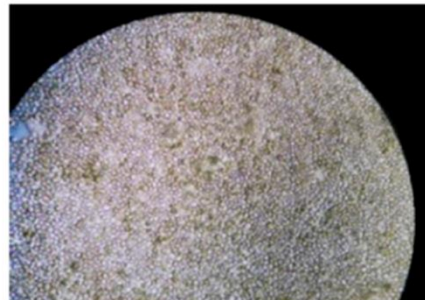
Day 7



Day 14

500 lux

[b]







Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca

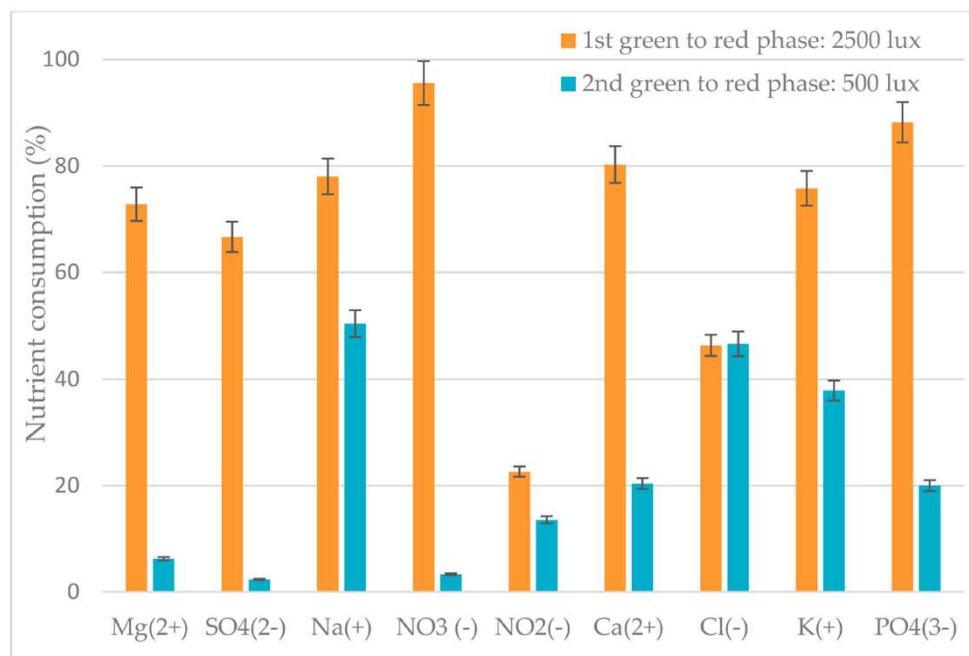


Italiadomani

PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA



## Consumo dei nutrienti nelle due stadi di crescita in fase rossa



- Il consumo di nutrienti è stato nettamente maggiore nella fase rossa a 2500 lux
- Nella fase a 500 lux è stata ottenuto al massimo il consumo del 50% di sodio, del 45% di cloro e del 37% di potassio
- La più alta percentuale di consumo è stata ottenuta per il nitrato (circa 95%) nella fase rossa a 2500 lux.
- La percentuale di consumo del fosfato è stata del 85%



Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



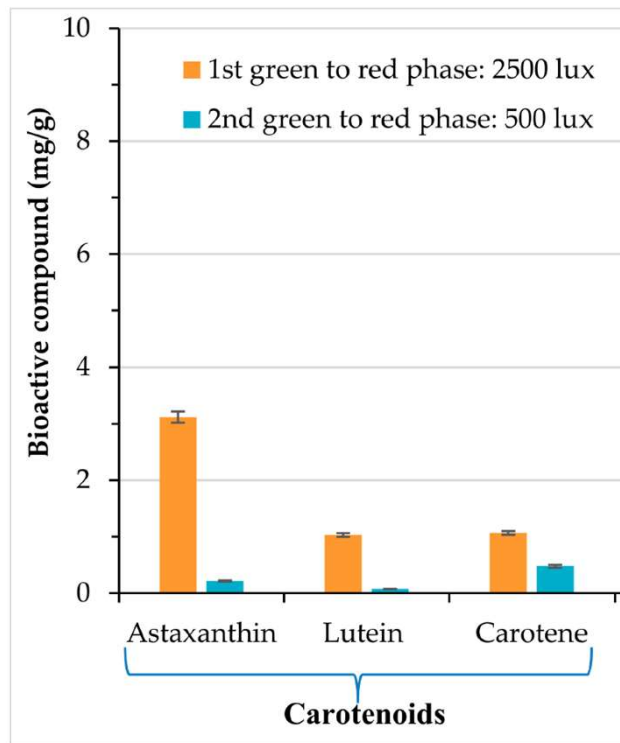
Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA

SUS-MIRRI.IT

## Produzione di carotenoidi durante la fase rossa



- A 2500 lux il contenuto totale di carotenoidi è circa 5 mg/g, of which ~3 mg/g is astaxanthin
- A 500 lux il contenuto totale dei carotenoidi è circa 1 mg/g
- A 2500 lux l'astaxantina è il carotenide più abbondante (3 mg/g)
- A 500 lux il più abbondante è il betacarotene circa 0.5 mg/g



Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



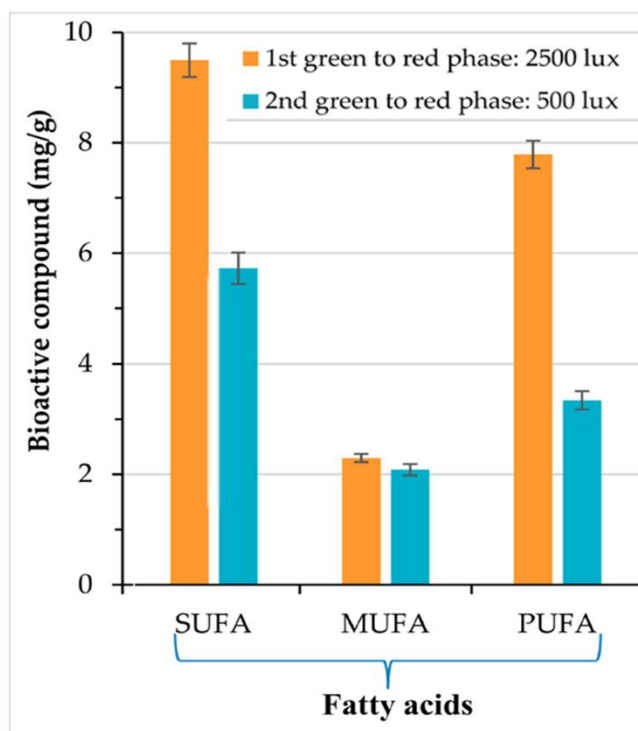
Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA



## Produzione di acidi grassi durante la fase rossa



% acidi grasso su peso secco

	Switch a to 2500 Lux	Switch b to 500 Lux
Butyric acid	0.38 ± 0.02	0.86 ± 0.04
Myristic acid	0.21 ± 0.01	0.02 ± 0.00
Palmitic acid	35.48 ± 1.61	45.43 ± 2.22
Pentadecanoic acid	0.27 ± 0.01	0.62 ± 0.04
Arachidic acid	8.96 ± 0.32	6.28 ± 0.37
Heneicosanoic	0.59 ± 0.03	0.37 ± 0.01
cis-10-Pentadecenoic acid	0.27 ± 0.01	0.37 ± 0.01
Palmitoleic acid	0.38 ± 0.02	1.35 ± 0.07
cis-10-Heptadecenoic acid	0.38 ± 0.02	0.49 ± 0.02
Elaidic acid	2.04 ± 0.11	3.45 ± 0.12
Myristoleic acid	0.21 ± 0.01	0.86 ± 0.04
cis-11-Eicosenoic acid	9.02 ± 0.43	8.62 ± 0.37
Linolenic acid	0.05 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Linoelaidic acid	40.79 ± 1.83	31.27 ± 1.60
γ-Linolenic acid	0.97 ± 0.05	0.00 ± 0.00

Acidi grassi totali 20 mg/g  
2500 lux

Acidi grassi totali 8 mg/g  
2500 lux

Acido palmitico (SFA) è il più  
prodotto tra i saturi

Acido linoelaidico (Polinsaturo) è  
quello maggiormente prodotto



Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA



## Conclusioni

- A causa del complesso ciclo di vita della microalga *H. pluvialis* è essenziale testare e sviluppare un'efficace strategia di coltivazione e di produzione della biomassa e dell'astaxantina
- L'intensità luminosa ha un ruolo chiave nel processo di induzione della produzione di questa molecola ma la combinazione con altri parametri può essere efficace per ottimizzare il processo
- I risultati ottenuti in questo caso studio hanno dimostrato efficace la strategia sviluppata che ha consentito di ottenere un aumento della produzione di astaxantina (circa 3 mg/g) e di altri composti bioattivi (beta-carotene, luteina e acidi grassi polinsaturi)
- Tale strategia potrebbe essere ottimizzata per ottenere concentrazioni ancora maggiori di astaxantina.



Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA

SUS-MIRRI.IT

# Grazie per l'attenzione

**Organizzatore e Responsabile dell'unità operativa UO11:** Ing. Antonio Molino

**Responsabile del laboratorio PROBIO:** Dott. Roberto Balducci

**Coordinatore delle attività Responsabile ENEA per il progetto PNRR SUS-MIRRI.IT:** Dott.ssa Annamaria Bevivino

**Docente e curatore della collezione della UO11:** Dott.ssa Patrizia Casella