



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 (CO₂-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

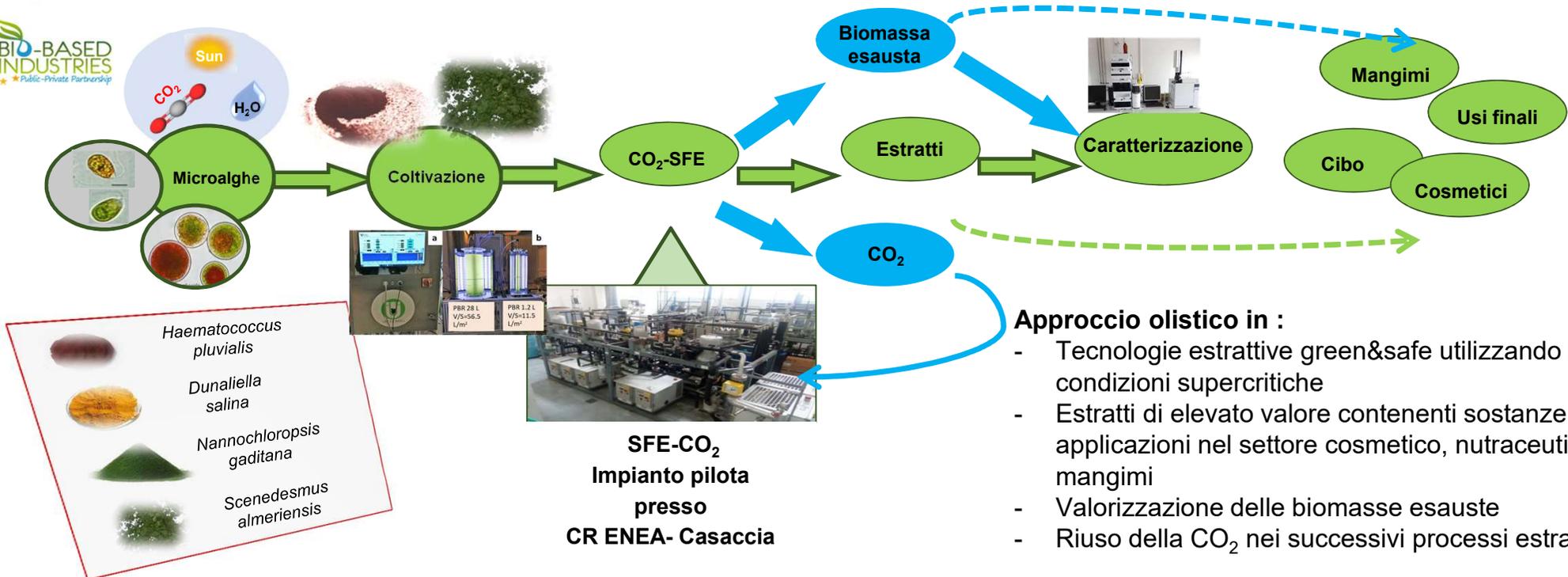


Italiadomani
PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA



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 CO₂ in condizioni supercritiche
- Estratti di elevato valore contenenti sostanze per applicazioni nel settore cosmetico, nutraceutico e dei mangimi
- Valorizzazione delle biomasse esauste
- Riuso della CO₂ nei successivi processi estrattivi



Finanziato dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero dell'Università e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA

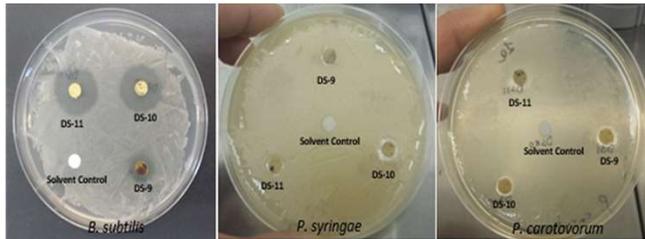


Background di ricerca – progetto VALUEMAG

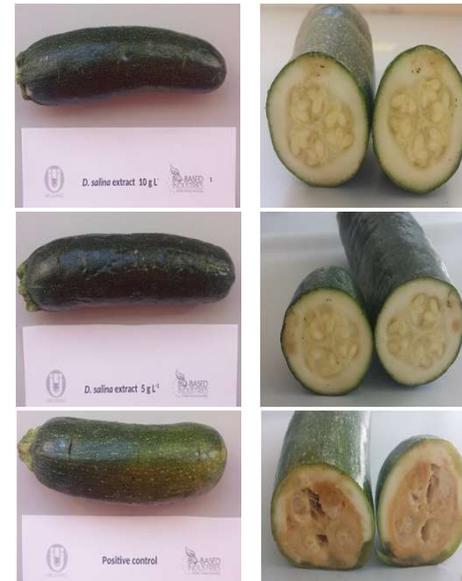


Progetto EU - H2020: VALUEMAG - Valuable products from algae using new magnetic cultivation and extraction techniques – Grant Agreement ID:745695

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 CO₂ 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 CO₂ 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.

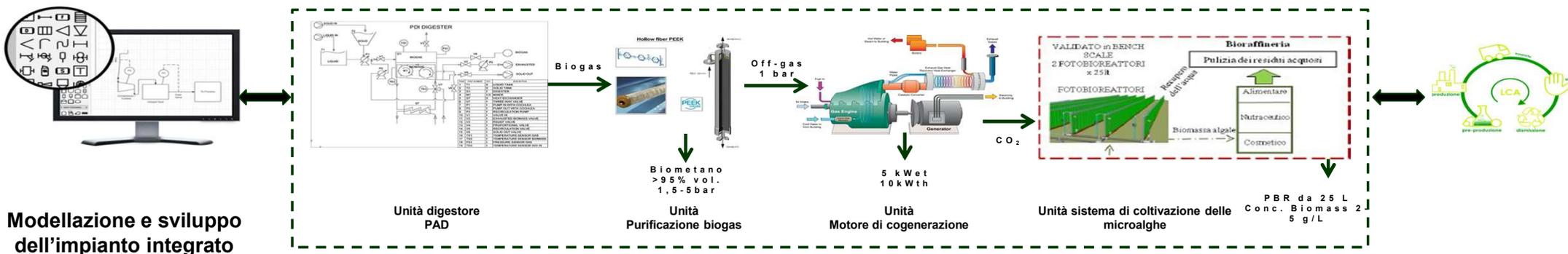
ECOENERGY

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

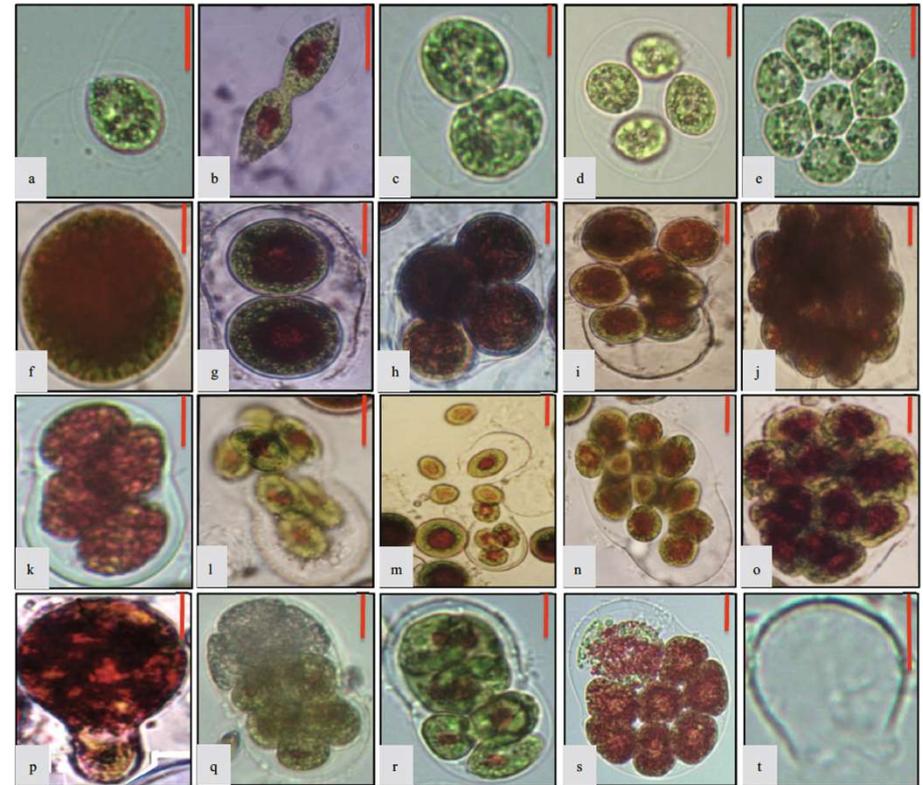
m) Rilascio delle zoospore che diventeranno future cellule mobili

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.

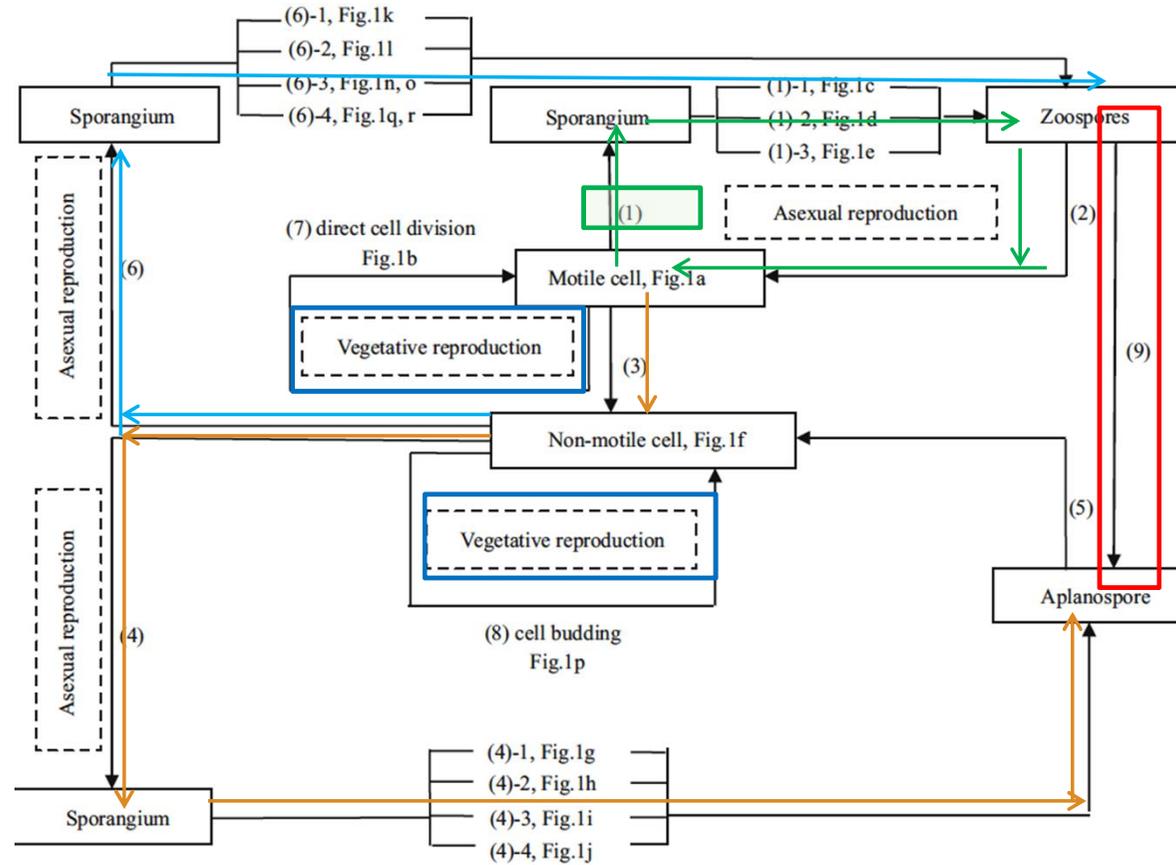


Meccanismo di divisione cellulare occasionale (divisione vegetativa)

Condizioni favorevoli

Condizioni sfavorevoli

Condizioni adatte



Condizione di stress



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca

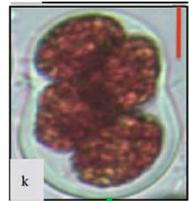


Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

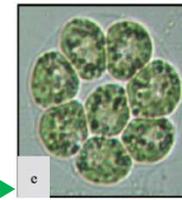


Haematococcus pluvialis – ciclo di vita

In condizioni di crescita favorevole,
H. pluvialis produce zoospore



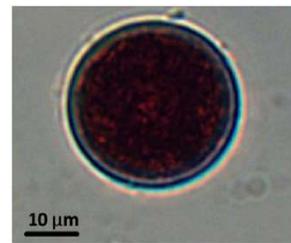
In condizioni non favorevoli
produce aplanospore



Condizioni di stress

Cellule mobili

Condizioni di
favorevoli



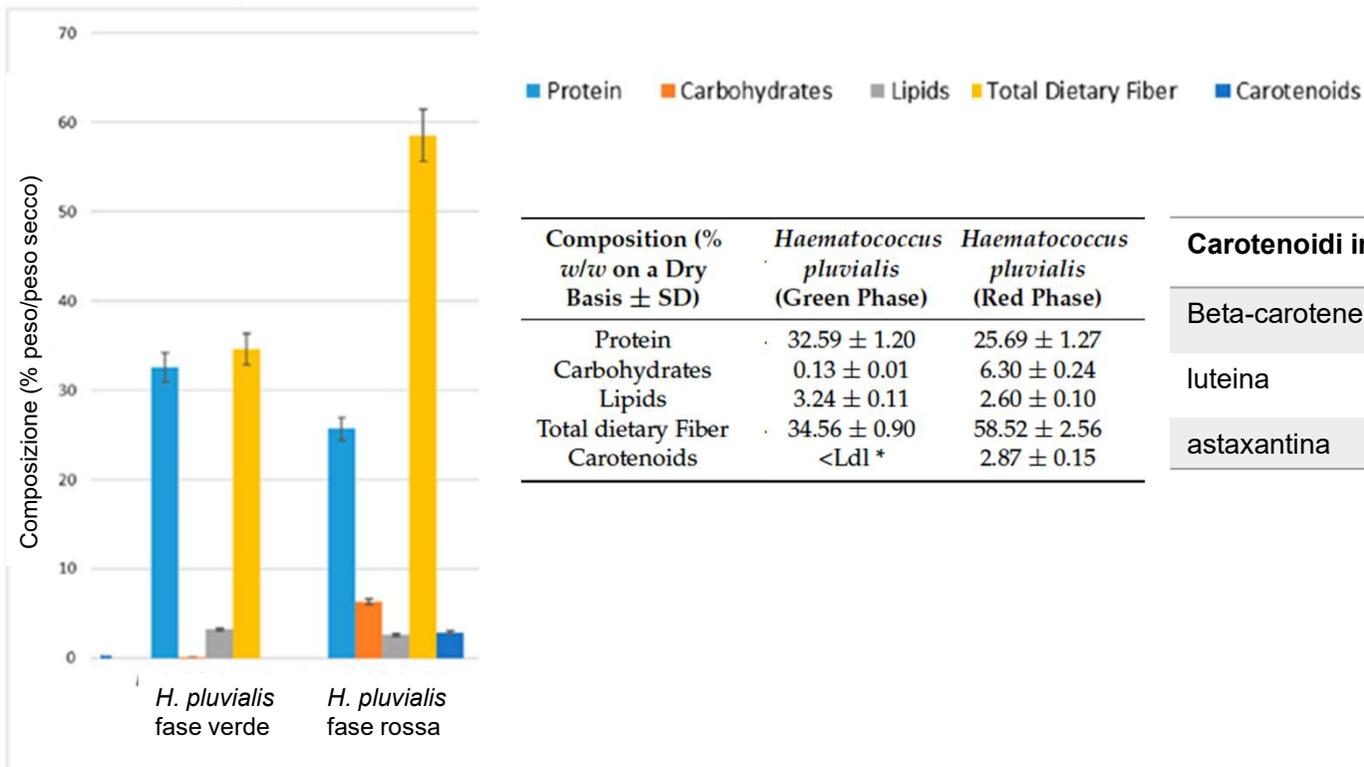
Aplanospora che accumula astaxantina
(condizioni di stress)

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.



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



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



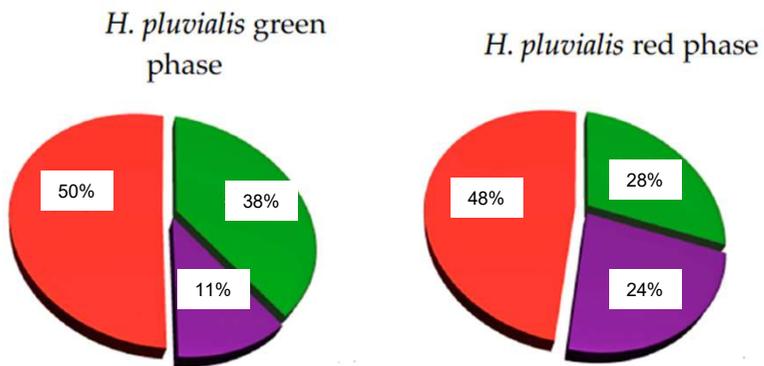
Ministero
dell'Università
e della Ricerca



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



Finanziato dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero dell'Università e della Ricerca

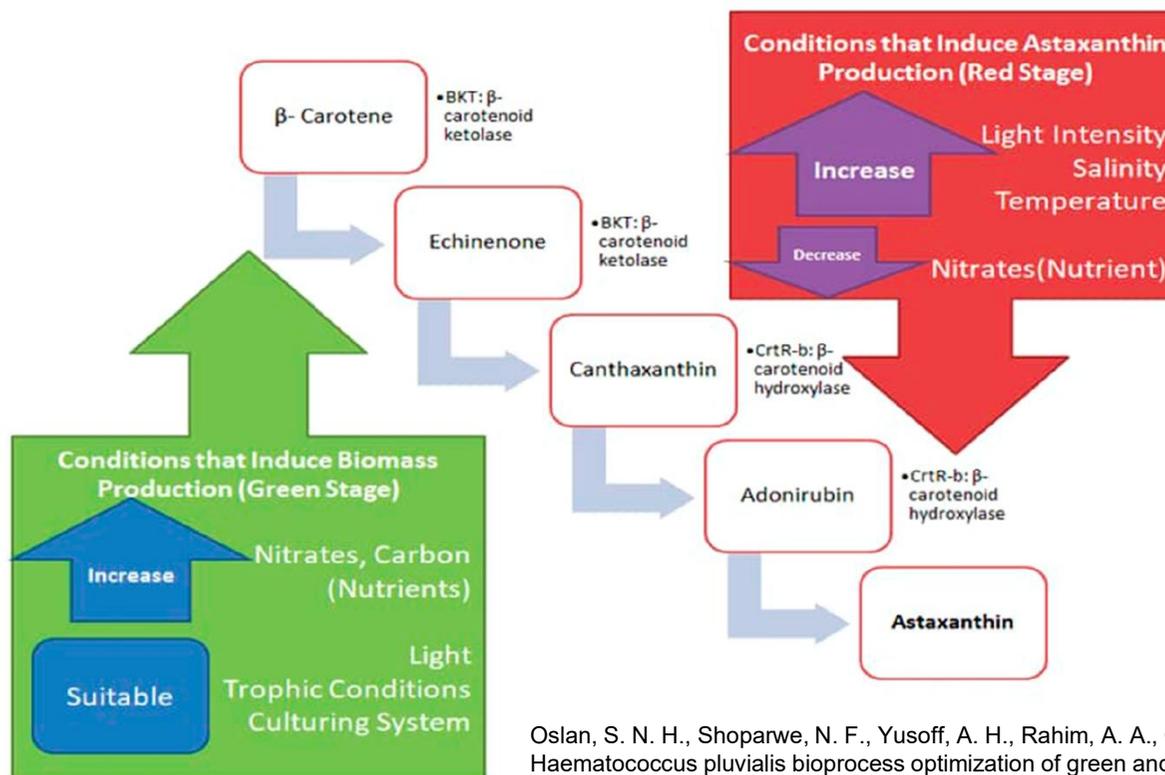


Italiadomani

PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA



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)

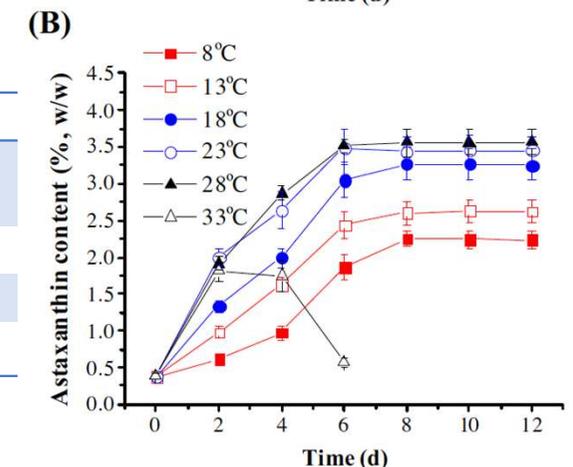
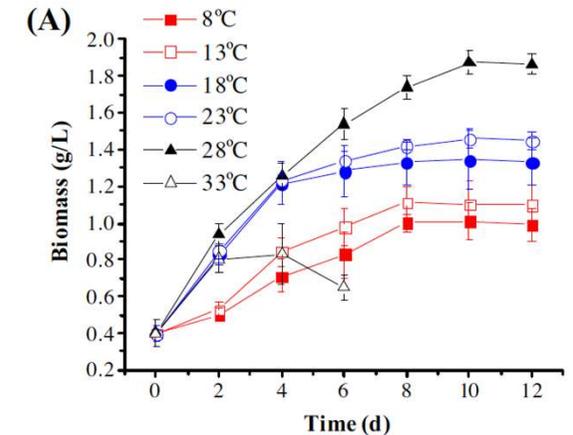
Le migliori concentrazione della microalga sono state ottenute nell'intervallo di temperatura 18 - 28 °C

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



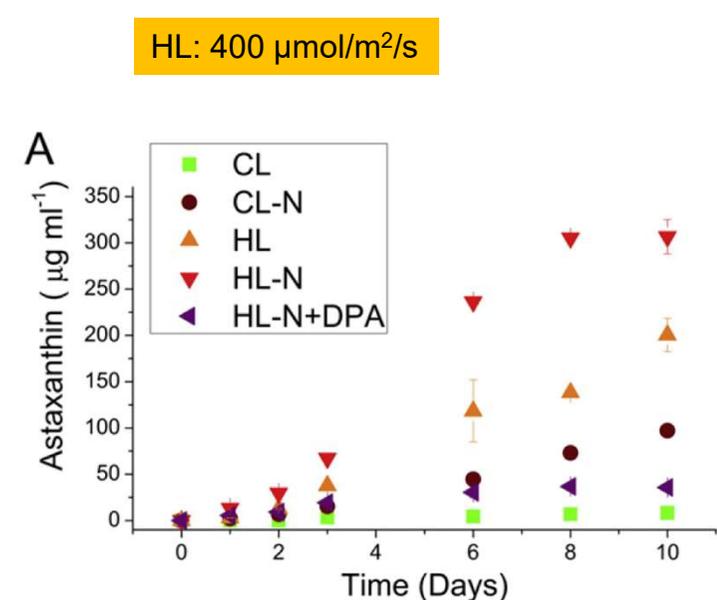
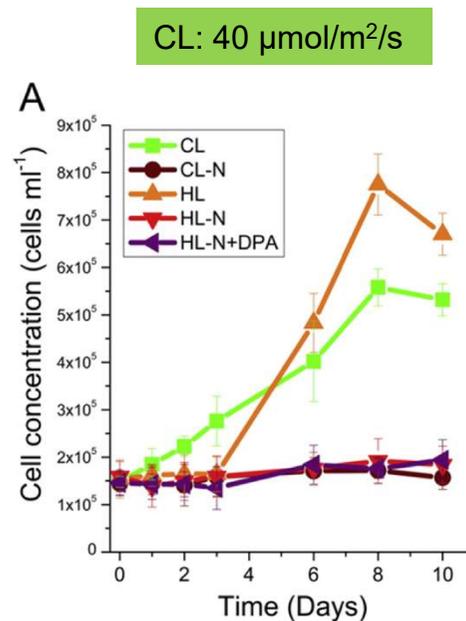
Italiadomani
PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA



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



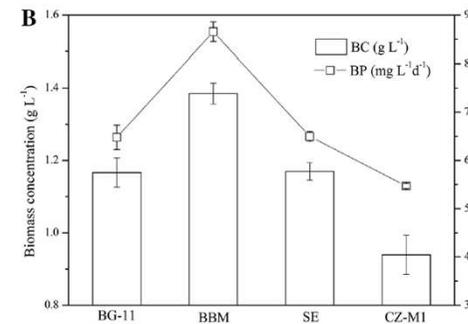
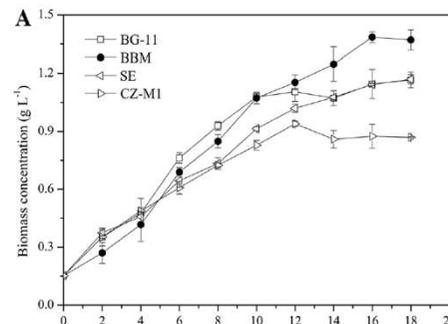
Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



Mezzo di crescita più idoneo per la produzione dell'astaxantina

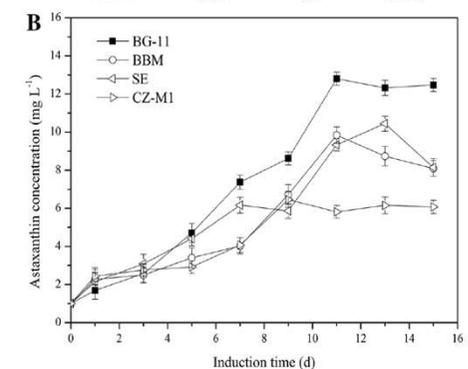
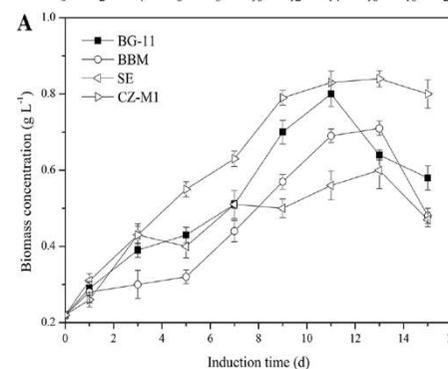
Table 1 The compositions of various freshwater algal culture media

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



30 µmol m⁻² s⁻¹

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



100 µmol m⁻² s⁻¹

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	β-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 ± 2.7	na	na	Na	[61]
16,200	4	30	~7	9.27 ± 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 ^{1,2}, Neeta Sharma ³, Angela Iovine ^{1,2}, Patrizia Casella ², Tiziana Marino ¹, Vincenzo Larocca ³, Antonio Molino ² and Dino Musmarra ^{1,*}

¹ 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.)

² 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.)

³ 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/m²
- 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

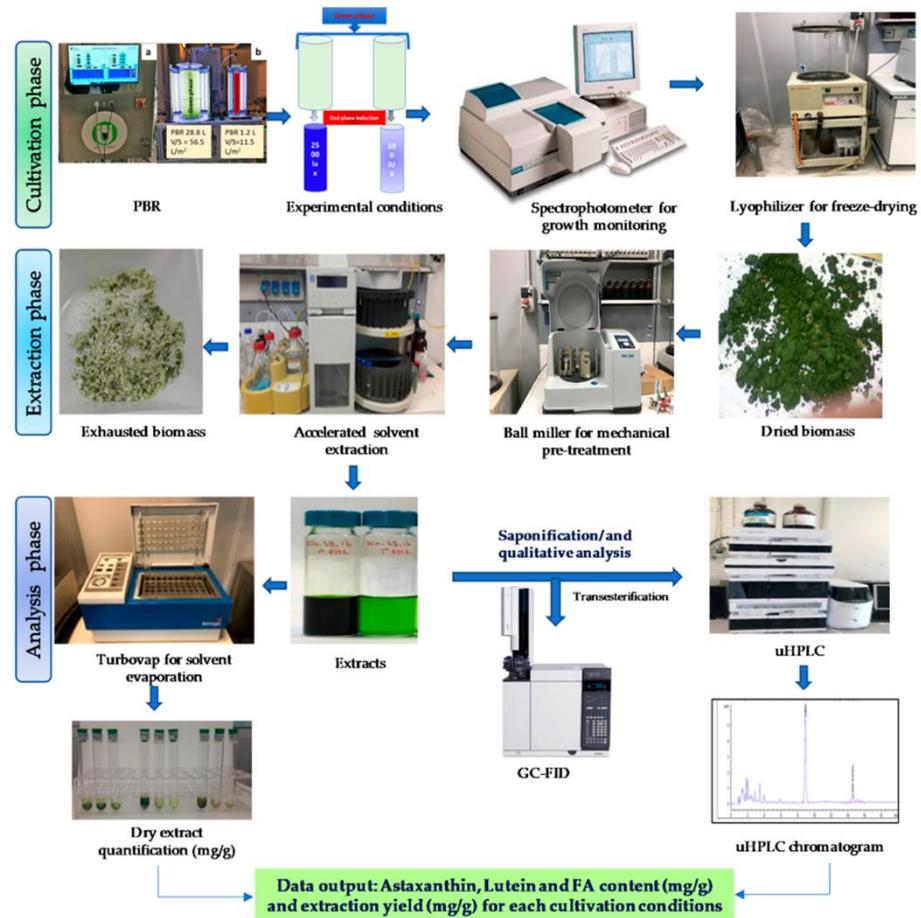


Disegno sperimentale

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



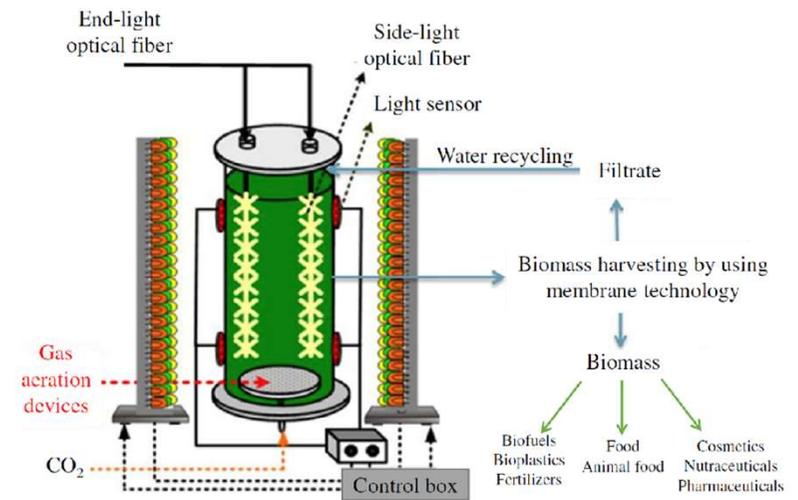
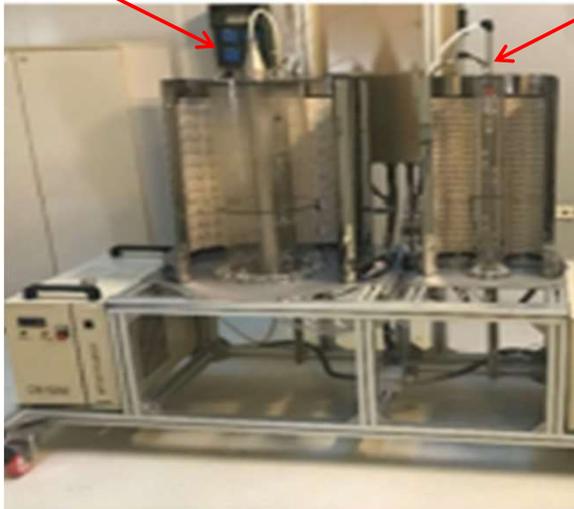
Schema dell'impianto

PBR

Altezza = 680 mm;
Diametro esterno = 250 mm;
spessore = 10 mm
Rapporto volume superficie (V/S)=
56.5 L/m².

PBR

Altezza = 680 mm;
Diametro esterno = 60 mm;
spessore = 10 mm
Rapporto volume superficie (V/S)=
11.5 L/m².



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

SUS-MIRRI.IT

Mezzo di crescita

Mezzo di crescita (BG-11) Concentrazione elementi

Na_2EDTA (2.7×10^{-9} mM),
 NaNO_3 (1.8×10^{-5} mM),
 K^2HPO_4 (2.3×10^{-7} mM),
 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (6.2×10^{-7} mM),
 $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (2.4×10^{-7} mM),
 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (3.12×10^{-8} mM),
 $\text{C}_6\text{H}_8\text{FeNO}_7$ (2.29×10^{-8} mM),
 Na_2CO_3 (1.89×10^{-7} mM)

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

H_3BO_3 (4.63×10^{-5} mM),
 $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (9.15×10^{-6} mM),
 $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (7.72×10^{-7} mM),
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (1.89×10^{-6} mM),
 $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (3.16×10^{-7} mM),
 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (1.70×10^{-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/m²/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):

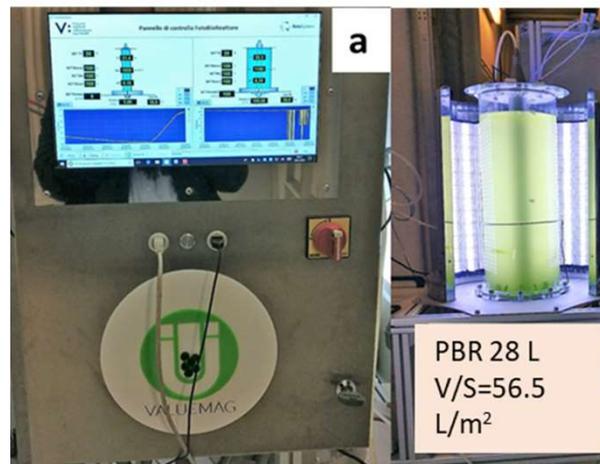
4000

Intensità
(mol photons/m²/s):

100

Flusso ml/min

300





Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



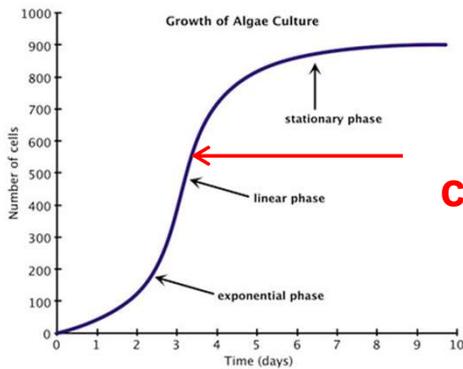
Ministero
dell'Università
e della Ricerca



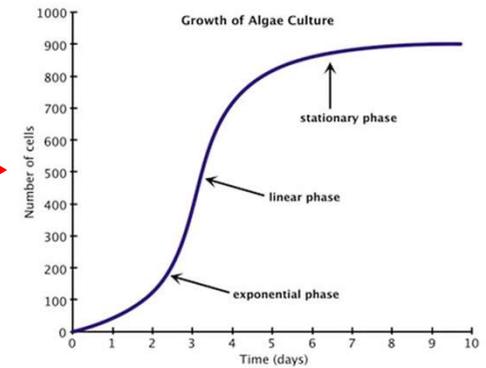
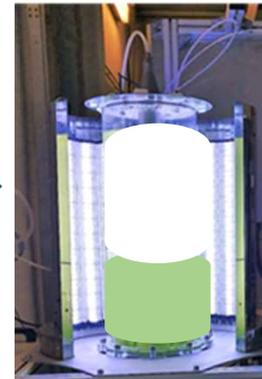
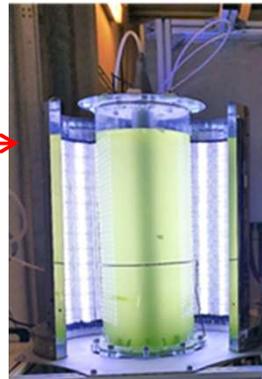
Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



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

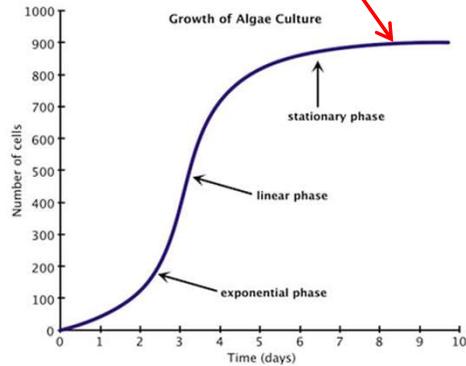
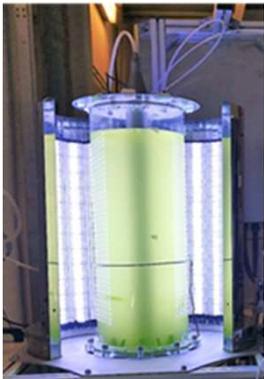


Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

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/m²) al fotobioreattore da 1.2 L (V/S 11.5 L/m²)

Nel fotobioreattore da 1.2 L (V/S 11.5 L/m²) 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



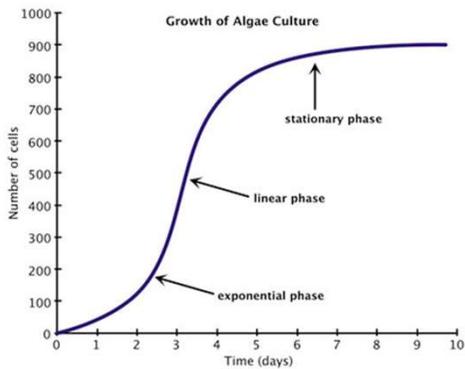
Ministero dell'Università e della Ricerca



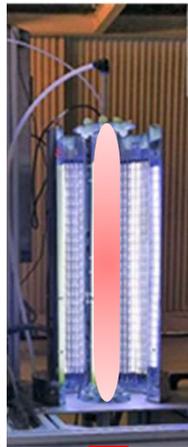
Italiadomani
PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA



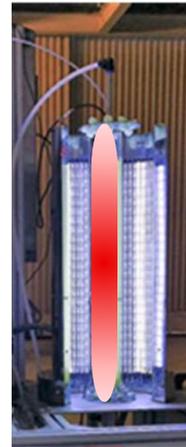
Disegno sperimentale – FASE ROSSA



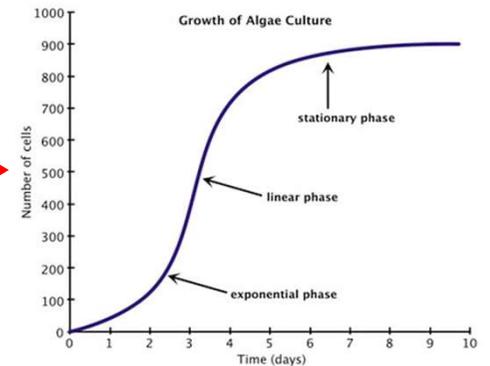
Monitoraggio della crescita all'intensità di 500 lux



versus



Raccolta biomassa prodotta



Monitoraggio della crescita all'intensità di 2500 lux



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

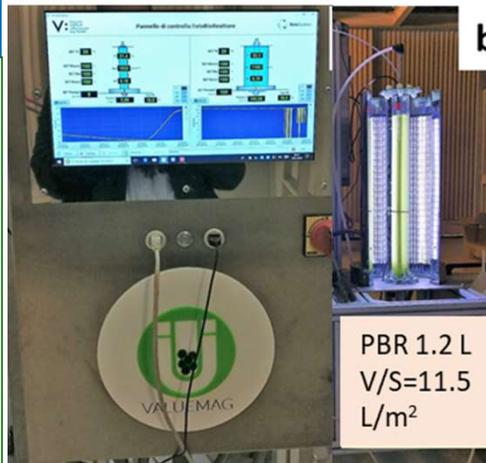
pH: 7.5-8.5

Flusso ml/min 300

Luce: Blu

Intensità
(lux sulla superficie): 500

Intensità
(mol photons/m²/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/m²/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*

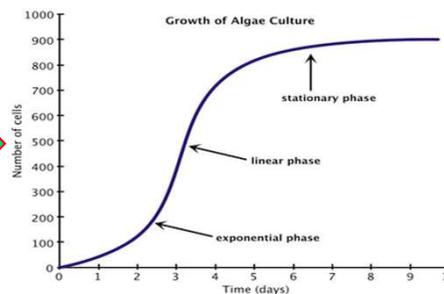
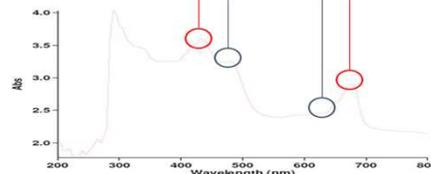


Coltura *H. pluvialis*



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>

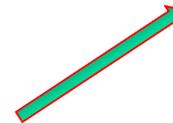
Misura della crescita della microalga



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



H. pluvialis
biomassa umida



*Haematococcus
pluvialis*
biomassa secca

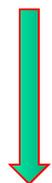


Estrazione accelerata con
solvente



Contenuto di carotenoidi
e acidi grassi

Resa estrattiva



Filtrato



Misura cationi ed anioni tramite Dionex ICS-1100



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani

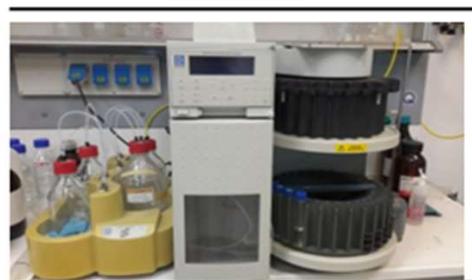
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



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

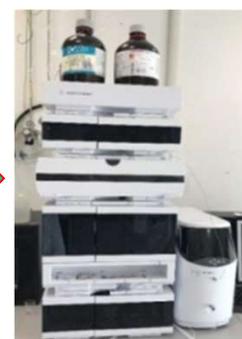
H. pluvialis biomassa secca



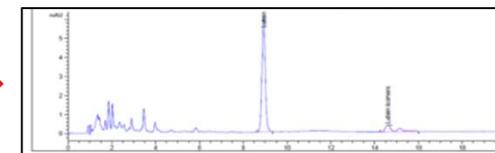
Agilent GC-FID per l'analisi degli
acidi grassi



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



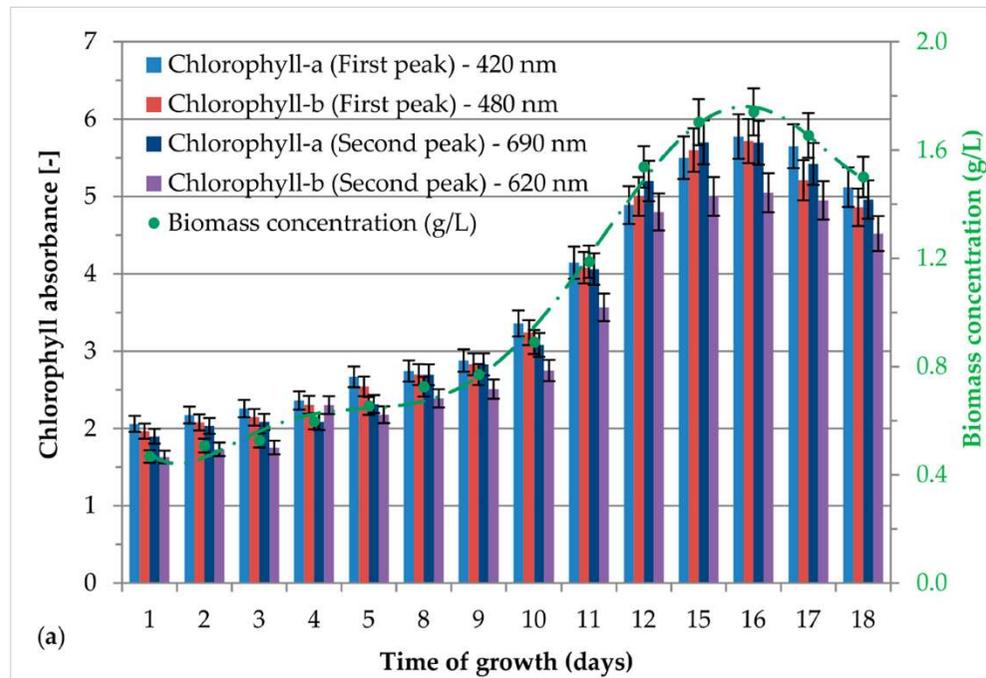
Ministero
dell'Università
e della Ricerca



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/m²

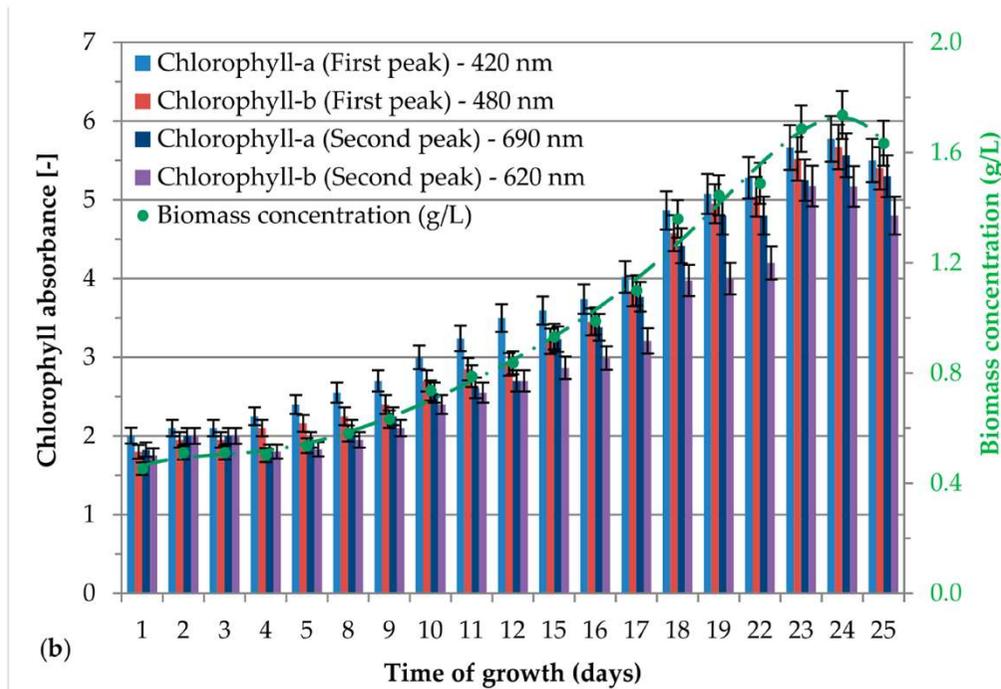


- L'andamento della curva di crescita della biomassa (g/L) riflette l'andamento delle clorofille alle diverse lunghezze d'onda di assorbimento
- La curva di crescita è costituita da una fase esponenziale da 0 a 9 giorni (9 giorni), fase lineare da 9 a 16 giorni (5 giorni), fase stazionaria/declino da 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/m²



- 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/m²

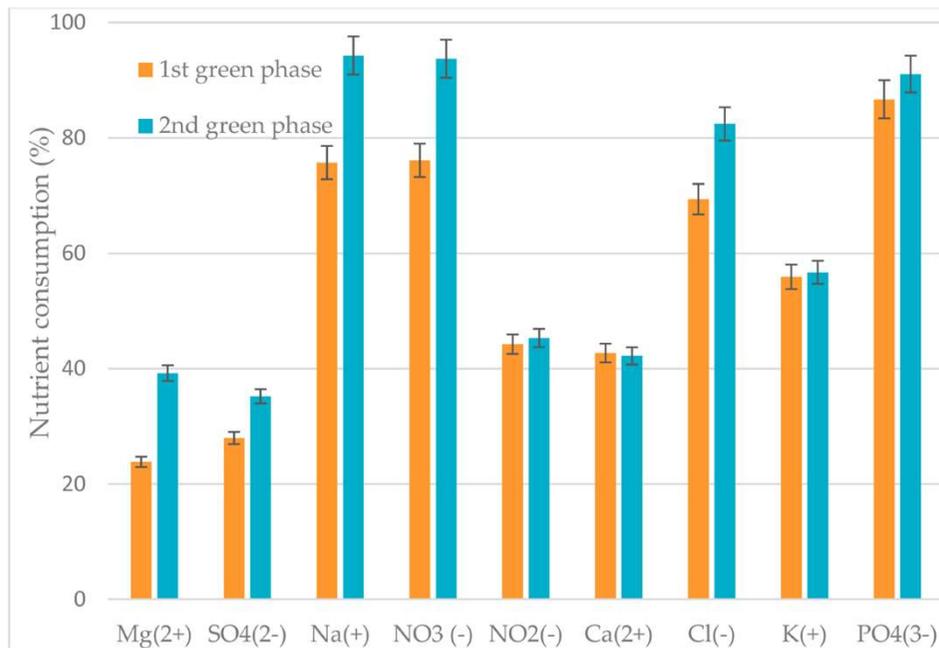


Tabella: concentrazione (mM) e quantità (mg) iniziale nella prima fase 1°-GP e nella 2° -GP

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



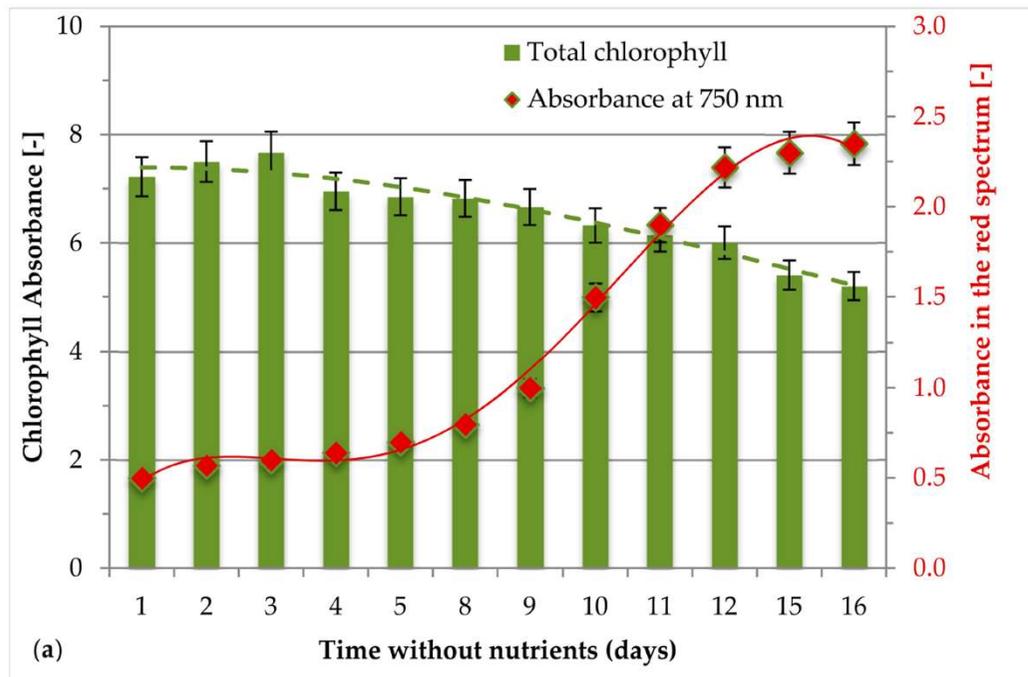
Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



Assorbanza della clorofilla durante la fase rossa a 2500 lux (280 mol/s/m²) 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



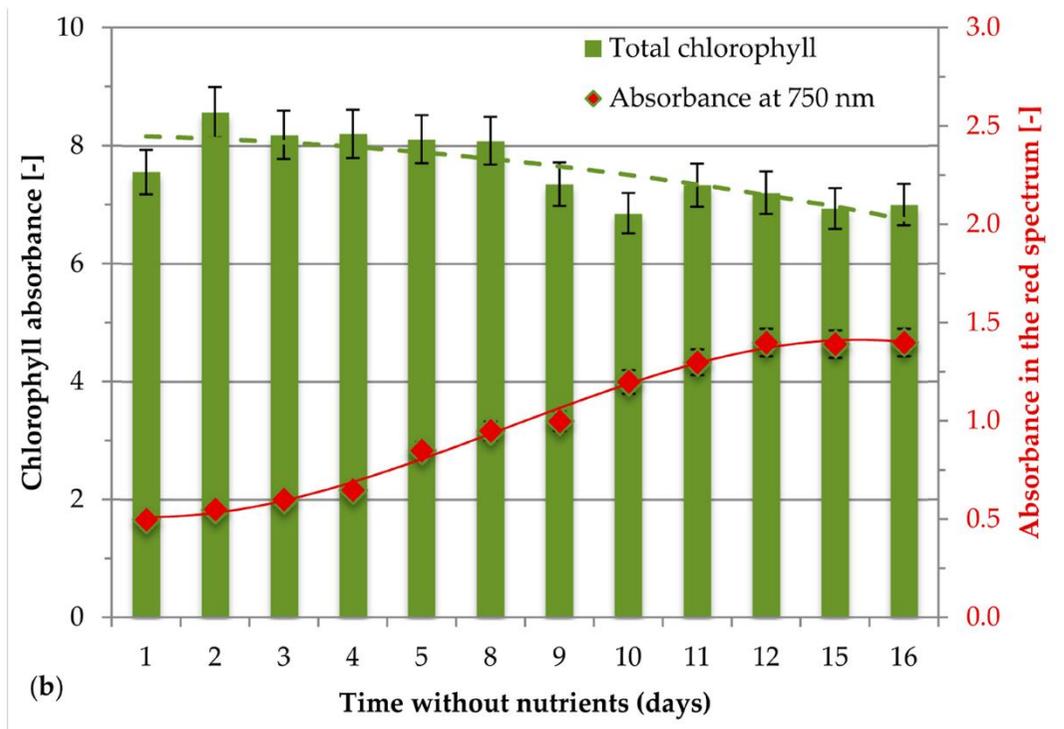
Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



Assorbanza della clorofilla durante la fase rossa a 500 lux (55 mol/s/m²) 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



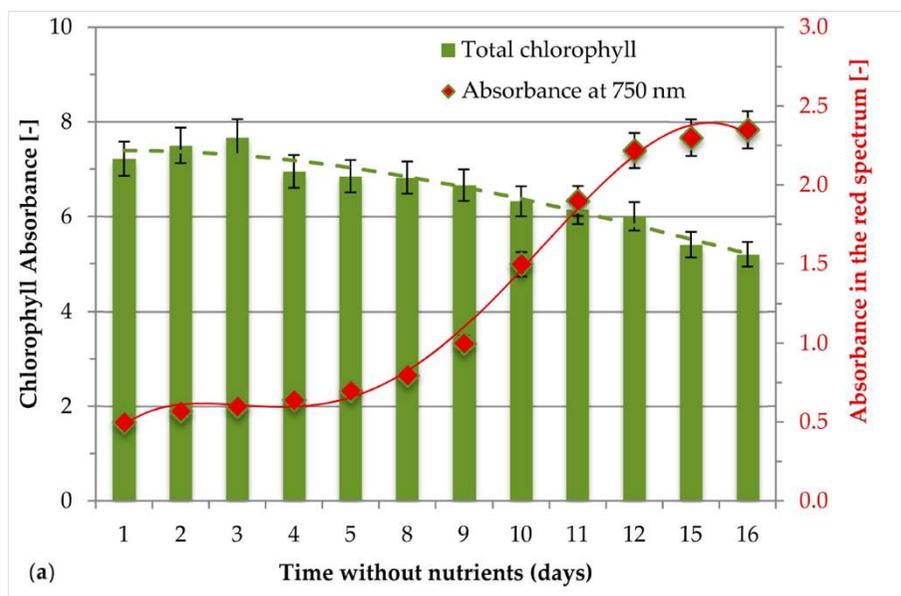
Italiadomani

PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA

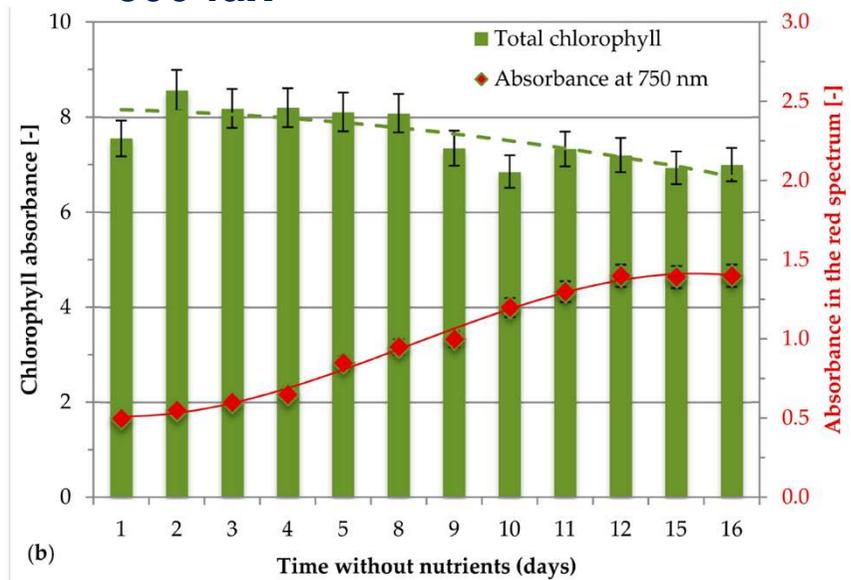


Confronto dell'andamento crescita tra i due stadi di fase rossa

2500 lux



500 lux





Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca

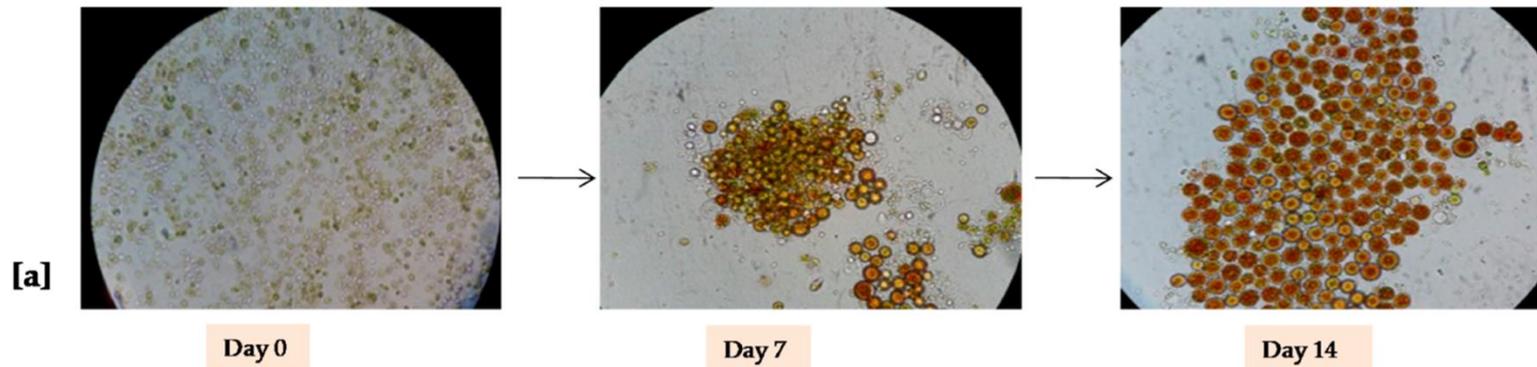


Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

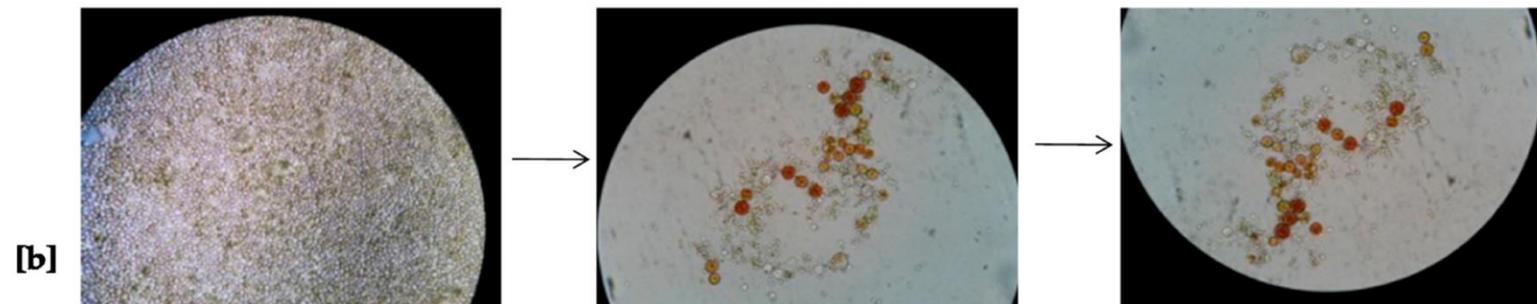
SUS-MIRRI.IT

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

2500 lux



500 lux





Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca

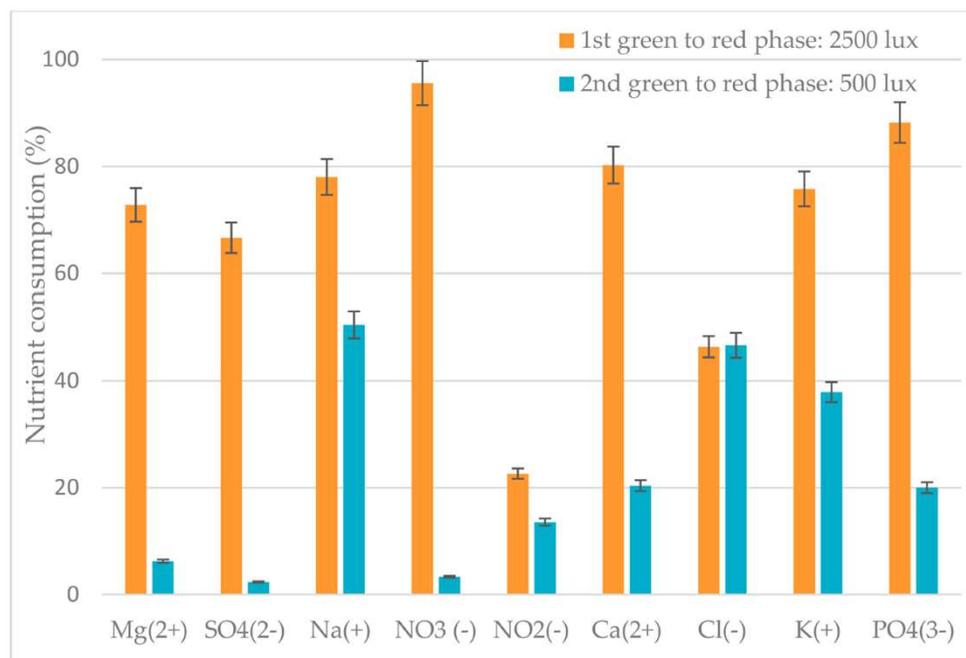


Italiadomani

PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



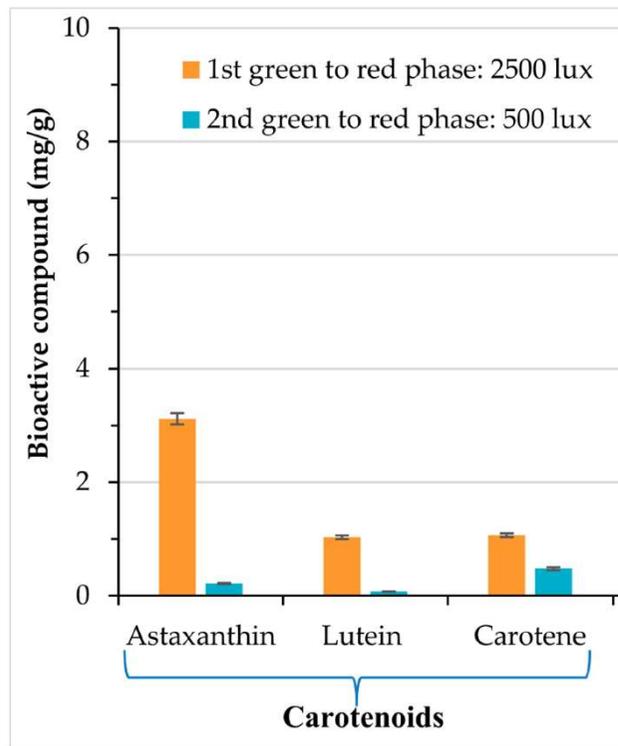
Consumo dei nutrienti nelle due stadi di crescita in fase rossa



- 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%



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



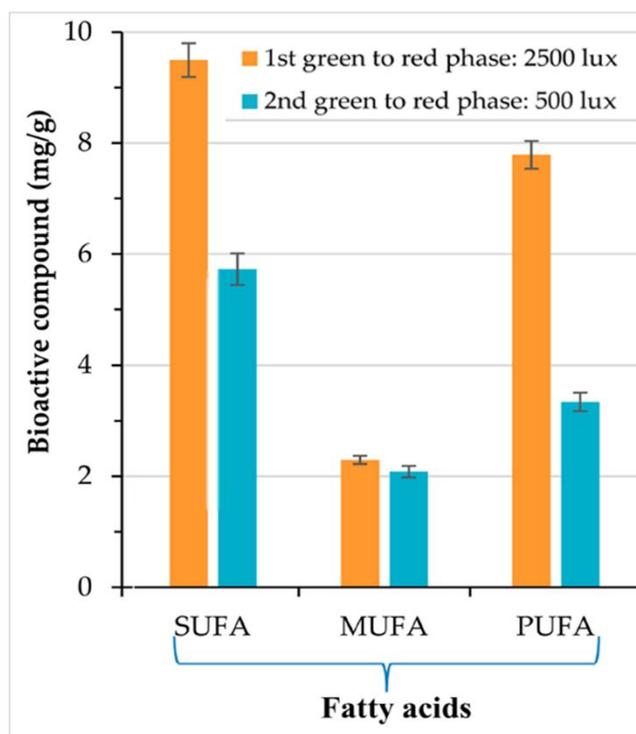
Ministero
dell'Università
e della Ricerca



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

SUS-MIRRI.IT

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