



Consiglio Nazionale delle Ricerche

ISMAR - Istituto di Scienze Marine
Sede di Lesina



Short-Term Mobility Program 2009

Relazione Scientifica Finale

*“Valorization of microalgae biomass as a source of
bioactive and high-value products”*

Svolto presso:

Chemical Engineering Department

University of Almería (Spain).

9 -30 Maggio 2009

Tutor presso l’Ente ospitante: Prof. **Emilio MOLINA GRIMA**

Il Proponente
Dr. Pasquale TROTTA

Il Fruitore
Dr. Matteo FRANCAVILLA

1. PREMESSA

Le attuali applicazioni dei composti chimici isolati da diverse classi di alghe sono innumerevoli.

Lo studio di questi organismi per scopi farmaceutici ha rivelato importanti prototipi chimici per la scoperta di nuovi principi attivi, stimolando così l'uso di sofisticate tecniche fisiche e la sintesi di nuovi composti con applicazioni biomediche. Le alghe, inoltre, sono organismi interessanti per la produzione di nuove sostanze biologicamente attive e di composti essenziali per la nutrizione umana (Tringali, 1997; Burja et al., 2001; Mayer and Hamann, 2004; Del Rio et al., 2007).

Tra i vari esponenti scientifici internazionali, il Professor Emilio Molina Grima, Direttore del Dipartimento di Ingegneria Chimica dell'Università di Almería, con il suo staff, è senza dubbio uno dei più autorevoli esperti nel settore delle produzioni microalgali con fotobioreattori e nella valorizzazione di queste biomasse mediante estrazione di Fine Chemicals.

Con questo soggiorno di studio si sono voluti perseguire i seguenti obiettivi: implementare le conoscenze relative alle tecniche di produzione microalgale in fotobioreattori a diversa scala, ed acquisire nuove nozioni relative alle tecniche di estrazione ed analisi di Fine Chemicals da microalghe.

In particolare è stata presa visione di diverse tipologie di sistemi di produzione microalgali messi a punto dal gruppo di ricerca ospitante ed è stata effettuata attività di laboratorio finalizzata all'estrazione ed analisi di steroli, ficobiliproteine ed acido eicosapentenoico (EPA) da matrici microalgale con tecniche cromatografiche e strumentali innovative.

2. INTRODUZIONE

Il primo utilizzo delle microalghe da parte dell'uomo risale a circa 2000 anni fa ad opera dei Cinesi che utilizzarono *Nostoc* per sopravvivere alle carestie. Altre specie microalgali come *Arthrospira (Spirulina)* e *Aphanizomenon* sono state utilizzate come alimento per centinaia di anni (Jensen et al., 2001; Spolaore et al., 2006). Tuttavia la coltivazione di microalghe è cominciata solo qualche decina di anni fa. (Borowitzka, 1999)

All'inizio degli anni 50 l'aumento della popolazione mondiale e la previsione di un'insufficiente disponibilità di proteine portò alla ricerca di nuove alternative e non-convenzionali fonti di proteine. La biomassa algale sembrò essere a quei tempi un buon candidato per questo impiego (Becker, 2004; Cornet, 1998). Nel frattempo, ebbe inizio un

sistematico screening di alghe per l'individuazione di sostanze biologicamente attive, in particolare di antibiotici (Borowitzka, 1995).

L'interesse nell'applicazione di colture algali continuò con gli studi dell'impiego delle alghe come scambiatori fotosintetici di gas per i viaggi nello spazio (Borowitzka, 1999). Negli USA furono incrementate le tecnologie ambientali finalizzate al miglioramento della qualità delle acque reflue e alla fermentazione della risultante biomassa per la produzione di metano.

La coltivazione commerciale su larga scala partì agli inizi degli anni 60 in Giappone con la coltivazione di *Chlorella* (Muller-Feuga, 1996; Borowitzka, 1999; Iwamoto, 2004). Agli inizi degli anni 70 seguì l'installazione di un impianto per la raccolta e coltivazione di *Arthrospira* nel lago Texcoco (Messico) (Muller-Feuga, 1996; Borowitzka, 1999).

A partire dagli anni 80, furono installati in Asia 46 impianti di produzione su larga scala in grado di produrre più di 1000 kg di microalghe (principalmente di *Chlorella*) al mese. La produzione commerciale di *Dunaliella salina*, come fonte di β -carotene, divenne la terza principale industria di microalghe nel 1986 in Australia. Successivamente seguirono altri impianti commerciali in Israele e negli USA. Analogamente a quanto accaduto per le microalghe, si è verificato anche per i cianobatteri. La produzione su larga scala di cianobatteri ha avuto inizio in India. Recentemente, sono stati installati diversi impianti di produzione di *Haematococcus pluvialis*, come fonte di astaxantina, in USA e Australia. Pertanto, in un breve periodo di circa 30-40 anni, l'industria biotecnologia industriale per le microalghe si è significativamente sviluppata e diversificata.

2.1 Composizione chimica delle microalghe.

Le microalghe sono in grado di aumentare il contenuto nutrizionale degli alimenti convenzionali e quindi sono in grado di generare effetti benefici sulla salute umana ed animale. Ciò è dovuto alla loro particolare composizione chimica.

L'elevato contenuto proteico di varie specie microalgali è una delle principali ragioni per cui considerare questi vegetali come fonte non convenzionale di proteine (Cornet, 1998; Soletto et al., 2005). In oltre, la composizione amminoacidica della maggior parte delle microalghe è comparabile con quella di altri alimenti. Essendo queste cellule in grado di sintetizzare tutti gli amminoacidi, esse possono fornire quelli essenziali all'uomo e agli animali (Guil-guerrero et al., 2004). Altra componente importante sono i carboidrati che, nelle microalghe, possono essere presenti come amido, glucosio, zuccheri o altri polisaccaridi. La loro completa digeribilità fa sì che le microalghe possano essere utilizzate seccate senza limitazione negli alimenti o mangimi (Becker, 2004). La media del contenuto lipidico delle cellule algali varia tra 1% e 70%, ma può

raggiungere anche 90% del peso secco in particolari condizioni (Metting, 1996). I lipidi algali sono costituiti da glicerolo, zuccheri o basi esterificate con acidi grassi saturi ed insaturi (da 12 a 22 atomi di C). Fra tutti gli acidi grassi nelle microalghe, alcuni sono di particolare importanza, come gli acidi grassi della famiglia degli ω -3 e ω -6. La quantità assoluta e relativa degli acidi grassi può essere influenzata da fattori nutritivi ed ambientali (Borowitzka, 1988; Tzonvenis et al., 2003).

Le microalghe costituiscono anche una valida fonte di vitamine essenziali (per es.: A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, E, nicotinato, biotina, acido folico e acido pantotenico) (Becker, 2004). La presenza di vitamine aumenta il valore nutrizionale delle cellule algali, ma la loro quantità varia in funzione dei fattori ambientali, del processo di raccolta e di essiccazione delle cellule (Brown et al. 1999; Borowitzka, 1988).

Le microalghe sono anche ricche di pigmenti come la clorofilla (0.5-1% del peso secco), carotenoidi (mediamente 0.1-0.2% del peso secco e più del 14% per il β -carotene nella *Dunaliella*) e ficobiliproteine. Tutte queste molecole hanno un ampio range di applicazioni commerciali.

Pertanto la particolare composizione chimica rende le microalghe particolarmente interessanti per l'uso in ambito nutrizionale umano ed animale.

3. STEROLI

Gli steroli sono uno dei più importanti costituenti chimici delle microalghe e uno dei principali componenti nutrizionali nella dieta degli organismi acquatici allevati (Fig.1). Le microalghe costituiscono un importante componente nella dieta dei principali idrobionti, specialmente dei bivalvi (Ponomarenko et al., 2004). La capacità dei bivalvi di sintetizzare e di bioconvertire gli steroli *ex novo* varia a seconda della specie, ma è generalmente bassa e a volte completamente assente. Ciò implica che l'assunzione di steroli attraverso la dieta è necessaria per la crescita dei bivalvi (Soudant et al., 1998).

I fitosteroli sono un gruppo unico di composti C₂₈ e C₂₉ in cui un gruppo extra metile o etile è addizionato al C₂₄ del colestano per azione enzimatica della metil sterol transferasi (Nes, 2000). Queste proprietà biochimiche dei fitosteroli sono specie specifiche, perciò servono sia come biomarkers chemotassonomici per distinguere membri di taxa algali, sia come criterio di scelta per l'utilizzo di microalghe per l'allevamento di bivalvi che hanno bisogno di una dieta con un certo contenuto di steroli (Park et al., 2002).

Le disfunzioni alle coronarie è uno dei principali problemi sanitari nei Paesi sviluppati. Diversi studi hanno dimostrato che elevate concentrazioni nel siero di colesterolo totale o di low-

density-lipoprotein colesterolo (LDL cholesterol) sono un elevato fattore di rischio, mentre alte concentrazioni di high-density-lipoprotein colesterolo (HDL cholesterol) o un basso rapporto LDL:HDL può avere effetto protettivo contro le disfunzioni delle coronarie. I fitosteroli hanno mostrato avere la capacità di ridurre la concentrazione totale di colesterolo e di LDL nell'uomo inibendo l'assorbimento di colesterolo a livello intestinale (Tapiro et al. 2003). Inoltre i fitosteroli possono influenzare la crescita cellulare e l'apoptosi di cellule tumorali.

In questo studio è stato effettuato l'estrazione, l'isolamento (mediante cromatografia su strato sottile) e l'analisi gas cromatografica associata a spettrometria di massa della frazione sterolica in tre ceppi algali, *Scenedesmus almeriensis*, *Muriellopsis sp.*, *Porphyridium cruentum*, ed una cianoficea, *Synechocystis aquatilis*.

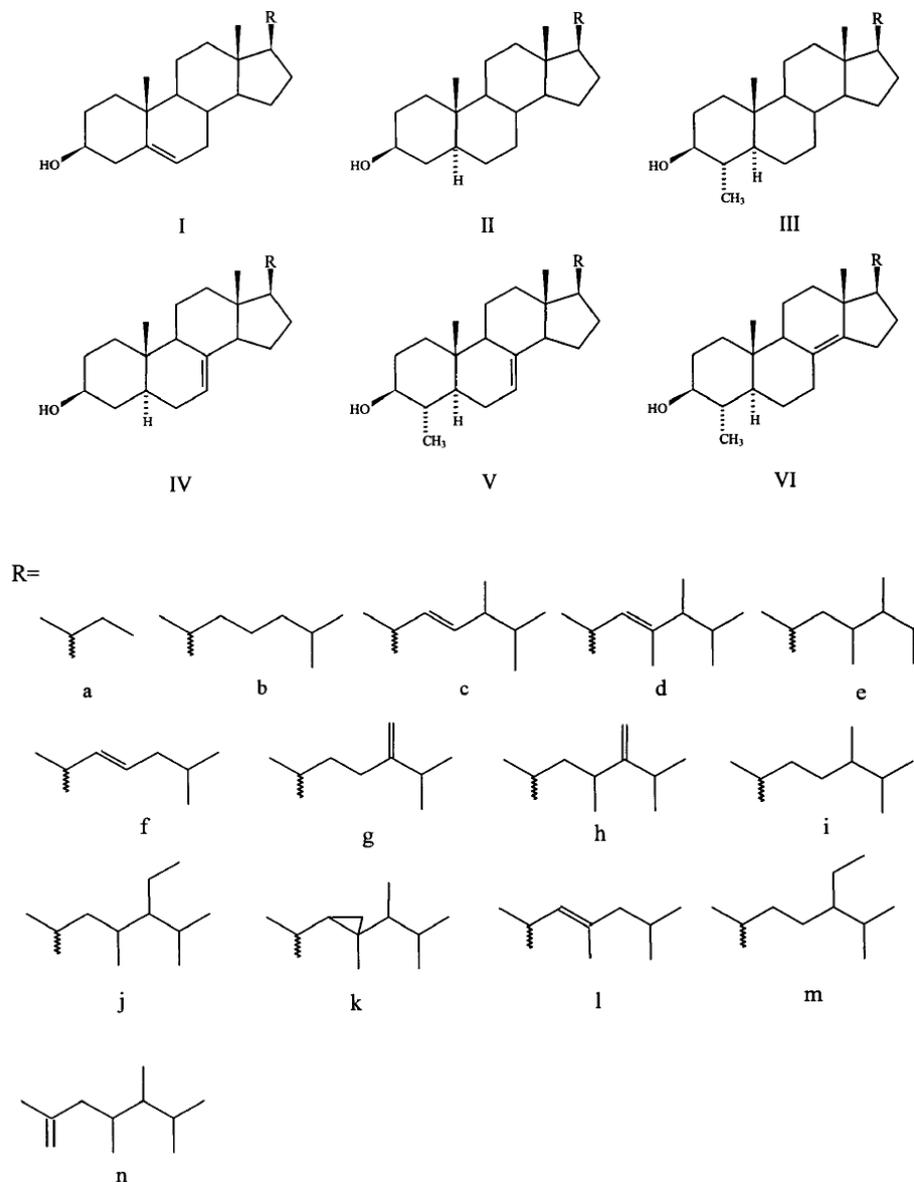


Fig.1: Alcuni steroli trovati in microalghe marine e di acqua dolce.

3.1 Estrazione della frazione lipidica totale

Circa 0.5g della biomassa liofilizzata di ogni specie microalgale erano omogenizzati per un minuto a 12000 rpm con 15 ml di miscela estraente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2:1) e successivamente centrifugati (4100 rpm per 5 minuti a 10°C). Questa miscela era in grado di estrarre la quasi totalità delle molecole organiche solubili contenute nel vegetale in quanto rappresentava un buon compromesso di polarità ed inoltre, avendo azione denaturante, impediva che durante il processo di estrazione potessero innescarsi attività enzimatiche che portassero alla produzione di metaboliti inizialmente assenti nel vegetale.

Il sovranatante (frazione lipidica) era raccolto in un imbuto separatore, mentre il corpo di fondo era riestratto per n volte fino a completa decolorazione delle frazioni di miscela estraente che venivano tutte riunite nell'imbuto. La fase organica era quindi lavata con 20 ml di brine, seccata su Na_2SO_4 anidro, filtrata ed evaporata sotto vuoto (Rotavapor). Il residuo oleoso verdognolo veniva pesato sotto atmosfera di N_2 , ridisciolti in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1) e conservato a -20°C .

3.2 Saponificazione ed estrazione della frazione insaponificabile

Un'aliquota della frazione lipidica totale era trattata con un eccesso di soluzione al 5% di KOH in $\text{MeOH} / \text{H}_2\text{O}$ (4:1) e tenuta a riflusso a 80°C per 2 ore. La componente lipidica insaponificabile era quindi estratta più volte con n-Esano. Le frazioni organiche erano riunite insieme, seccate su Na_2SO_4 anidro ed evaporate sotto vuoto. Il residuo oleoso di colore arancio scuro era pesato sotto atmosfera di N_2 , ripreso con CHCl_3 , e conservato a -20°C .

3.3 Isolamento di Steroli

Un'aliquota della frazione insaponificabile (≈ 20 mg) era seminata su una TLC di Gel di Silice preparativa (20x20 cm da $500 \mu\text{m}$ di spessore) e fatta eluire con n-Esano/Acetato di Etile 8:2. Dopo l'eluizione, venivano raccolte, lavorando in atmosfera di N_2 , le tre bande con R_f equivalenti a quelli degli standard di fitosteroli. La silice raccolta era tenuta in agitazione con un eccesso della miscela $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2:1) e quindi filtrata e lavata più volte con CHCl_3 . La frazione organica ottenuta era evaporata sotto vuoto, pesata sotto atmosfera di N_2 , disciolta in CHCl_3 e conservata a -20°C . La composizione della frazione fito-sterolica era successivamente determinata mediante analisi gas-cromatografica (GC-MS).

3.4 Risultati analitici preliminari

Porphyridium cruentum (UTEX 161)

Biomassa liofilizzata: 1.0006g al 50% di allumina (biomassa netta: 0.5003g)

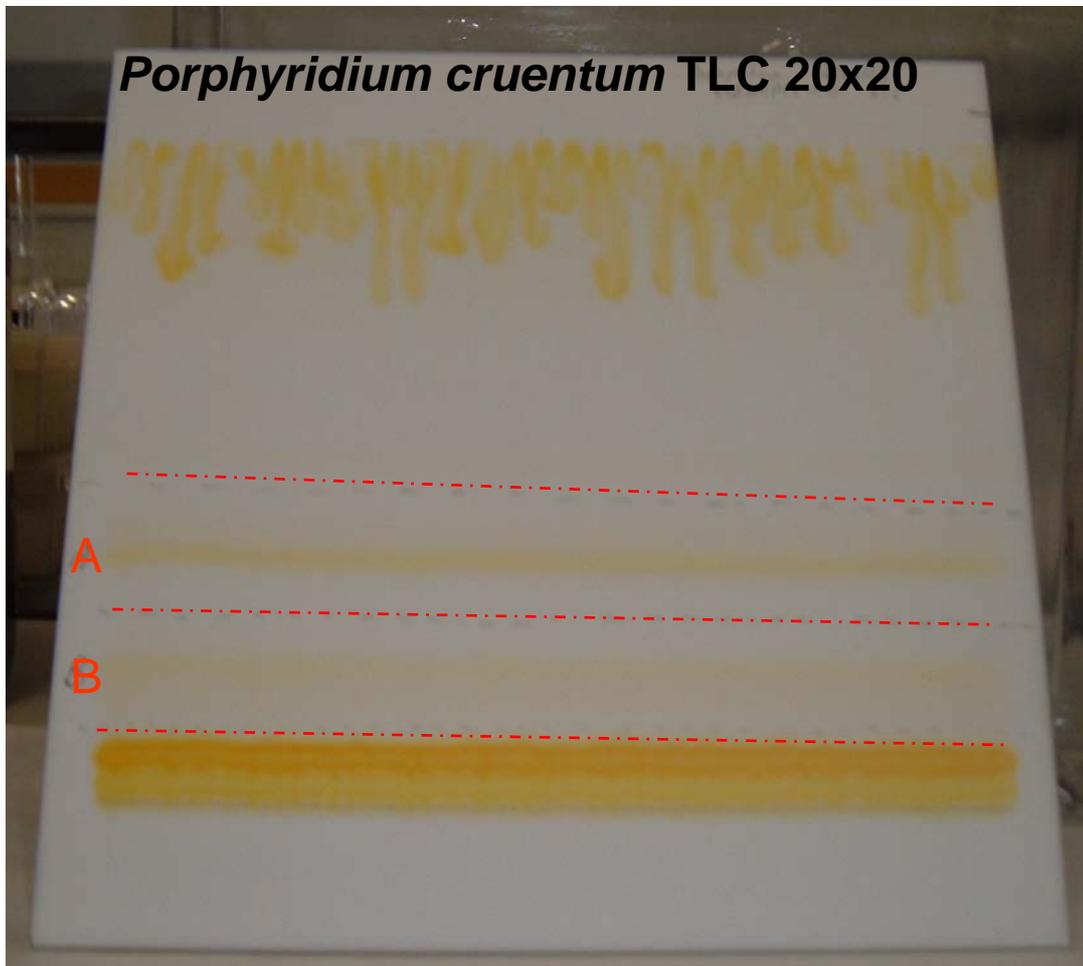
Lipidi totali: 0.0979g (19.57% dw)

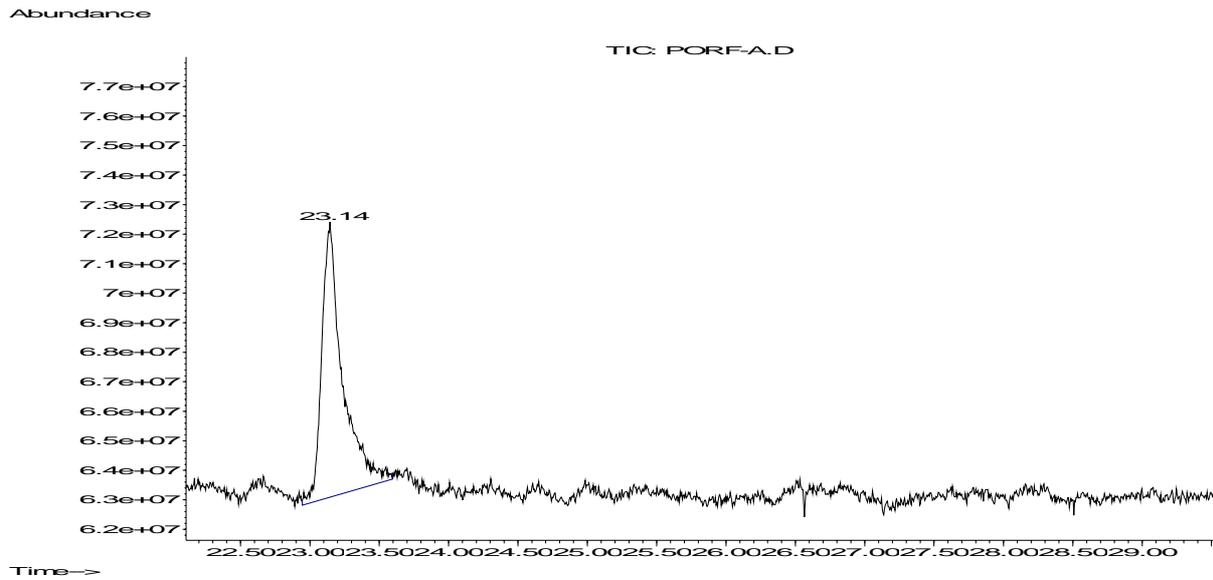
Insaponificabile: 0.017g (3.40% dw)

Insaponificabile seminato su TLC: 0.0087g (51.18% insaponificabile)

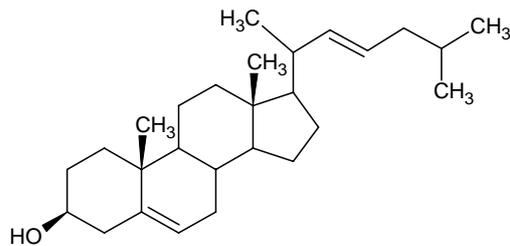
Steroli

Frazione A: 0.0024g (0.94% dw, 4.79% TL)





Peak	R.T	Perc.
1	23.144	100.0 %



Cholesta-5,22-dien-3 β -ol
22-Dihydrocholesterol

Scenedesmus almeriensis

Biomassa liofilizzata: 0.9970g al 50% di allumina (biomassa netta: 0.4985g)

Lipidi totali: 0.2452g (49.19% dw)

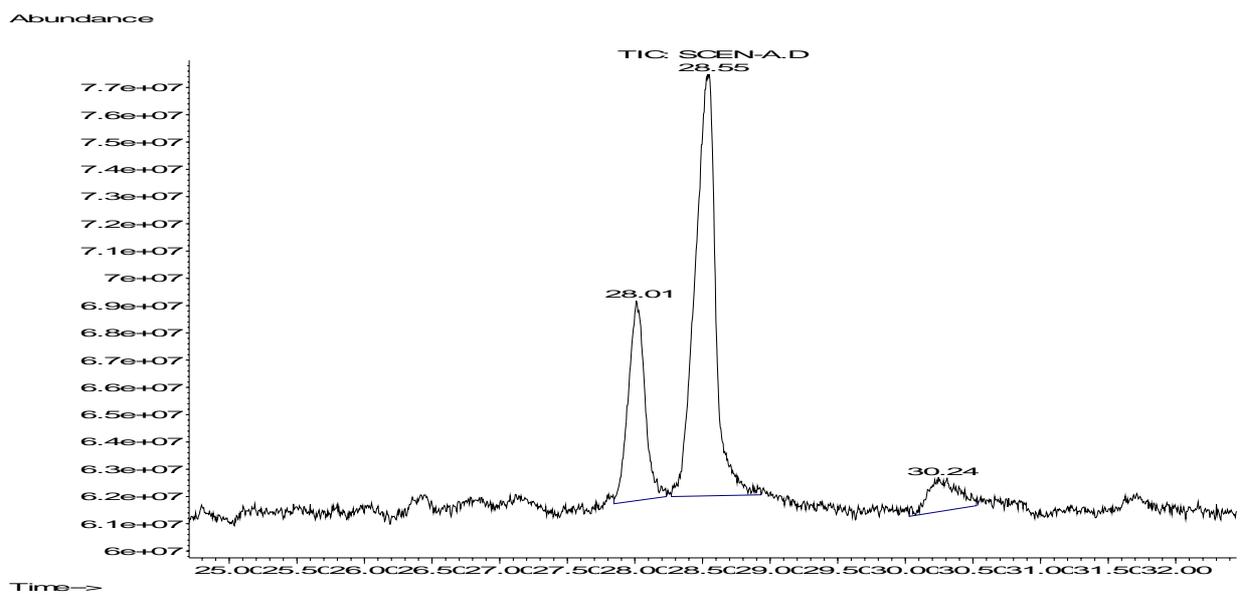
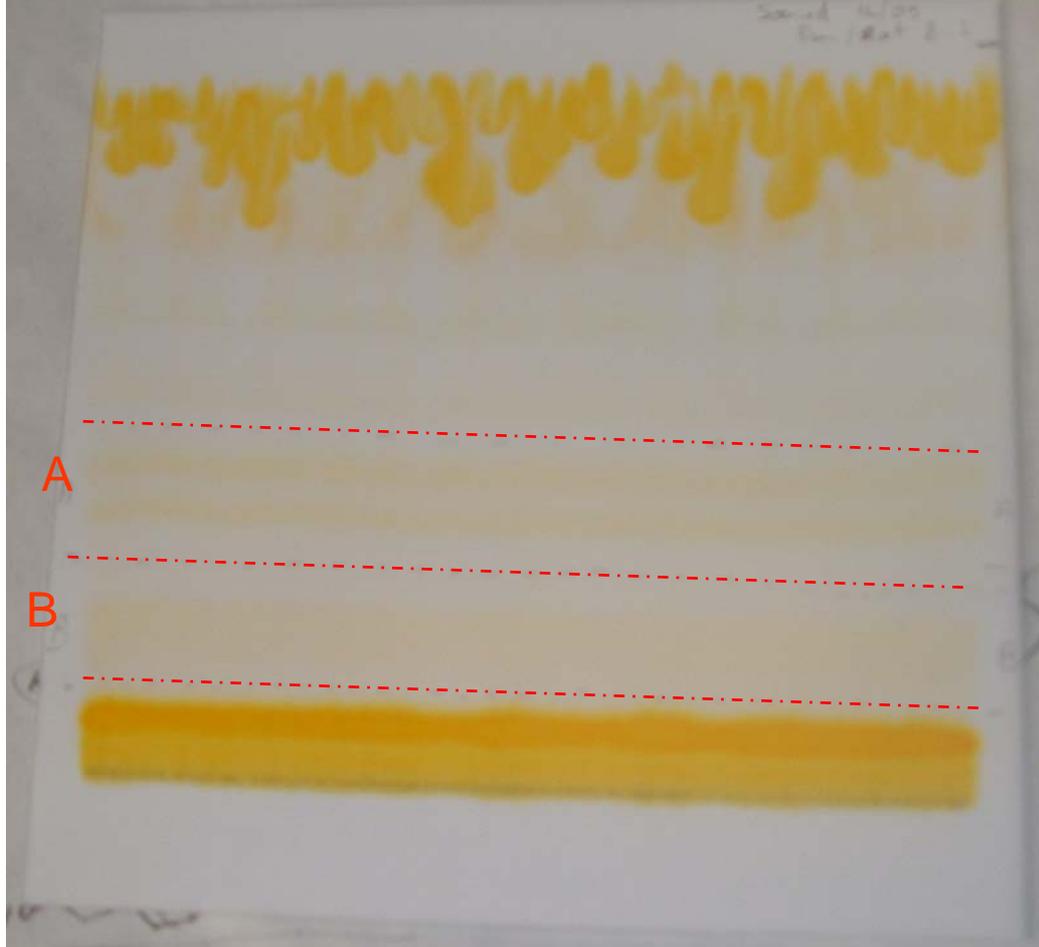
Insaponificabile: 0.0627g (12.58% dw)

Insaponificabile seminato su TLC: 0.0314g (50.08% insaponificabile)

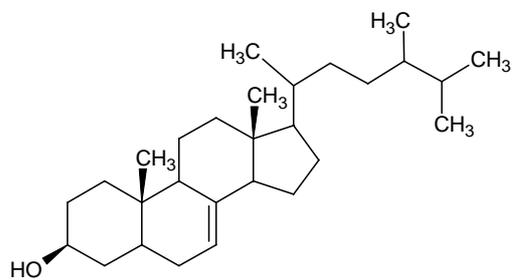
Steroli

Frazione A: 0.0019g (0.76% dw, 1.55% TL)

Scenedesmus almeriensis TLC 20x20



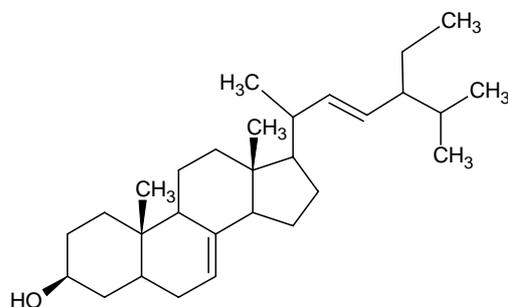
Peak	R.T	Perc.
1	28.011	25.5%
2	28.550	66.9%
3	30.245	7.6%



Ergosta-7en-3 β -ol

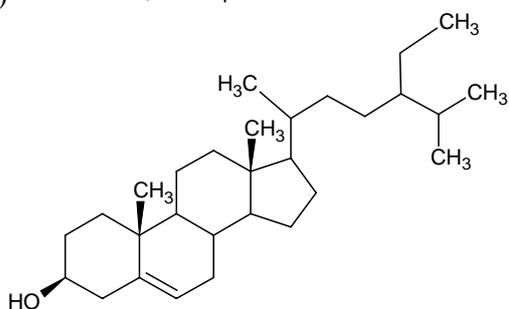
1)

δ 7 Campesterol



Stigma-7,22-dien-3 β ol

2)



Stigmasta-5en-3 β ol

3)

Synechocystis aquatilis (SAG 90.79)

Biomassa liofilizzata: 1.0021g al 50% di allumina (biomassa netta: 0.5011g)

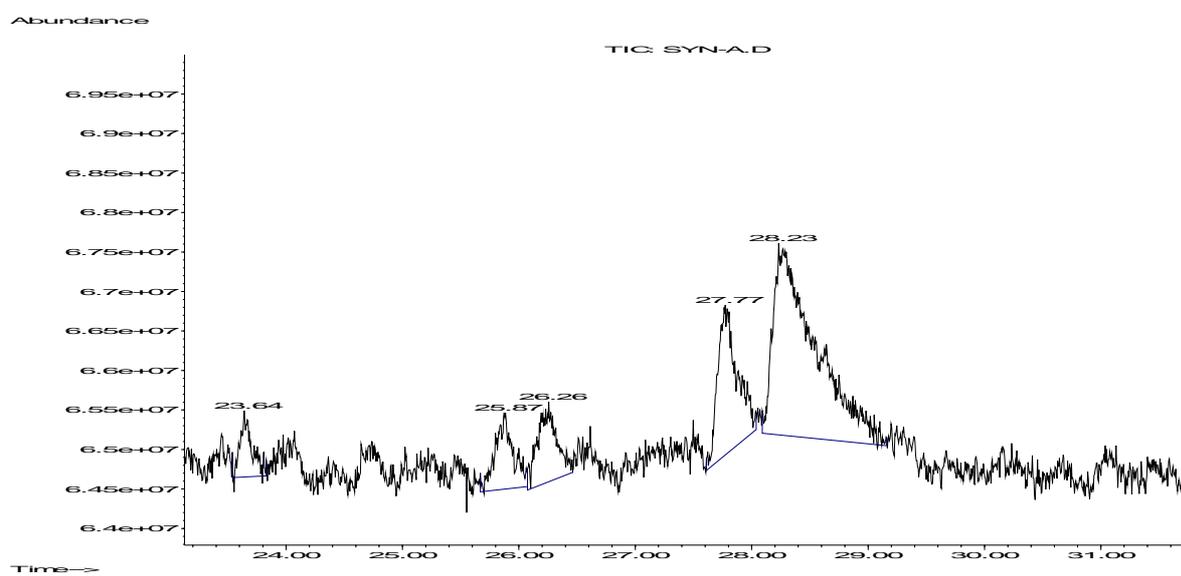
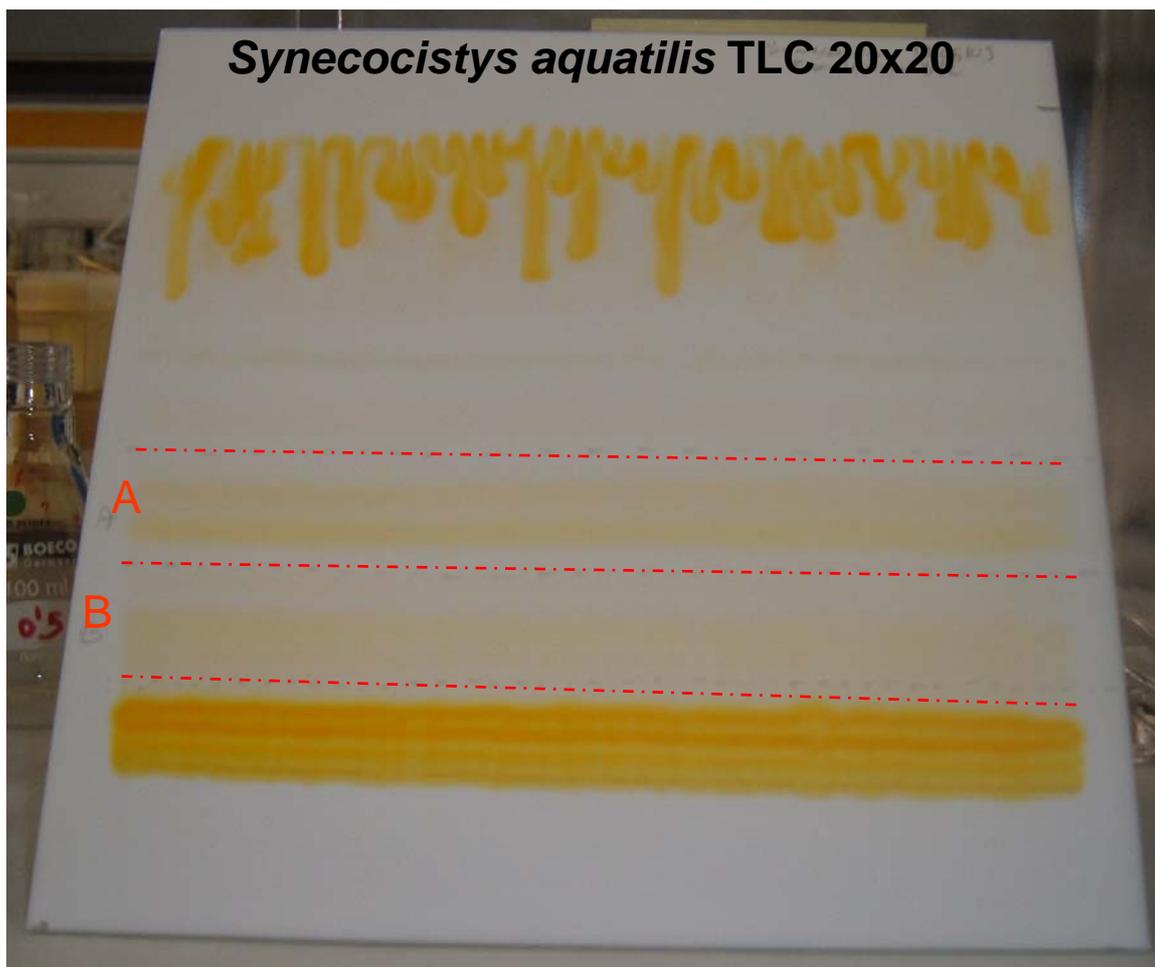
Lipidi totali: 0.0361g (7.20% dw)

Insaponificabile: 0.0113g (2.26% dw)

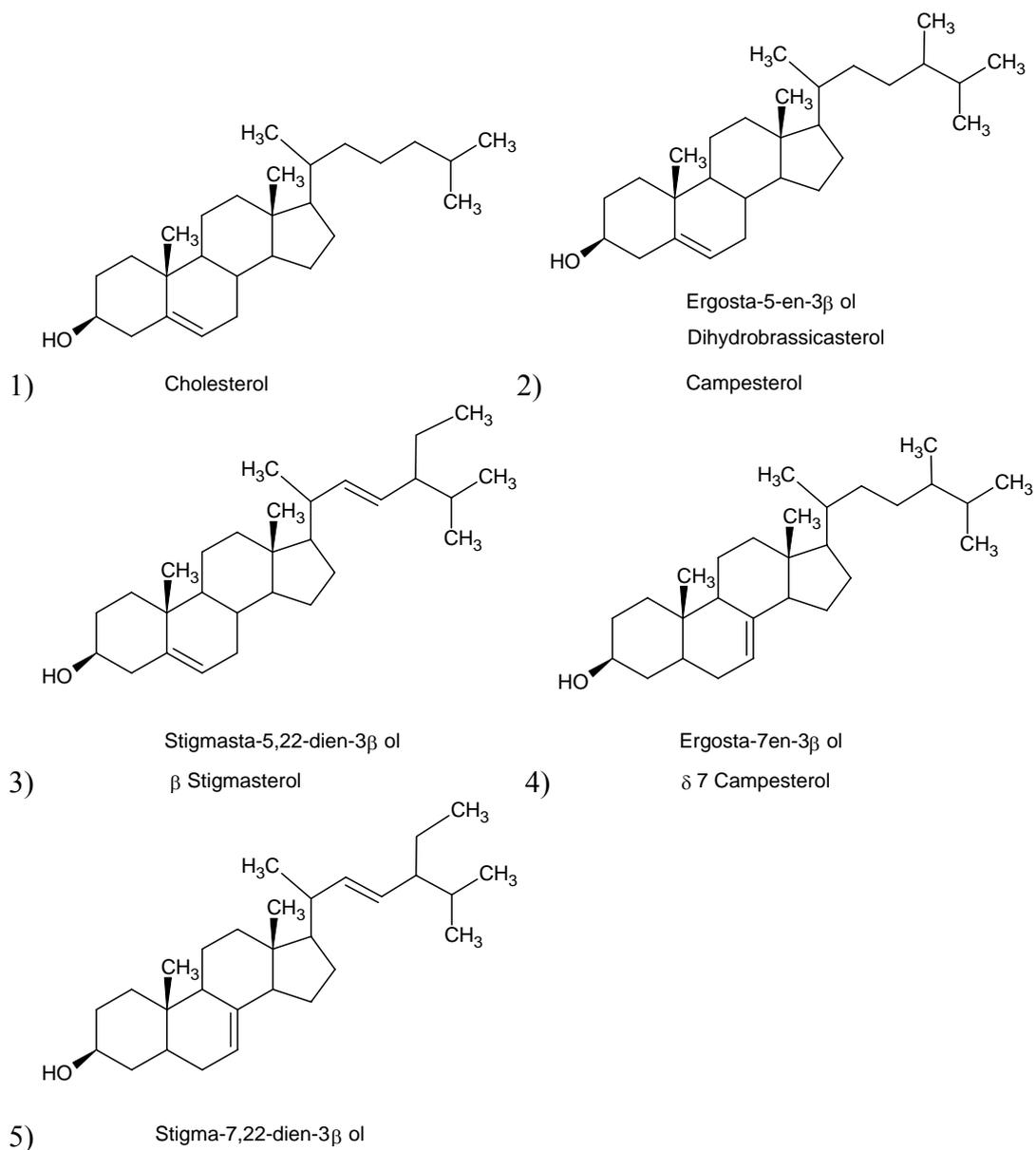
Insaponificabile seminato su TLC: 0.0113g (100% insaponificabile)

Steroli

Frazione A: 0.0026g (0.52% dw, 7.20% TL)



Peak	R.T	Perc.
1	23.640	5.1%
2	25.874	9.2%
3	26.257	10.3%
4	27.773	20.0%
5	28.232	55.3%



Muriellopsis sp.

Biomassa liofilizzata: 1.0072g al 50% di allumina (biomassa netta: 0.5036g)

Lipidi totali: 0.136g (27.01% dw)

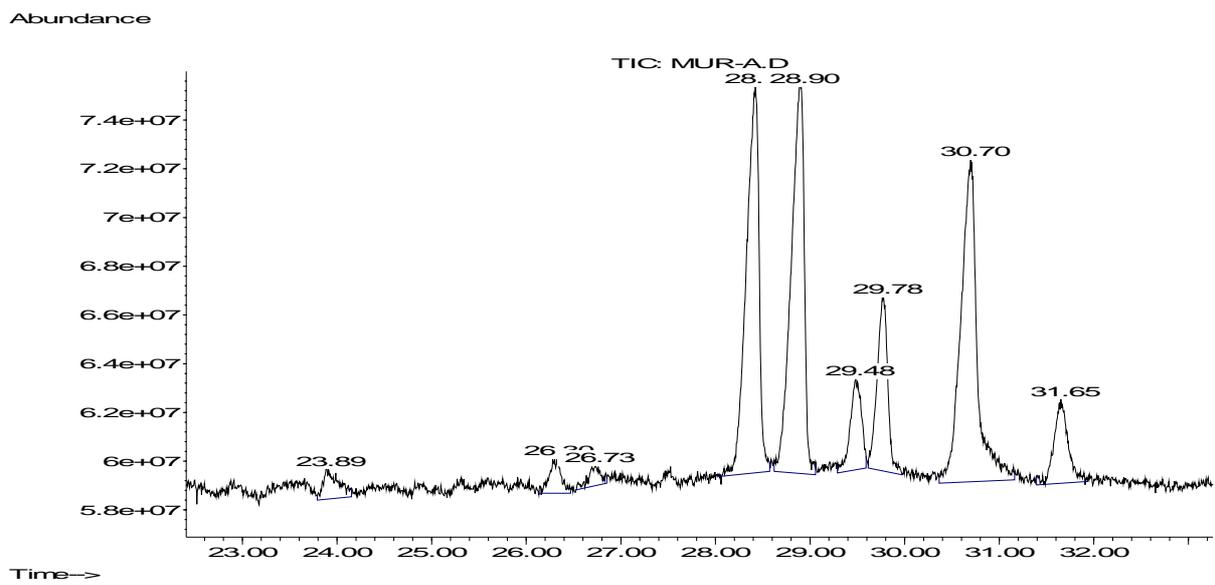
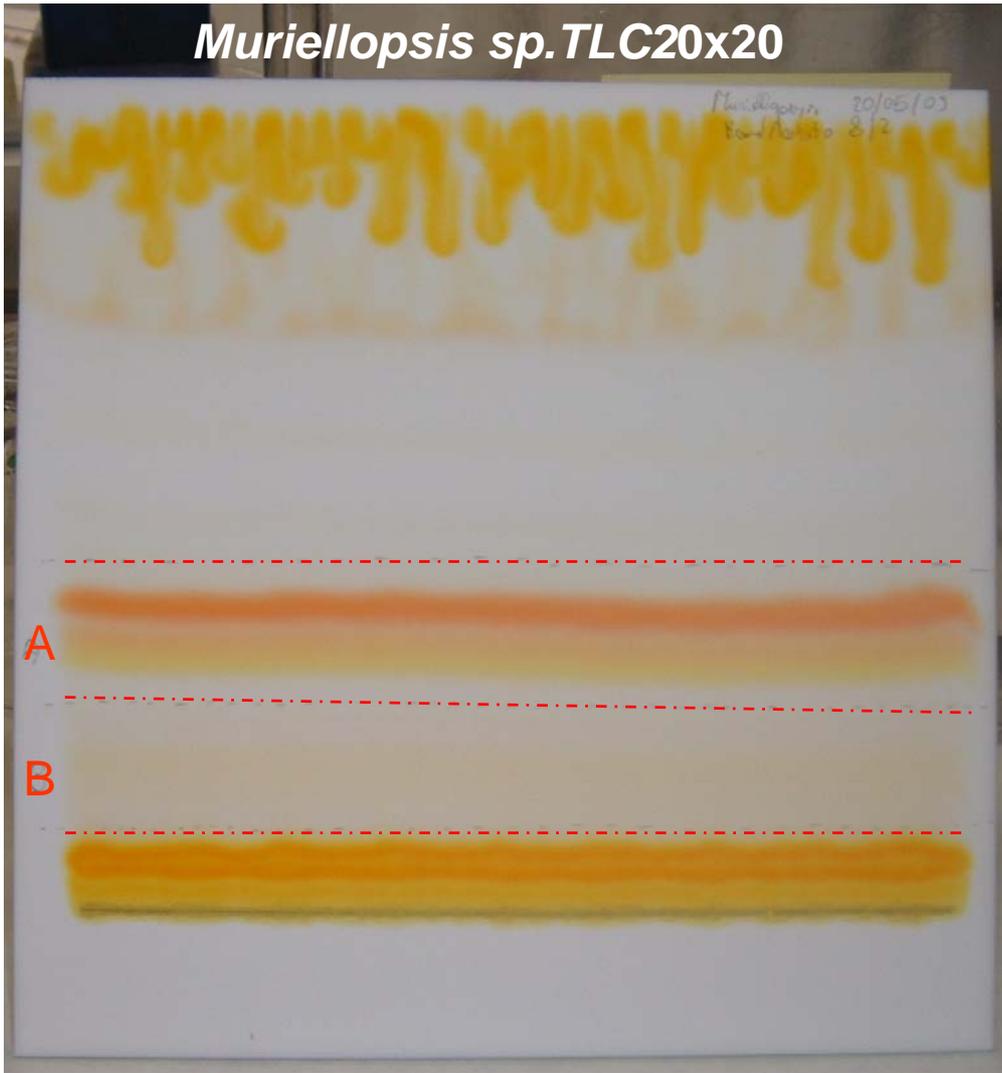
Insaponificabile: 0.0209g (4.15% dw)

Insaponificabile seminato su TLC: 0.0209g (100% insaponificabile)

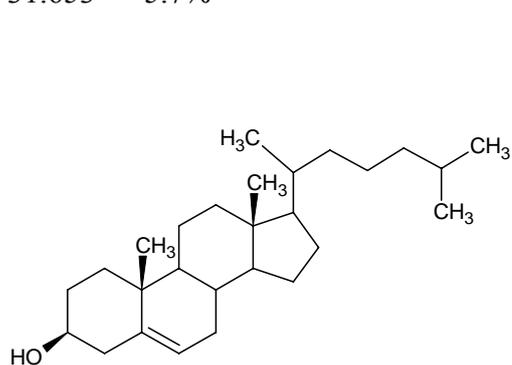
Steroli

Frazione A: 0.0034g (0.68% dw, 2.5% TL)

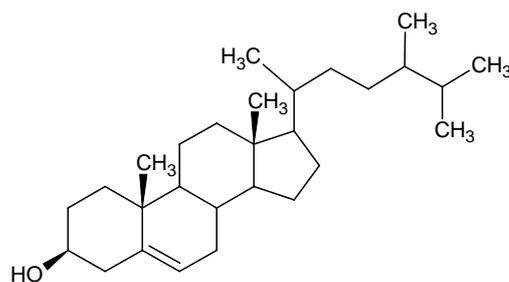
Muriellopsis sp. TLC20x20



Peak	R.T	Perc.
1	23.889	2.2%
2	26.300	2.0%
3	26.732	1.2%
4	28.421	24.1%
5	28.896	24.8%
6	29.484	5.0%
7	29.775	9.1%
8	30.698	25.9%
9	31.653	5.7%

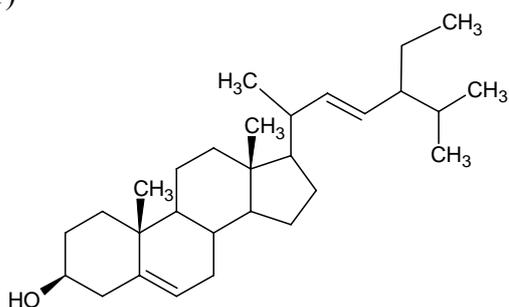


1) Cholesterol

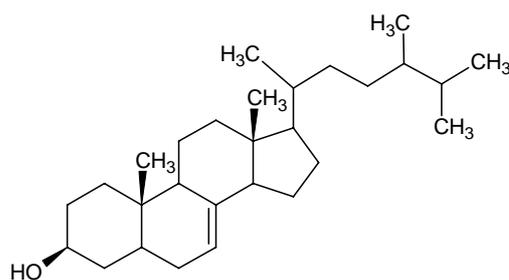


Ergosta-5-en-3β ol
Dihydrobrassicasterol

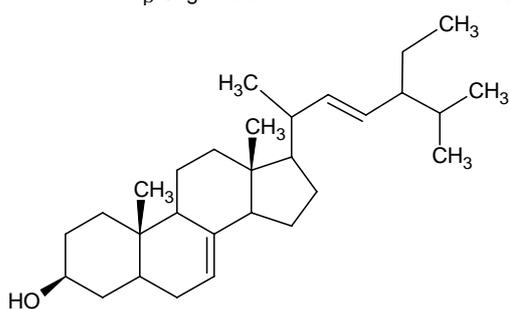
2) Campesterol



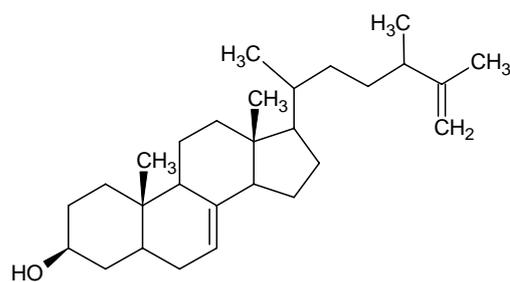
3) Stigmasta-5,22-dien-3β ol
β Stigmasterol



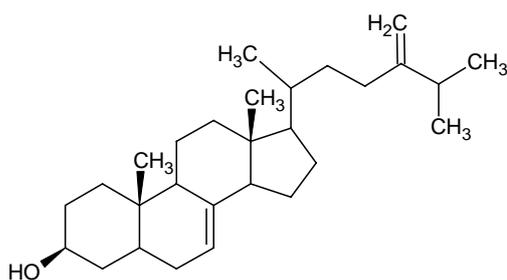
4) Ergosta-7en-3β ol
δ 7 Campesterol



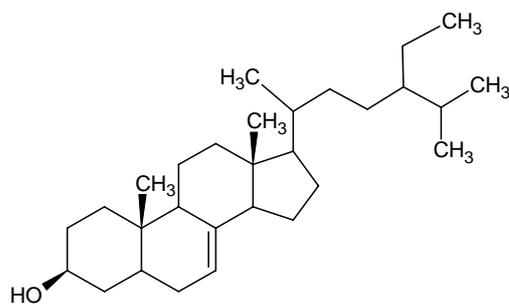
5) Stigma-7,22-dien-3β ol



6) Ergosta-7,25(27)-dien-3β ol

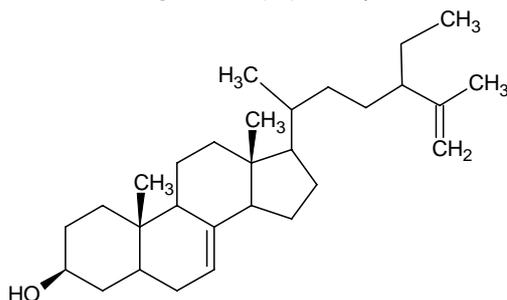


7) Ergosta-7,24(28)-dien-3β ol



Stigmasta-7-en-3β ol

8) Dihydrochondrillasterol



9) Stigmasta-7,25(27)-dien-3β ol

4. PURIFICAZIONE DI β-FICOERITRINA MEDIANTE L'USO DELLA TECNICA *EXPANDED BED ADSORPTION CHROMATOGRAPHY*.

Le ficobiliproteine sono proteine idrosolubili che formano i complessi antenna per la cattura della radiazione solare (ficobilisomi) e agiscono come pigmenti accessori nelle alghe rosse che sono la principale sorgente di questi composti (Glazer, 1988; Wedemayer et al., 1992). In funzione delle loro proprietà di assorbimento della luce, le ficobiliproteine sono divise in quattro principali classi: ficoeritrine (PE, $\lambda_{\max} \sim 540-570$ nm), ficoeritrocianine (PEC, $\lambda_{\max} \sim 570$ nm), ficocianine (PC, $\lambda_{\max} \sim 610-620$ nm) e alloficocianine (APC, $\lambda_{\max} \sim 650-655$ nm) (Glazer, 1999). La principale applicazione delle ficobiliproteine è come marcatori fluorescenti di cellule e macromolecole nella ricerca biomedica e in tecniche di fluorescenza ad alta sensibilità. (Kronick et al., 1983; Glazer, 1984; Glazer, 1994). È stato dimostrato che le ficobiliproteine hanno carattere terapeutico dovuto alla loro capacità fotoprotettiva e azione anticarcinogena (Gonzalez et al., 1999; Rimbau et al., 1999; Huang et al., 2002). Inoltre, esse possono essere utilizzate come coloranti naturali negli alimenti, cosmetici e farmaci, in particolare come sostituti di prodotti sintetici che generalmente sono tossici o non propriamente salutari (Patent 1979; Patent 1987; Arad et al. 1992; Akhilender et al., 1999). La B-PE è stata dimostrata essere particolarmente interessante per la sua elevata efficienza di fluorescenza ed il suo unico ed intenso colore rosa (Ayyagari et al., 1995; Bermelo et al., 2002). Tuttavia l'ampio utilizzo di B-

PE e di altre ficobiliproteine è stato spesso limitato dagli elevati costi di queste molecole purificate. Per questa ragione è stato necessario applicare nuove metodologie per ottenere ficobiliproteine in generale e B-PE in particolare per diverse tipologie di applicazione.

Gli schemi convenzionali per la purificazione delle ficobiliproteine utilizzano molteplici passaggi, ognuno dei quali determina una riduzione della resa. Le metodologie convenzionali comprendono due step: il primo consiste nel pretrattamento del campione al fine di estrarre il materiale intracellulare, ottenendo un estratto grezzo pronto per il secondo step, in cui le ficobiliproteine sono separate utilizzando principalmente la cromatografia convenzionale. Il pretrattamento consiste nella rottura delle pareti cellulari, per cui sono stati utilizzati differenti metodi: ultrasuoni, (Glazer, 1988; Ficner et al., 1992; Bermejo et al., 1997; Bermejo et al., 2001; Bermejo et al., 2002) rottura meccanica (Duerring et al., 1991) trattamento con rivanol (Tchernov et al., 1999) trattamento con Triton X-100 e omogeneizzazione meccanica (Saxena, 1988) ultrasuoni ed estrazione con acetone. Dopo la rottura delle cellule, tutti i metodi prevedono la precipitazione delle ficobiliproteine con ammonio solfato. Solitamente è poi necessaria la centrifugazione o la dialisi per ottenere un estratto grezzo pronto per lo step successivo. Il secondo step consiste in uno o più processi cromatografici. Per la purificazione della ficoeritrina, sono riportati in letteratura diversi metodi che consistono nel adsorbimento, interazione idrofobica, gel filtrazione o cromatografia a scambio ionico. (Schoeletter et al., 1983; Ficner et al., 1992; D'Agnoletto et al., 1994; Bermejo et al., 2001; Bermejo et al., 2002; Rosano et al. 2003). L'elevato numero di operazioni determina una crescita del costo di produzione e del tempo necessario per portare a termine la purificazione.

La cromatografia Expanded Bed Adsorption (EBA) costituisce un'alternativa tecnica di separazione che riduce fortemente il numero di processi di purificazione per l'assorbimento della proteina sul mezzo di separazione, catturando direttamente le proteine dallo stock vegetale particellato. In un letto fluidificato, una fase stazionaria (particelle adsorbenti) è fluidificata con un flusso di della fase liquida dal basso verso l'alto. Questo flusso aumenta la distanza tra le particelle adsorbenti, permettendo il passaggio delle particelle dello stock vegetale nel volume interstiziale della matrice. La posizione di ogni particella nella colonna dipende dalla dimensione della particella, dalla densità, dalla viscosità del fluido e velocità. Un letto stabile fluidificato si forma quando le particelle dell'adsorbente sono sospese in equilibrio dovuto al bilancio tra la velocità di sedimentazione e la velocità di flusso del liquido ascendente.

L'adattatore della colonna è collocato nella parte alta in questa fase. Il grezzo estratto senza chiarificazione è caricato nel letto espanso con la stessa velocità di flusso utilizzata durante la fase di espansione e di equilibrio. Le proteine sono aderite all'adsorbente, mentre le cellule

morte, i residui cellulari, le particelle e i contaminanti passano su attraverso il letto senza nessun impedimento. Il materiale debolmente adsorbito, come le cellule morte e altro tipo di particelle, sono espulse dal letto espanso utilizzando un flusso di liquido dal basso verso l'alto.

Quando tutto il materiale non ritenuto dal letto è stato espulso, si ferma il flusso di liquido e le particelle dell'adsorbente si depositano rapidamente alla base della colonna. Si porta l'adattatore della colonna alla superficie del letto sedimentato. Si inverte quindi il flusso (dall'alto verso il basso) e le proteine catturate sono eluite dal letto sedimentato utilizzando condizioni tampone opportune. La fase eluita contiene la proteina, concentrata, chiarificata, parzialmente purificata e pronta per la successiva fase di purificazione. Dopo l'eluizione, il letto è rigenerato mediante lavaggi con flusso in discesa utilizzando specifici tamponi in funzione del tipo di fase fissa utilizzata.

In questa esperienza è stata applicata la tecnica cromatografica EBA per concentrare e purificare la B-Ficoeritrina dalla microalga rossa *Porphyridium cruentum*.

4.1 Estrazione delle ficobiliproteine

L'estrazione delle ficobiliproteine è effettuata pesando 10g di biomassa liofilizzata a cui si aggiungono 200ml di tampone ac. acetico/ acetato sodico 1 M pH 5.5. La miscela è tenuta in agitazione mediante agitatore magnetico per circa 30 minuti. Alla fine il grezzo è centrifugato con centrifuga Labofuge 200 a 4000 rpm per 5 minuti ed il sovrantante è separato dal solido. È effettuata l'analisi del contenuto di ficobiliproteine nel grezzo mediante spettrofotometria.

4.2 Determinazione del contenuto di ficobiliproteine

Le concentrazioni di B-PE, R-PC e APC nell'estratto che contiene ficobiliproteine sono calcolati a partire dalla misura di assorbenza a 565, 620 e 650 nm, utilizzando le seguenti equazioni:

$$\text{R-PC (mg/ml)} = (\text{OD}_{620 \text{ nm}} - 0.7 \times \text{OD}_{650 \text{ nm}}) / 7.38$$

$$\text{APC (mg/ml)} = (\text{OD}_{650 \text{ nm}} - 0.19 \times \text{OD}_{620 \text{ nm}}) / 5.65$$

$$\text{B-PE (mg/ml)} = (\text{OD}_{565 \text{ nm}} - 2.8[\text{R-PC}] - 1.34[\text{APC}]) / 12.7$$

Queste equazioni sono state definite utilizzando le equazioni simultanee di Bennet e Bogorad (1973) e i coefficienti di estinzione molare di Bryant et al. (1979). Le misure di assorbenza sono state effettuate mediante uno spettrofotometro Lambda-16 UV-Vis Perkin-Elmer con cuvetta di quarzo da 1 cm.

4.3 Purificazione

Per la purificazione delle ficoeritrine (B-PE) è stata utilizzata una colonna di letto espanso (EBA) con il concentrato di ficobiliproteine precedentemente ottenuto dalla estrazione e centrifugazione, diluito in 2 L di acqua distillata. È stato seguito il procedimento schematizzato in Fig. 2. In questo caso è stata utilizzata come fase fissa la resina Streamline DEAE fornita da Amershan PHarmacia Biotech. Una colonna di vetro 50x2.5 cm contenente 70ml della resina Streamline DEAE (dispersa in acqua al 40% di alcol etilico) è stata equilibrata con acqua distillata, con un flusso di 1ml/min, per eliminare tracce di alcol che possono essere tratteneute dalla resina, fino ad ottenere un'espansione del letto da 9 a 19 cm mantenendo sempre il livello del fluido 2 cm nella parte alta. Successivamente si fanno fluire circa 150 ml di tampone 50mM pH5.5 di ac. acetico/ acetato sodico per equilibrare la colonna. Infine si caricano nella colonna i 2 L di grezzo sempre con lo stesso flusso (Fig.3) e si lava il letto con il tampone 50 mM (Fig.4). Si inverte quindi il flusso e si eluisce la colonna con 225 ml di tampone 250 mM (per l'eluizione di ficoeritrina) raccogliendo le frazioni che successivamente saranno analizzate per la determinazione del contenuto di ficobiliproteine (Fig.5). Le frazioni raccolte presentano un intenso colore rosa porpora. Si eluisce quindi la colonna con 225ml di tampone ac. acetico/ acetato sodico 1M pH5.5 (per eluire le ficobiliproteine più polari) e quindi si recupera la colonna e si rigenera la fase fissa con un lavaggio mediante miscela (375ml) al 50% di NaOH 0.5M ed NaCl 1M ed infine solo con acqua distillata (225ml) (Fig.6).

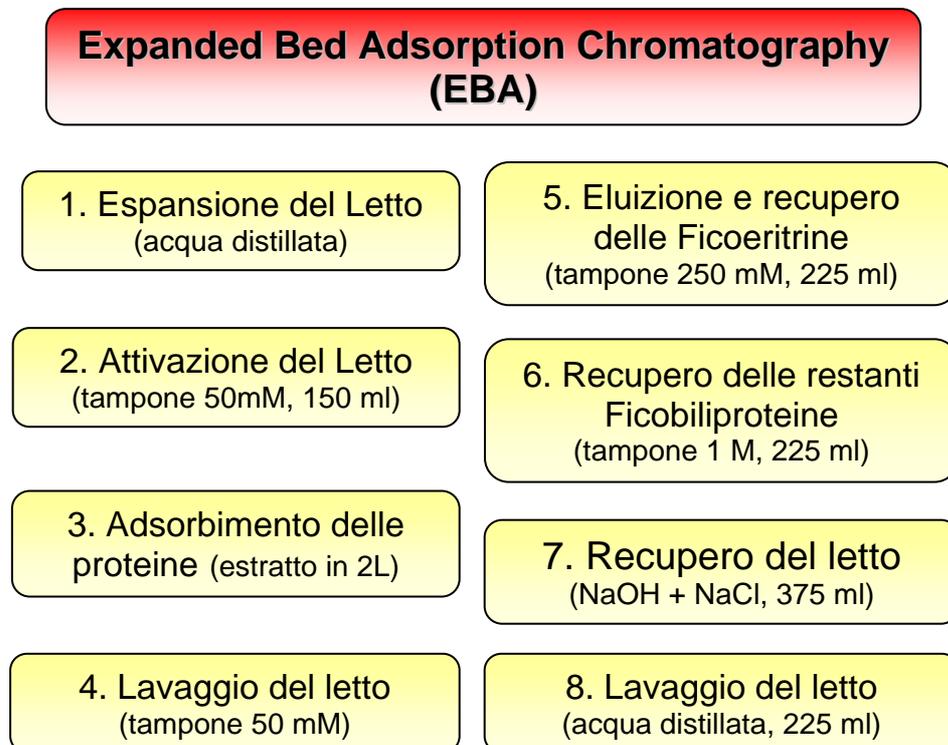


Fig.2 Schema di processo



Fig. 3

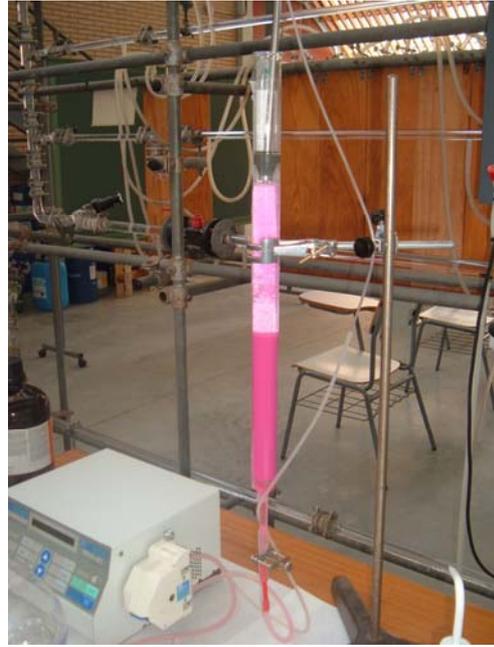


Fig.4

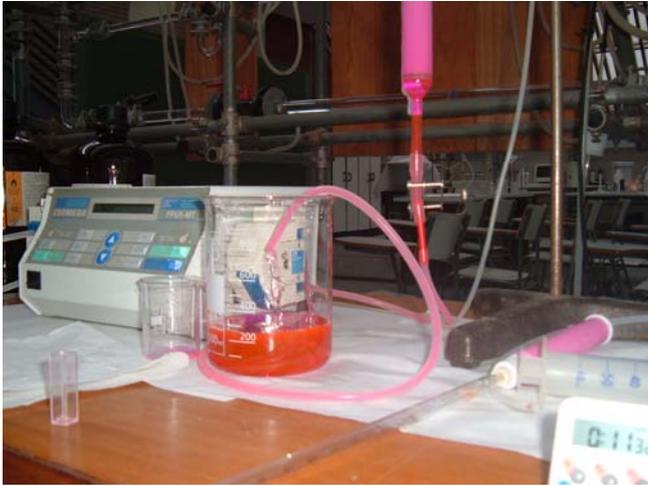


Fig.5



Fig.6

5. PURIFICAZIONE DEGLI ESTERI DELL' ACIDO ECOSAPENTENOICO (EPA) MEDIANTE PROCESSO AD ELEVATE PERFORMANCE.

L'acido eicosapentenoico (EPA, 5,8,11,14,17-cis-eicosapentenoic acid) è uno n-3 C20 acido grasso polinsaturo che risulta metabolicamente attivo. Per l'EPA ed i suoi derivati è stato provata un'azione benefica nella prevenzione e nel trattamento di alcune patologie quali disfunzioni coronariche, aggregazione piastrinica, elevati livelli di colesterolo e di per diverse tipologie di carcinomi (Karmali, 1996; Corden, 1998).

Attualmente l'EPA è ricavato per usi commerciali principalmente dall'olio di pesce, il cui prezzo e qualità fluttua ampiamente. Inoltre ci sono importanti considerazioni riguardanti la contaminazione dell'olio di pesce con pesticidi e metalli pesanti. Pertanto si è resa necessaria un'alternativa fonte di EPA che fosse economicamente ed quantitativamente conveniente. Le microalghe sono una potenziale fonte di EPA, tuttavia è necessario un processo di estrazione e purificazione che sia caratterizzato da bassi costi di processo e che da elevate rese di purificazione. Un metodo che presenta questi requisiti è quello proposto da Belarbi et al. (1999) dell'Università di Almeria e che è stato applicato a diverse ceppi microalgali nel'ambito del Programma Short-term mobility.

Con questo metodo più del 70% del contenuto di EPA nel grezzo esterificato estratto dalle microalghe è stato recuperato con un grado di purezza maggiore del 90%. Lo schema di estrazione prevede l'utilizzo o della biomassa liofilizzata o di quella umida. Il processo consiste in tre principali steps: 1) estrazione simultanea e transesterificazione della biomassa algale; 2) cromatografia su gel di silice attivato con Argento dell'estratto grezzo; 3) rimozione dei pigmenti mediante un secondo processo cromatografico. La quantità ottimale della miscela grezza di esteri degli acidi grassi da caricare sul supporto cromatografico è pari a circa il 3-4% (w/w).

5.1 Estrazione simultanea e trans-esterificazione degli acidi grassi microalgali

Gli esteri dei grassi possono essere estratti o dalla biomassa algale liofilizzata o dalla biomassa algale umida appena raccolta e centrifugata. In queste esperienze è stata utilizzata solo la biomassa liofilizzata.

La biomassa secca (circa 100 g) è aggiunta ad una miscela di metanolo (500ml), acetil cloruro (25ml), ed esano (500ml). La risultante sospensione è posta in un contenitore di acciaio a chiusura ermetica da due litri e tenuto in un bagno ad ultrasuoni per 10 minuti. Il contenitore è successivamente trasferito in un bagno d'acqua in ebollizione e tenuto per circa 30 minuti. Successivamente è raffreddato a temperatura ambiente e la sospensione è filtrata con un imbuto Büchner. Il contenitore è lavato con un'ulteriore aliquota di 500ml di esano e filtrata. La fase

liquida è posta quindi in un imbuto separatore da cui è recuperata la fase organica (esano) che è concentrato in atmosfera di Argon al Rotavapor.

5.2 Cromatografia su colonna

Per la purificazione degli esteri dei grassi è stata utilizzata una colonna di gel di silice attivato con Argento. Il gel è stato preparato come segue: 200g di gel di silice per colonna cromatografica (0.06-0.2mm, 70-230 mesh; diametro medio dei pori di 6nm, area superficiale specifica di 500 m²/g) è stata sospesa in etanolo (400ml, 10 minuti). È stata aggiunta una soluzione di nitrato di argento (20g) in circa 70 ml di etanolo al 70% (v/v) e tenuta in agitazione per ulteriori 10 minuti. L'etanolo è quindi evaporato sotto vuoto a 60 °C e la silice impregnata di argento è attivata mediante riscaldamento in stufa a 120 °C per una notte. Questo materiale è tenuto al buio in un essiccatore fino all'utilizzo. Un metodo alternativo per preparare la fase stazionaria consiste nell'aggiungere direttamente al gel di silice un piccolo volume di una soluzione acquosa di nitrato di argento e successiva essiccazione a 120 °C.

Una colonna da 0.5cm di diametro è caricata con la sospensione di gel Ag-silice in esano fino ad ottenere un'altezza di impaccamento di circa 9 cm. Il livello dell'esano è abbassato fino a circa 1 cm al di sopra della fase stazionaria. L'uscita della colonna cromatografica è chiusa o con lana di vetro o con un disco di vetro sinterizzato per ritenere i solidi.

Il grezzo estratto è eluito con le seguenti miscele di solventi: 1) esano con 0.5% (v/v) di acetone; 2) esano con 1% (v/v) di acetone; 3) esano con 5% (v/v) di acetone.

5.3 Rimozione dei pigmenti

La frazione finale di EPA ottenuta dalla cromatografia su gel Ag-silice degli esteri grassi microalgale presenta una leggera colorazione verde dovuta alla presenza di pigmenti clorofillici. Le clorofilla sono rimosse in un secondo step cromatografico. Pertanto, la frazione finale di EPA è concentrata sotto vuoto a circa 15 ml e passata su colonna cromatografica con gel di silice (senza Ag). La colonna è eluita una miscela esano:acetone (98.5:1.5 v/v). Tutto il materiale eluito prima della banda verde dei pigmenti clorofillici viene raccolto. In questo modo è recuperata l'intera quantità di EPA che presenta una leggera colorazione giallognola.

5.4 Analisi Gas cromatografica

I grezzi estratti e le frazioni ottenute dalla colonna cromatografica sono analizzate mediante gas cromatografia per calcolare la percentuale di recupero e di purezza dell'EPA.

È stato utilizzato un gas cromatografo HP 5890 serie II con autocampionatore e detector a ionizzazione di fiamma (FID). La separazione è stata effettuata con una colonna capillare di silice fusa (Supelco Omega wax 250) (30m, 0.25mm, 0.25 μ m). Il profilo tempo-temperatura del forno era il seguente: 205 °C (10min), 6 °C per min fino a 240°C, 240 °C(9min), con un tempo totale per ogni corsa cromatografica di 25 minuti. Per l'analisi quantitativa è stato utilizzato come standard interno l'estere metilico dell'acido nonadecanoico (19:0 metil estere). Le quantità dei vari esteri metilici degli acidi grassi è stata calcolata utilizzando l'equazione:

$$C_i = C_s (A_i / A_s),$$

dove C_i è la quantità di ogni estere metilico i , C_s è la quantità dello standard, A_i è l'area del picco dell'analita i , e A_s è l'area del picco dello standard interno. Quest'ultimo è stato preparato sciogliendo 25 mg di 19:0 metil estere in esano (1ml).

6. SISTEMI DI PRODUZIONE ALGALI IN FOTOBIOREATTORI (CHIUSI E APERTI) VISIONATI PRESSO L'UNIVERSITÀ DI ALMERÍA, DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA CHIMICA.



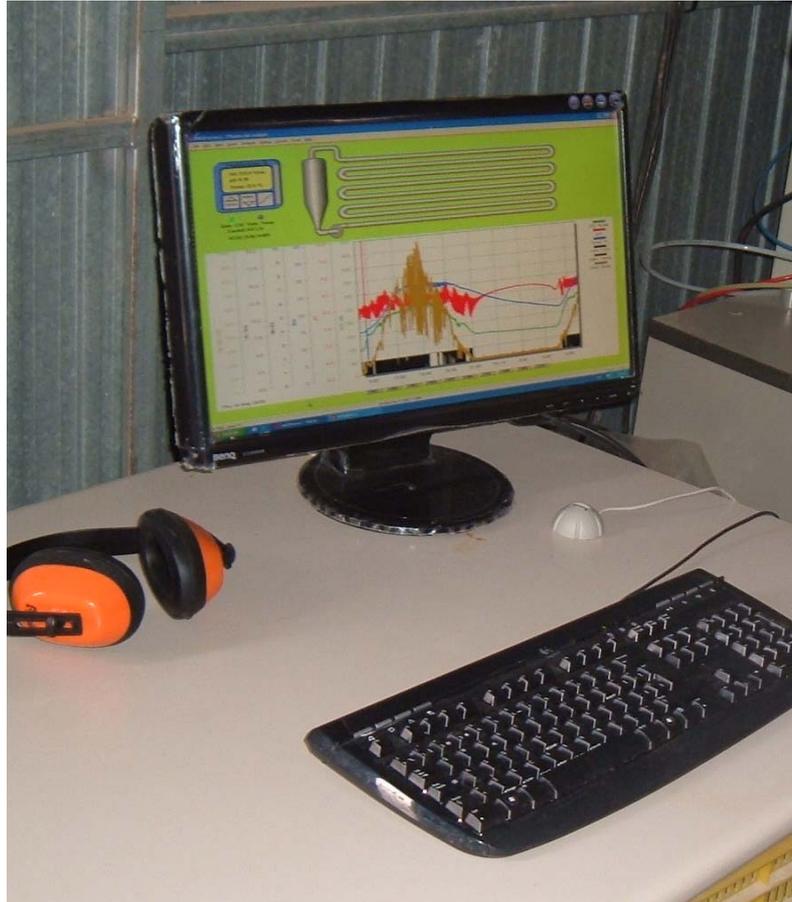
Fotobioreattore da banco (2l).



Fotobioreattore verticale semi-industriale (300L)



Fotobioreattore orizzontale semi-industriale



Sistema di controllo e gestione computerizzato dei fotobioreattori



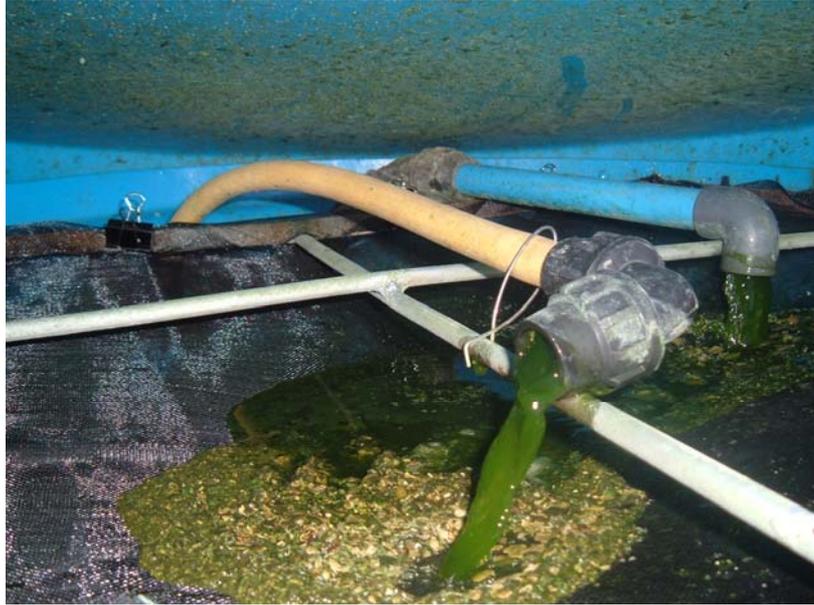
Fotobioreattore sperimentale Flat Panel



Fotobioreattore Race-way



Fotobioreattore Race-way



Prefiltraggio della biomassa algale pre-centrifuga



Centrifuga in continuo

7. BIBIOGRAFIA

- Akhilender K, Sarada R, Manoj G, KhanMY, Mahadeva M, Viswanatha S, et al., 1999. Toxicity assessment of phycocyanin. A blue colorant from blue green alga *Spirulina platensis*. Food Biotechnol 13:51–6.
- Arad S, Yaron A., 1992. Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. Trends Food Sci Technol 3:92–7.
- Ayyagari M, Pande R, Kamtekar S, Gao H, Marx K, Kumar J, et al., 1995. Molecular assembly of proteins and conjugated polymers: toward development of biosensors. Biotechnol Bioeng 45:116–21.
- Becker, W. 2004. Microalgae in human and animal nutrition, p.312-351. In Richmond, A. (ed) Handbook of microalgale culture. Blackwell, Oxford.
- Belarbi, E.H.; Molina Grima, E.; Chisti, Y., 2000. A process for high yield and scaleable recovery of high purità eicosapentaenoic acid esters from microalgale and fish oil. Enzyme and Microbial technology 26, 516-529.
- Bennet A, Bogorad L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green algae. J Cell Biol 58:419–22.
- Bermejo R, Alvarez-Pez JM, Aci'en FG, Molina E., 2002. Recovery of pure Bphycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. J Biotechnol 93:73–85.
- Bermejo R, Fernández E, Alvarez-Pez JM, Talavera EM., 2002. Labeling of cytosine residues with biliproteins for use as fluorescent DNA probes. J Luminesc 99:113–24
- Bermejo R, Talavera EM, Alvarez-Pez JM, Orte JC., 1997. Chromatographic purification of phycobiliproteins from *Spirulina platensis*. Highperformance liquid chromatographic separation of their alfa and beta subunits. J Chromatogr A 778:441–50.
- Bermejo R, Talavera EM, Alvarez-Pez JM., 2001. Chromatographic purification and characterization of B-Phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. Semipreparative HPLC separation and characterization of its subunits. J Chromatogr A 917:135–45.
- Bermejo R, Tobaruela D, Talavera EM, Orte A, Alvarez-Pez JM., 2003. Fluorescent behaviour of B-phycoerythrin in microemulsiones of aerosol OT/water/isooctane. J Colloid Interface Sci 263:616–24.
- Borowitzka, M.A. 1988. Ftas, oils and hydrocarbons, p.257-287. In Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J. (ed.), Micro-algal biotechnology. Cambrige University Press, Cambrige.
- Borowitzka, M.A. 1988. Vitamins and fine chemicals from micro-algae, p. 153-196. In Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J. (ed.), Micro-algal biotechnology. Cambrige University Press, Cambrige.
- Borowitzka, M.A. 1995. Microalgae as source of pharmaceuticals and other biologically active compounds. J. Appl. Phycol., 7, 3-15.

- Borowitzka, M.A. 1999: Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *J. Biotechnol.*, 70, 313-321.
- Brown, M.R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C., Trenerry, C., 1999. The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *J. Appl. Phycol.*, 11, 247-255.
- Bryant DA, Guglielmi G, Tandeu de Marsac N, Castets AM, Cohen-Bazire G.,1979. The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. *Arch Microbiol* 123:113–27.
- Burja, A.M., Banaigs, B., Abou-Mansour, E., Burgess, J.G., Wright, P.C., 2001. Marine cyanobacteria—a prolific source of natural products. *Tetrahedron* 57, 9347–9377.
- Corden C. Scotia Pharmaceuticals Ltd, U.K., Personal communication. 1998.
- Cornet, J.F., 1998. Le technoscope: les photobioréacteurs. *Biofutur*, 176, 1-10.
- D’Agnolo E, Rizzo R, Paoletti S, Murano E., 1994. R-phycoerythrin from the red alga *Gracilaria longa*. *Phytochemistry* 35:693–6.
- Dainippon Ink and Chemicals Inc. Japanese Patent 95 770 (1979).
- Dainippon Ink and Chemicals Inc., Japanese Patent 06: 691 (1987).
- Duerring M, Schmidt GB, Huber R., 1991. Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of constitutive C-phycoerythrin from the chromatically adapting cyanobacterium *Fremyella diplosiphon* at 1.66 Å resolution. *J Mol Biol* 217:577–92.
- Ficner R, Lobeck K, Schmidt G, Huber R., 1992. Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of B-phycoerythrin from the red alga *Porphyridium sordidum* at 2.2 Å resolution. *Mol Biol* 228: 935–50.
- Glazer AN, Stryer L., 1984. Phycofluor probes. *Trends Biochem Sci* 9: 423–7.
- Glazer AN., 1988. Phycobiliproteins. *Meth Enzymol* 167:291–303.
- Glazer AN., 1994. Phycobiliproteins: a family of valuable, widely used fluorophores. *J Appl Phycol* 6:105–12.
- Glazer AN., 1999. Phycobiliproteins. In: Cohen Z, editor. *Chemicals from microalgae*. UK: Taylor and Francis Ltd; p. 262–80.
- González R, Rodríguez S, Romay C, Ancheta O, González A, Armesto J, et al., 1999. Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acetic acid-induced colitis in rats. *Pharmacol Res* 39:55–9.
- Guil-Guerrero, J.L., Navarro-Juárez, R., López-Martínez, J.C., Campra-Madrid, P. Reboloso-Fuentes, M.M., 2004. Functional properties of the biomass of three microalgal species. *J. Food. Eng.*, 65, 511-517.

- Huang B, Wang GC, Zeng CK, Li ZG., 2002. The experimental research of Rphycoerythrin subunits on cancer treatment: a new photosensitizer in PDT. *Cancer Biother Radiopharm* 17(1):35–42.
- Iwamoto, H., 2004. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – major industrial species – *Chlorella*, p. 255-263. In Richmond, A. (ed.), *Handbook of microalgae culture*. Blackwell, Oxford.
- Jensen, G.S., Ginsberg, D.I., Drapeau, M.S., 2001. Blue-green algae as an immuno-enhancer and biomodulator. *J. Am. Nutraceutical Assoc.*, 3, 24-30.
- Karmali R. Historical perspective and potential use of n-3 fatty acids in therapy of cancer cachexia. *Nutrition* 1996;12(suppl. 1):S2–S4.
- Kronick MN, Grossman AR., 1983. Immunoassay techniques with fluorescent phycobiliprotein conjugates. *Clin Chem* 29:1582–6.
- Mayer, A.M.S., Hamann, M.T., 2004. Marine pharmacology in 2000: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous system and other miscellaneous mechanisms of action. *Mar. Biotechnol.* 6, 37–52.
- Metting, F.B., 1996. Biodiversity and application of microalgae. *J. Ind. Microbiol.*, 17, 477-489.
- Muller-Feuga, A., 1996. Microalgues marines. Les enjeux de la recherche. Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, Plouzané.
- Nes, W.D., 2000. Sterol methyl transferase: enzymology and inhibition. *Biochem. Biophys. Acta* 1529, 63–88.
- Park, D.W., Jo, Q., Lim, H.J., Veron, B., 2002. Sterol composition of darkgrown *Isochrysis galbana* and its implication in the seed production of pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Appl. Phycol.* 14, 351–355.
- Ponomarenko, L.P., Stonik, I.V., Aizdaicher, N.A., Orlova, T.Y., Popvskaya, G.I., Pomazkina, G.V., Stonik, V.A., 2004. Sterols of marine microalgae *Pyramimonas cf. cordata* (prasinophyta), *Atteya ussurensis sp. nov.* (Bacillariophyta) and a spring diatom bloom from Lake Baikal. *Comp. Biochem. Physiol.*, B 138, 65–70.
- Rimbau V, Camins A, Romay C, González R, Pallán M., 1999. Protective effects of C-phycocyanin against Kainic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 276:75–8.
- Rosano R, H'ungaro N, D'Ambrosio A, Liuzzi GM, Riccio P., 2003. Extracting and purifying R-phycocyanin from Mediterranean red algae *Corallina elongata*. *J Biotechnol* 101:289–93.
- Saxena AM., 1988. Phycocyanin aggregation. A small angle neutron scattering and size exclusion chromatographic study. *J Mol Biol* 200:579–91.

Schoelemer RW, Leung S, Lundell D, Glazer AN, Rapoport H., 1983. Chromopeptides from phycoerythrins. Structure and linkage of a phycoerythrobilin tryptic tripeptide derived from a B-phycoerythrin. *J Am Chem Soc* 105:4072–6.

Soletto, D., Binaghi, L., Lodi, A., Carvalho, J.C.M., Converti, A., 2005. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. *Aquaculture*, 243, 217-224.

Soudant, P., Coz, J.-R., Marty, Y., Moal, J., Robert, R., Samain, J.-F., 1998. Incorporation of microalgae sterols by scallop *Pecten maximus* (L.) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.*, A 119, 451–457.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101 No 2, 87-96

Tapiero, H., Townsend, D.M., Tew, K.D., 2003. Phytosterols in the prevention of human pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57, 321-325.

Tchernov AA, Minkova KM, Houbavenska NB, Kovacheva NG., 1999. Purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp. by aminohexyl-Sepharose chromatography. *J Biotechnol* 69:69–73.

Tringali, C., 1997. Bioactive metabolites from marine algae: recent results. *Curr. Org. Chem.* 1, 375–394.

Tzonvenis, I. De Pauw, N., Sorgeloos, P., 2003. Optimisation of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids: I. Effect of different light regimes on growth and biomass production. *Aquaculture*, 216, 203-222.

Wedemayer GJ, Kidd DG, Wemmer DE, Glazer AN., 1992. Phycobilins of cryptophycean algae. Occurrence of dihydrobiliverdin and mesobiliverdin in cryptomonad biliproteins. *J Biol Chem* 267:7315–31.