

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**

Tesi di Laurea Magistrale

Studio di crescita di *Phaeodactylum tricornutum* ed estrazione di fucoxantina usando tecniche sostenibili



Relatrice

Prof.ssa Debora Fino

Correlatrice

Caterina Celi

Candidata
Serena De Lucia

Ottobre 2023

Indice

Introduzione	1
1. Concetto di bioraffineria	2
1.1 Bioraffineria di prima generazione.....	3
1.2 Bioraffineria di seconda generazione	3
1.2 Bioraffineria di terza generazione	3
2. Le alghe	4
2.1 Le microalghe.....	6
2.1.1 Strategie di coltivazione: fototrofia, eterotrofia, mixotrofia.....	7
2.1.2 Coltivazione delle microalghe su larga scala	7
2.1.3 Curve di crescita delle microalghe.....	10
2.1.4 Parametri di crescita.....	11
2.1.5 Prodotti e applicazioni delle microalghe.....	13
2.2 Diatomee	16
2.2.1 <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18
2.2.2 Condizioni ottimali di crescita per <i>P. tricornutum</i>	19
2.3 Design of Experiment.....	21
3. Crescita di <i>Phaeodactylum tricornutum</i> e caratterizzazione della biomassa	24
3.1 Materiali e Metodi per la crescita.....	24
3.1.1 Composizione terreni di coltura.....	24
3.1.2 Design of Experiment	25
3.1.3 Apparecchiature utilizzate.....	26
3.2 Materiali e Metodi per l'estrazione	28
3.2.1 Apparecchiature utilizzate.....	29
3.3 Risultati della crescita	34
3.3.1 Crescita a 20°C.....	34
3.3.2 Crescita a 25°C.....	37
3.4 Risultati dell'estrazione: caratterizzazione della biomassa	40
3.4.1 Quantificazione fucoxantina: analisi HPLC	40
3.4.2 Quantificazione clorofille: analisi spettrofotometrica.....	40
3.4.3 Modellazione ed analisi delle superfici di risposta	41
4. Estrazione di fucoxantina con Natural Deep Eutectic Solvents	52
4.1 Natural Deep Eutectic Solvents.....	52
4.1.1 Caratteristiche e proprietà	52
4.1.2 Fattori operativi che influenzano l'efficacia estrattiva dei NaDESs.....	56
4.2 Screening NaDESs	58

4.2.1	Scopo dell'esperimento.....	58
4.2.2	Scelta dei NaDESs	58
4.2.3	Preparazione dei NaDESs	62
4.2.4	Misura della densità	63
4.2.5	Estrazione ed analisi HPLC	63
4.2.6	Risultati screening.....	65
4.3	Estrazione di fucoxantina con Ment:Lev e Non:Lau.....	66
4.3.1	Variabili operative testate	66
4.3.2	Design of Experiment	67
4.3.3	Risultati ottenuti dall'analisi HPLC	69
4.3.4	Modellazione ed analisi delle superfici di risposta	71
5.	Conclusioni	75
	Bibliografia e sitografia	77

Elenco delle figure

Figura 1.1 Distribuzione dei consumi energetici globali nel 2019 (Forbes, 2020).....	2
Figura 2.1 Classificazione delle alghe (Manoj Kumar Enamala et al., 2018)	5
Figura 2.2 Distribuzione delle compagnie produttrici di biomassa algale e dei sistemi di produzione in Europa. (a) Produzione di macro/microalghe, (b) macroalghe, (c) microalghe (Dos Santos Fernandes De Araujo Rita, 2019).	6
Figura 2.3 Distribuzione dei metodi di produzione delle microalghe (Rita Araujo et al., 2020).	7
Figura 2.4 Vasche per la coltivazione di microalghe (Rita Araujo, 2019)	8
Figura 2.5 Fotobioreattore verticale tubolare a serpentina (F.G. Acien et al., 2017).	9
Figura 2.6 Fotobioreattore a piastre (flat plate) (F.G. Acien et al., 2017).	9
Figura 2.7 Sacchetti in polietilene (Małgorzata Płaczek et al., 2017).	9
Figura 2.8 Fotobioreattore elicoidale a forma di troncopiramidale (gicon.de).....	9
Figura 2.9 Curva di crescita delle microalghe in un reattore discontinuo. Figura tratta da: https://slideplayer.it/slide/10971322/	10
Figura 2.10 Diagramma sintetico della bioraffineria delle microalghe (Munna Bhattacharya, Saswata Goswami, 2020).	13
Figura 2.11 Clorofille <i>a, b, c1, d, f</i>	15
Figura 2.12 Fucoxantina (Gaurav Rajauria, Nissreen Abu-Ghannam, 2013).....	16
Figura 2.13 Schema semplificato del frustulo di una diatomea (ISPRA Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Cosa sono le Diatomee, 2014).....	17
Figura 2.14 A sinistra l'immagine di una diatomea centrica, a destra di una pennata.	17
Figura 2.15 I tre morfotipi di <i>P. tricornutum</i>	19
Figura 2.16 Cellula fusiforme di <i>P. tricornutum</i> durante la divisione binaria.....	19
Figura 2.17 Ipotetico percorso metabolico del glicerolo durante la crescita mixotrofica di <i>P. tricornutum</i> (Villanova et al., 2017).	20
Figura 2.18 Rappresentazione grafica del dominio studiato nel DoE a 3 fattori su 2 livelli ciascuno.....	23
Figura 3.1 Incubatore da laboratorio utilizzato per la crescita di <i>P. tricornutum</i>	26
Figura 3.2 Spettrofotometro.....	27
Figura 3.3 Cappa di sicurezza biologica Esco Airstream Class II.	28
Figura 3.4 Bagno ad ultrasuoni.....	29
Figura 3.5 Vasca a ultrasuoni e sonda (Farid Chemat et al., 2017).	30
Figura 3.6 Centrifuga.	31
Figura 3.7 High Performance Liquid Chromatography.....	31
Figura 3.8 Retta di taratura per l'analisi HPLC della fucoxantina.	32
Figura 3.9 Curva di crescita di <i>P. tricornutum</i> a 20 °C.	34
Figura 3.10 Beute B1, B2, B5, B6 al primo giorno di crescita.....	36
Figura 3.11 Beute B1, B2, B5, B6 dopo 24 giorni di crescita	36
Figura 3.12 Curva di crescita di <i>P. tricornutum</i> a 25 °C.	37
Figura 3.13 Beute B3, B4, B7, B8 al primo giorno di crescita.....	38
Figura 3.14 Beute B3, B4, B7, B8 dopo 24 giorni di crescita.	38
Figura 3.15 Principio di funzionamento di un microscopio ottico (A. Di Gianfrancesco, 2017).	39
Figura 3.16 Cellule di <i>P. tricornutum</i> al microscopio ottico.	39
Figura 3.17 Raggruppamento di cellule con morfotipo ovale.	39
Figura 3.18 Coefficienti μ SP.	42
Figura 3.19 Superficie di risposta μ SP, Terreno-Glicerolo (T=20°C).....	42
Figura 3.20 Superficie di risposta μ SP, Terreno-Glicerolo (T=25°C).....	43
Figura 3.21 Superficie di risposta μ SP, Terreno-Temperatura (Gly 0,05 M).....	43

Figura 3.22	Superficie di risposta μ SP, Terreno-Temperatura (Gly 0,1 M).....	43
Figura 3.23	Superficie di risposta μ SP, Temperatura-Glicerolo (Terreno f/2).....	44
Figura 3.24	Superficie di risposta μ SP, Temperatura-Glicerolo (Terreno f/2 NaNO ₃ x10) ..	44
Figura 3.25	Coefficienti fucoxantina.	45
Figura 3.26	Superficie di risposta fucoxantina, Terreno-Glicerolo (Temperatura 20°C).....	46
Figura 3.27	Superficie di risposta fucoxantina, Terreno-Glicerolo (Temperatura 25°C).....	46
Figura 3.28	Superficie di risposta fucoxantina, Terreno-Temperatura (Gly 0,05 M).....	47
Figura 3.29	Superficie di risposta fucoxantina, Terreno-Temperatura (Gly 0,1 M).....	47
Figura 3.30	Superficie di risposta fucoxantina, Temperatura-Glicerolo (Terreno f/2).....	47
Figura 3.31	Superficie di risposta fucoxantina, Temperatura-Glicerolo (Terreno f/2 NaNO ₃ x10).	47
Figura 3.32	Superficie di risposta clorofilla <i>a</i> , Terreno-Glicerolo (Temperatura 20°C).....	48
Figura 3.33	Superficie di risposta clorofilla <i>a</i> , Terreno-Glicerolo (Temperatura 25°C).....	48
Figura 3.34	Superficie di risposta clorofilla <i>a</i> , Terreno-Temperatura (Gly 0,05 M).....	49
Figura 3.35	Superficie di risposta clorofilla <i>a</i> , Terreno-Temperatura (Gly 0,1 M).....	49
Figura 3.36	Superficie di risposta clorofilla <i>a</i> , Temperatura-Glicerolo (Terreno f/2).....	49
Figura 3.37	Superficie di risposta clorofilla <i>a</i> , Temperatura-Glicerolo (Terreno f/2 NaNO ₃ x10).	49
Figura 3.38	Superficie di risposta clorofilla <i>c</i> , Terreno-Glicerolo (Temperatura 20°C).....	50
Figura 3.39	Superficie di risposta clorofilla <i>c</i> , Terreno-Glicerolo (Temperatura 25°C).....	50
Figura 3.40	Superficie di risposta clorofilla <i>c</i> , Terreno-Temperatura (Gly 0,05 M).....	50
Figura 3.41	Superficie di risposta clorofilla <i>c</i> , Terreno-Temperatura (Gly 0,1 M).....	50
Figura 3.42	Superficie di risposta clorofilla <i>c</i> , Temperatura-Glicerolo (Terreno f/2).....	51
Figura 3.43	Superficie di risposta clorofilla <i>c</i> , Temperatura-Glicerolo (Terreno f/2 NaNO ₃ x10).	51
Figura 4.1	Principali caratteristiche dei NaDESs (Sanjeet Mehariya et al., 2021).....	52
Figura 4.2	Microwave-Assisted Extraction (MAE).....	53
Figura 4.3	Ultrasound- Assisted Extraction (UAE).....	54
Figura 4.4	Fattori che influenzano l'efficacia estrattiva dei NaDESs (Anuradha Saini et al., 2022).	56
Figura 4.5	Betaina (PubChem, 2023)..	59
Figura 4.6	Glicerolo (PubChem, 2023).....	59
Figura 4.7	Acido lattico (PubChem, 2023).....	60
Figura 4.8	Acido ottanoico (PubChem, 2023).....	60
Figura 4.9	Acido nonanoico (PubChem, 2023).	60
Figura 4.10	Acido laurico (PubChem, 2023).....	61
Figura 4.11	Acido levulinico (PubChem, 2023).....	61
Figura 4.12	Cloruro di benziltriethylammonio (PubChem, 2023).....	61
Figura 4.13	Mentolo (PubChem, 2023).....	62
Figura 4.14	Riscaldamento della miscela eutettica per la sintesi del NaDES.	62
Figura 4.15	NaDESs sintetizzati.	62
Figura 4.16	Bet-Gly 1:4.	64
Figura 4.17	BTEA-Lac 1:2.	64
Figura 4.18	Bet-Gly 1:2.	64
Figura 4.19	Lac-Bet 2:1.	64
Figura 4.20	BTEA-Oct 1:2.	64
Figura 4.21	Lac-Gly 1:1.....	64
Figura 4.22	Ment-Oct 1:1.	64
Figura 4.23	Ment-Lac 1:2.	64
Figura 4.24	Oct-Lau 3:1.....	64
Figura 4.25	Non-Lau 3:1.....	65

Figura 4.26 Ment-Lev 1:2.....	65
Figura 4.27 Riepilogo dei valori percentuali di fucoxantina estratta con ciascun NaDES.....	66
Figura 4.28 Grafico che rappresenta la variazione del logaritmo del determinante della matrice $X^T X$ al variare del numero di test.....	67
Figura 4.29 Risultati della fucoxantina (%) estratta in ogni test.....	70
Figura 4.30 Coefficienti fucoxantina (%).	71
Figura 4.31 Superficie di risposta fucoxantina, Temperatura-Solvente (5 min, semplice). ...	72
Figura 4.32 Superficie di risposta fucoxantina, Temperatura-Solvente (5 min, ultrasuoni)...	72
Figura 4.33 Superficie di risposta fucoxantina, Temperatura-Solvente (10 min, semplice). .	72
Figura 4.34 Superficie di risposta fucoxantina, Temperatura-Solvente (10 min, ultrasuoni). 72	72
Figura 4.35 Superficie di risposta fucoxantina, Temperatura-Solvente (20 min, semplice). .	72
Figura 4.36 Superficie di risposta fucoxantina, Temperatura-Solvente (20 min, ultrasuoni). 72	72
Figura 4.37 Superficie di risposta fucoxantina, Tempo-Solvente (25°C, semplice).	73
Figura 4.38 Superficie di risposta fucoxantina, Tempo-Solvente (25°C, ultrasuoni).....	73
Figura 4.39 Superficie di risposta fucoxantina, Tempo-Solvente (40°C, semplice).	73
Figura 4.40 Superficie di risposta fucoxantina, Tempo-Solvente (40°C, ultrasuoni).....	73
Figura 4.41 Superficie di risposta fucoxantina, Tempo-Solvente (50°C, semplice).	73
Figura 4.42 Superficie di risposta fucoxantina, Tempo-Solvente (50°C, ultrasuoni).....	73
Figura 4.43 Superficie di risposta fucoxantina, Temperatura-Tempo (Ment-Lev, semplice). 74	74
Figura 4.44 Superficie di risposta fucoxantina, Temperatura-Tempo (Ment-Lev, ultrasuoni)74	74
Figura 4.45 Superficie di risposta fucoxantina, Temperatura-Tempo (Non-Lau, semplice).. 74	74
Figura 4.46 Superficie di risposta fucoxantina, Temperatura-Tempo (Non-Lau, ultrasuoni). 74	74

Elenco delle tabelle

Tabella 2.1	Piano fattoriale con tre fattori ciascuno studiato su due livelli.	23
Tabella 3.1	Composizione del terreno di coltura f/2.	24
Tabella 3.2	Elementi presenti in tracce nei terreni di coltura f/2 ed f/2 NaNO ₃ x10.	24
Tabella 3.3	Vitamine presenti nei terreni di coltura f/2 ed f/2 NaNO ₃ x10.	25
Tabella 3.4	Composizione del terreno di coltura f/2 NaNO ₃ x10.	25
Tabella 3.5	Piano fattoriale per la crescita di <i>P. tricornutum</i>	25
Tabella 3.6	Piano fattoriale con i test di crescita a 20 °C.	26
Tabella 3.7	Piano fattoriale con i test di crescita a 25 °C.	26
Tabella 3.8	Programma di eluizione.	32
Tabella 3.9	Dati ottenuti con il software GraphPad PRISM 9 per la crescita a 20°C.	35
Tabella 3.10	Produttività di biomassa ottenuti dalla crescita a 20°C.	36
Tabella 3.11	Velocità di crescita e tempi di duplicazione ottenuti dalla crescita a 20°C.	36
Tabella 3.12	Dati ottenuti con il software GraphPad PRISM 9 per la crescita a 25°C.	37
Tabella 3.13	Risultati della crescita di <i>P. tricornutum</i> a 25 °C.	38
Tabella 3.14	Produttività di biomassa ottenuti dalla crescita a 25°C.	38
Tabella 3.15	Valori percentuali di fucoxantina ottenuti dall'analisi HPLC.	40
Tabella 3.16	Assorbanze rilevate per ogni test a 630 nm, 647 nm, 664 nm e 691 nm.	40
Tabella 3.17	Concentrazioni delle clorofille a e c ottenute dall'analisi spettrofotometrica.	41
Tabella 3.18	Coefficienti μSP.	41
Tabella 3.19	Coefficienti fucoxantina.	45
Tabella 4.1	NaDESs scelti per l'estrazione della fucoxantina.	58
Tabella 4.2	Densità dei NaDESs sintetizzati.	63
Tabella 4.3	Dati ottenuti dall'analisi HPLC.	65
Tabella 4.4	Riepilogo delle variabili operative testate.	66
Tabella 4.5	Riepilogo test da effettuare con estrazione semplice.	68
Tabella 4.6	Riepilogo test da effettuare con estrazione con ultrasuoni.	68
Tabella 4.7	Risultati della fucoxantina (%) estratta in ogni test.	70

Introduzione

La società odierna è strettamente dipendente dall'utilizzo dei combustibili fossili, ma questa fonte di energia, oltre a creare gravi danni ambientali dovuti all'effetto serra, è destinata ad esaurirsi. Fin dal 2015 con l'accordo di Parigi, l'Unione Europea, si sta impegnando nella costruzione di una bioeconomia sostenibile con l'obiettivo di raggiungere la neutralità climatica entro il 2050. È necessario a tal proposito diffondere l'utilizzo di energia proveniente da fonti rinnovabili in modo da limitare le emissioni di CO₂ e contrastare gli effetti negativi dei cambiamenti climatici ai quali stiamo già assistendo.

Tra le fonti di energia rinnovabile, stanno assumendo sempre maggiore interesse le biomasse, che costituiscono una potenziale soluzione al problema, ma i costi legati al processo di conversione in energia sono ancora elevati e ciò ostacola la competitività rispetto ai combustibili fossili. In questo contesto nasce il concetto di bioraffineria, ovvero la trasformazione della biomassa in bioenergia (biocarburanti) e in una gamma di prodotti ad elevato valore aggiunto, in modo da massimizzare il potenziale economico della biomassa di partenza (Bergeron et al., 2012).

Tra le biomasse che presentano maggiori vantaggi, vi sono quelle prodotte da colture microalgali. In fase di crescita le microalghe svolgono la duplice funzione di assorbire la CO₂ dall'atmosfera e produrre biomassa tramite il processo di fotosintesi. Dalla frazione lipidica della biomassa è possibile produrre biocarburanti e, simultaneamente, sfruttare gli altri componenti, quali carboidrati, acidi grassi a catena lunga, pigmenti e proteine per ricavare prodotti ad elevato valore commerciale. Questi prodotti trovano impiego in un ampio spettro di applicazioni come nella produzione di integratori alimentari, prodotti farmaceutici, cosmetici e biomateriali. Esistono dunque i presupposti per la creazione di una bioraffineria sostenibile, ma i limiti per l'espansione su larga scala riguardano le tecniche di coltivazione delle microalghe e i metodi di estrazione (Izabela Michalak, Katarzyna Chojnacka, 2015).

Questa tesi propone di studiare e monitorare la crescita della microalga *Phaeodactylum tricornerutum* in diverse condizioni operative col fine di determinare le condizioni che garantiscano la massima velocità di crescita e di produttività dei biocomposti utili. Il composto di interesse biotecnologico sul quale è stata posta l'attenzione in questo studio è la fucoxantina, un carotenoide appartenente alla classe delle xantofille, con importanti proprietà ed elevato valore commerciale (Hugo Pereira et al., 2021). Per l'estrazione della fucoxantina dalla biomassa algale sono stati testati alcuni Natural Deep Eutectic Solvents (NaDESS), solventi biologici ecocompatibili con elevate rese di estrazione. Questi solventi a differenza dei comuni solventi organici non costituiscono alcun danno per l'uomo o per l'ambiente e la loro resa di estrazione può essere incrementata associando tecniche come gli ultrasuoni o le microonde.

1. Concetto di bioraffineria

Secondo i dati forniti dall'Energy Institute circa il 90% dell'energia prodotta globalmente deriva da combustibili fossili e meno del 10% deriva da fonti rinnovabili ("Statistical Review of World Energy 2020"). È stato stimato che, se le nostre abitudini riguardo l'utilizzo dell'energia rimanessero invariate, le fonti fossili si esaurirebbero entro il 2050 (Hong-Wei Yen et al., 2012). Gli incentivi economici e i mandati legislativi emanati negli ultimi anni mirano a diffondere pratiche di economia circolare in tutti i settori industriali, con lo scopo di sostituire le fonti di energia non rinnovabili con energia a minor impatto, limitando così le emissioni di anidride carbonica, principali responsabili del riscaldamento globale.

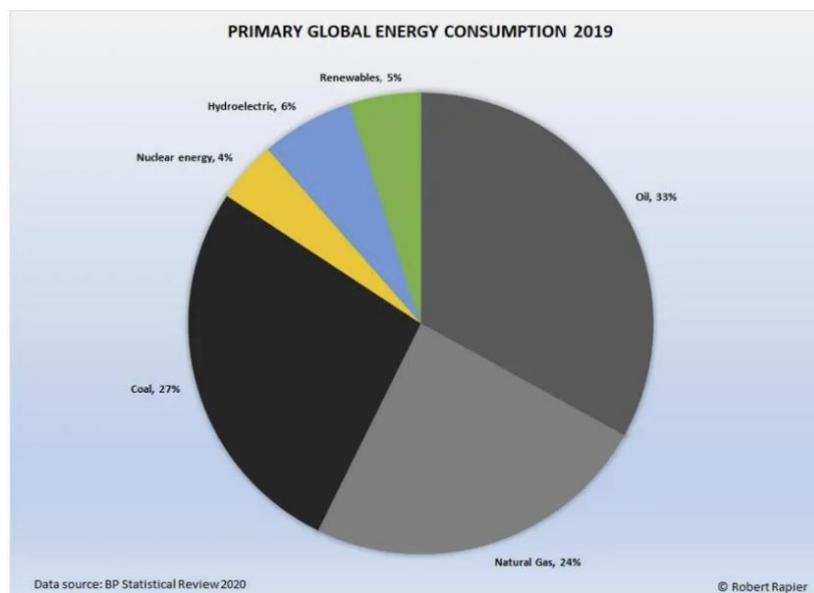


Figura 1.1: Distribuzione dei consumi energetici globali nel 2019 (Forbes, 2020).

La produzione di biocarburanti a partire da biomassa è già diffusa in molti paesi, ma con un contributo ben inferiore rispetto all'utilizzo dei combustibili fossili a causa degli elevati costi legati alla produzione della biomassa e ai processi di downstream. I biocarburanti sono ottenuti da componenti biologici, principalmente da microrganismi, piante, animali e rifiuti. Ciò che li accomuna sono la rinnovabilità, la disponibilità, la sicurezza energetica e la riduzione delle emissioni di CO₂.

Così come una classica raffineria ha lo scopo di trasformare il greggio in prodotti finali con valore commerciale, una bioraffineria ha lo scopo di valorizzare biomasse di scarto per ottenere energia pulita e prodotti ad elevato valore aggiunto. Si possono distinguere tre categorie di bioraffineria a seconda della biomassa di partenza. Ognuna di esse presenta dei vantaggi rispetto alle classiche raffinerie, tuttavia bisogna considerare gli impatti economici, sociali e ambientali associati all'uso dei diversi biocarburanti.

1.1. Bioraffineria di prima generazione

I biocarburanti di prima generazione vengono prodotti da materie prime coltivate, ricche in amido, zucchero e olio, come mais, orzo, grano, soia, segale, barbabietola da zucchero e canna da zucchero, utilizzando tecnologie come la fermentazione, la distillazione e la transesterificazione (I. Aberna Ebenezer Selvakumari et al., 2020). Questi carburanti, sebbene aprano una strada alternativa al petrolio, riducendo la produzione di CO₂, non sono economicamente e ambientalmente sostenibili, infatti, la produzione di gas serra è di poco inferiore al caso dei combustibili fossili in quanto le fasi di coltivazione, raccolta e lavorazione delle materie prime richiedono un grande apporto di energia, oltre all'uso di fertilizzanti e risorse idriche. Un altro problema posto sul piano etico è quello della concorrenza con la filiera alimentare, infatti, la produzione di biocarburanti a partire da materie prime destinate principalmente all'alimentazione comporta la riduzione del suolo destinato alle coltivazioni alimentari con relativo rialzo dei prezzi. Si rischierebbe così di avere una riduzione nell'approvvigionamento delle materie prime destinate all'uso alimentare, per far posto alla produzione di biocarburanti (S.N. Naik et al., 2010).

1.2. Bioraffineria di seconda generazione

I biocarburanti di seconda generazione vengono prodotti a partire da materie prime non commestibili, come i rifiuti agricoli, residui forestali, residui organici, rifiuti alimentari e industriali. Ciò costituisce un primo vantaggio rispetto alla bioraffineria di prima generazione poiché rimuove la competizione tra la filiera energetica e la filiera agricola. Inoltre, promuove un'economia circolare andando a ricavare prodotti utili ed energia da materiale di scarto sfruttando terreni di scarsa qualità dove le colture alimentari non riescono a crescere (I. Aberna Ebenezer Selvakumari et al., 2020). I costi di un biocarburante di seconda generazione, tuttavia, non sono ancora competitivi rispetto ai tradizionali carburanti derivanti dal petrolio, in quanto le fasi di pretrattamento delle materie prime e i processi di produzione richiedono ingenti quantità di acqua ed energia. Per espandere questa tipologia di biocarburanti è necessario sviluppare tecnologie avanzate per la conversione in modo da ridurre i costi e l'energia richiesta (S.N. Naik et al., 2010).

1.3. Bioraffineria di terza generazione

La più recente tipologia di bioraffineria è quella che vede come protagoniste le microalghe, organismi fotosintetici in grado di assorbire la CO₂ dall'atmosfera e utilizzarla per la loro crescita e per la produzione di biomassa. La biomassa algale è ricca di lipidi, macromolecole chiave nella produzione di biocarburanti, ma è anche ricca di altre sostanze, utilizzabili in numerose applicazioni industriali. Integrando la produzione di biocarburanti con l'estrazione di prodotti ad elevato valore commerciale a partire dalla stessa biomassa si rende il processo competitivo sul piano economico.

Per la loro crescita le microalghe assorbono la CO₂ mediante la reazione di fotosintesi, così come le piante terrestri, ma rispetto ad esse la velocità di crescita e la velocità di fissazione del carbonio è da 10 a 50 volte maggiore (Hong-Wei Yen et al., 2013). In questo modo è possibile sottrarre molta più anidride carbonica dall'ambiente producendo più biomassa e in tempi minori. Esistono migliaia di specie microalgali, ognuna delle quali presenta caratteristiche diverse e genera prodotti differenti. Per massimizzare la produzione di una determinata sostanza è necessaria la conoscenza approfondita dei prodotti sintetizzati da ogni specie (Gatamaneni Loganathan et al., 2017). In particolare, variando le condizioni di crescita delle microalghe si può favorire la produzione di un prodotto anziché un altro.

Tra i prodotti biologicamente attivi ottenibili dalla biomassa algale vi sono gli acidi grassi polinsaturi (PUFAs), le vitamine, i carotenoidi, i polifenoli, i polisaccaridi, gli amminoacidi e le proteine, i carboidrati e i lipidi (Sanjeet Mehariya et al., 2021). Questi prodotti trovano largo impiego in diversi settori industriali, in particolare quello alimentare, con la produzione di integratori e altri prodotti utili per la salute, ma anche nel settore farmaceutico e cosmetico.

Sebbene i biocarburanti ottenuti dalla biomassa algale siano un'alternativa promettente ai tradizionali carburanti, i costi di produzione sono ancora elevati, per questo sono in continua evoluzione le ricerche per migliorare e rendere economicamente competitivo questo processo.

2. Le alghe

Con il termine alghe ci si riferisce ad un ampio insieme di organismi eucariotici fotosintetici. Le alghe si trovano principalmente in ambienti acquatici, come mari, fiumi, laghi e stagni, ma possono anche essere presenti in ambienti terrestri umidi come suoli, rocce e tronchi di alberi.

La presenza di questi organismi negli ecosistemi acquatici è fondamentale in quanto, oltre ad essere la base della catena alimentare, assorbono il biossido di carbonio e mediante la fotosintesi producono una notevole quantità di ossigeno, inoltre aiutano a regolare la temperatura e la chimica dell'acqua.

La biomassa algale è stata sfruttata per secoli dalle comunità costiere trovando impiego come fertilizzante, mangime per il bestiame e cibo per l'uomo, ma negli ultimi decenni, lo studio approfondito di questi organismi ha notevolmente ampliato il loro campo di applicazione. Le cellule algali contengono una notevole quantità di polisaccaridi, circa il 20% in più rispetto alle piante terrestri e ciò le rende le principali fonti di bioenergia come il bioetanolo, il biodiesel o il biogas.

La classificazione delle alghe può basarsi su diversi principi: le dimensioni, la composizione biochimica o la struttura cellulare. Essendo una classe di organismi molto diversificata non è facile fornire una classificazione universale. Le continue scoperte scientifiche riguardanti le alghe hanno inoltre dato vita ad un continuo aggiornamento della loro suddivisione. Si riporta in Fig. 2.1 lo schema delle principali divisioni algali, con le rispettive classi e ordini.

Circa l'80% delle specie di alghe è unicellulare e prende il nome di microalga, il restante 20% è pluricellulare e viene chiamato macroalga (Dos Santos Fernandes De Araujo, 2019).

Le macroalghe possono essere classificate in base al colore dei pigmenti presenti nella loro biomassa dividendosi in: alghe verdi (*Chlorophyta*), alghe rosse (*Rhodophyta*) e alghe brune (*Phaeophyta*).

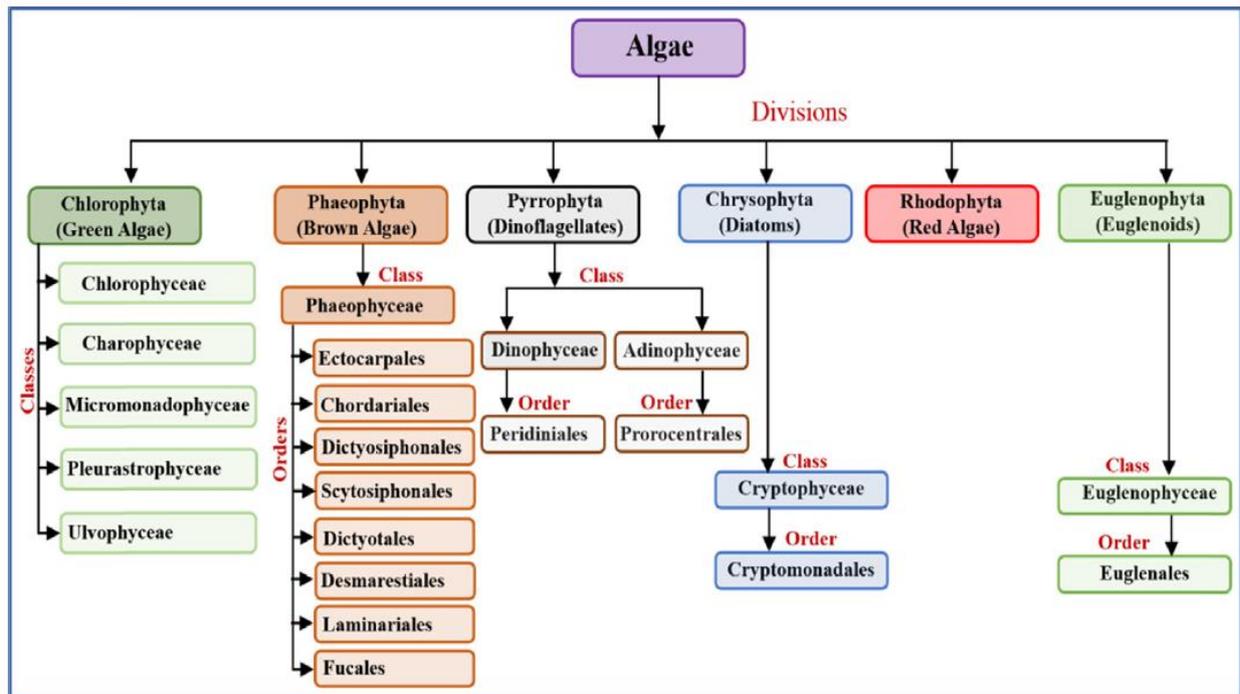


Figura 2.1. Classificazione delle alghe (Manoj Kumar Enamala et al., 2018).

Le macroalghe hanno dimensioni che possono raggiungere le decine di metri di altezza e grazie alla loro maggiore estensione possiedono un'area di assorbimento più ampia quindi una maggiore capacità di catturare inquinanti. Vengono spesso utilizzate per il sequestro della CO₂, mitigando così i cambiamenti climatici e fornendo al contempo prodotti alimentari, farmaceutici, carburanti e altri beni e servizi (Oscar Serrano et al., 2019). Oltre al colore dei pigmenti, le tre classi di macroalghe si differenziano anche per il contenuto e il tipo di carboidrati, proteine e lipidi presenti nella loro struttura.

Le macroalghe e le microalghe possiedono un grande potenziale ma l'espansione su scala industriale ad oggi è limitato da ostacoli normativi e tecnologici, come l'elevato consumo di acqua, energia e nutrienti durante la fase di coltivazione e alcuni ostacoli tecnici al recupero della biomassa oltre che dai costi operativi per l'estrazione e la purificazione. Inoltre, particolare attenzione va posta alla gestione delle acque reflue e al rischio di contaminazione microbica (European Commission's Knowledge Centre for Bioeconomy, 2019).

Per sfruttare il potenziale delle alghe è necessario colmare le lacune che si incontrano nel processo di coltivazione su larga scala, standardizzando i metodi di coltivazione e sviluppando tecniche di estrazione più economiche e sostenibili.

Nella figura 2.2 è riportata la distribuzione dei siti di produzione delle alghe, divise tra microalghe e macroalghe in Europa. Dei 144 siti produttivi europei il 57% è dedicato alla produzione di macroalghe e il restante 43% di microalghe. Gli stati con un maggior numero di siti produttivi di alghe si trovano in Francia, Spagna, Irlanda e Germania. In Europa 13 Paesi possiedono impianti dedicati alla produzione di microalghe. I maggiori produttori sono: Germania, Francia, Spagna, e Italia. Il fotobioreattore è il sistema maggiormente utilizzato per la loro produzione, seguito dalle vasche aperte e solo una piccola percentuale è rappresentata dai fermentatori. La produzione di macroalghe è generalmente collocata in zone costiere o offshore, in particolare nelle regioni atlantiche per la necessità di aree estese per la coltivazione, le microalghe invece possono essere prodotte in impianti sulla costa o nell'entroterra (Dos Santos Fernandes De Araujo, 2019).

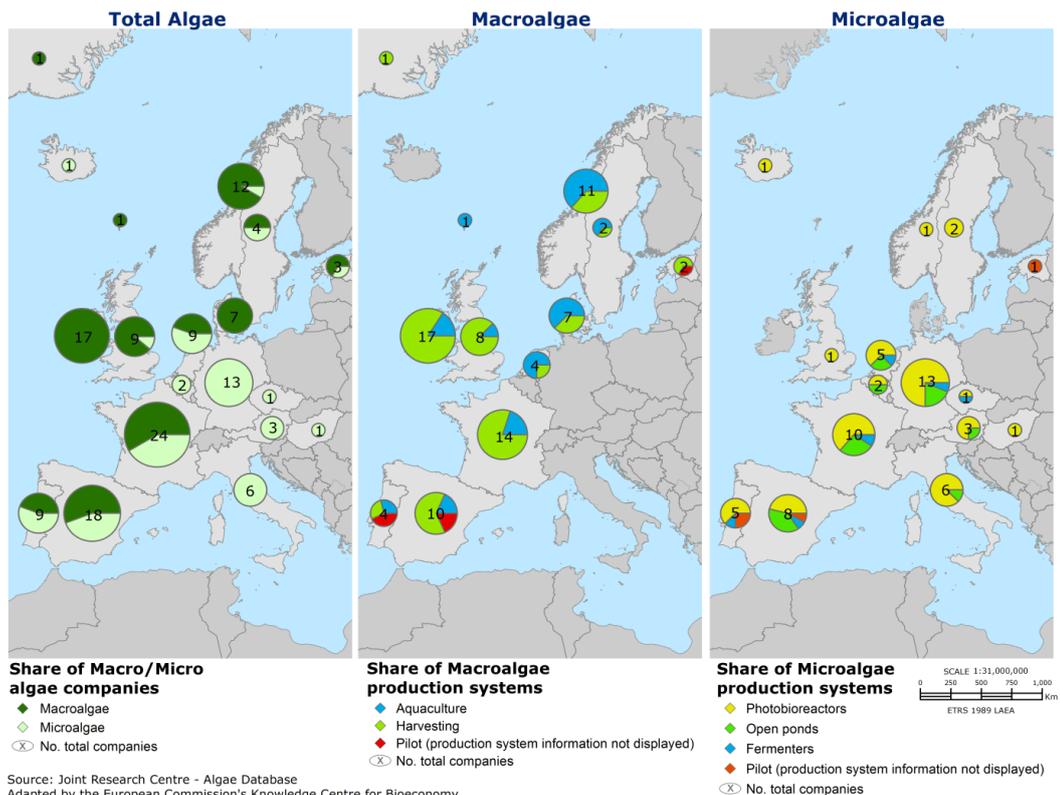


Figura 2.2: Distribuzione delle compagnie produttrici di biomassa algale e dei sistemi di produzione in Europa. (a) Produzione di macro/microalghe, (b) macroalghe, (c) microalghe (Dos Santos Fernandes De Araujo Rita, 2019).

2.1. Le microalghe

Vista l'importanza biologica e le numerose applicazioni delle microalghe, si descrivono in questo paragrafo le loro principali caratteristiche.

Le microalghe sono organismi unicellulari fotosintetici che svolgono un ruolo fondamentale negli ecosistemi acquatici come base della catena alimentare. Hanno dimensioni che possono variare da pochi micrometri a poche centinaia di micrometri. Possono vivere isolate o formare colonie e sono distribuite uniformemente in un ampio range di ecosistemi, sia acquatici che terrestri. Sono tra gli organismi più numerosi e resistenti in natura e costituiscono una potenziale materia prima per numerose applicazioni biotecnologiche e industriali (Sanjeet Mehariya et al., 2021).

Sono numerosi i vantaggi rispetto agli organismi vegetali, ad esempio velocità di crescita e produttività più elevate, capacità di adattamento ad ambienti che presentano condizioni estreme e possibilità di assimilare i nutrienti da fonti di scarto (Thomas Butler et al., 2020). Le microalghe inoltre richiedono un apporto ridotto di acqua e nutrienti, ad esempio, per produrre 1 kg di microalghe sono necessari 333 L di acqua a fronte dei 2204 L richiesti per produrre 1 kg di soia (Gatamaneni Loganathan et al., 2017). Un'altra caratteristica vantaggiosa è la maggior efficienza nel sequestro del carbonio atmosferico rispetto alle piante terrestri, alcune specie infatti possono arrivare a processare fino al 90% della CO₂ atmosferica (Vincenzo Michele Sellitto, 2021).

2.1.1. Strategie di coltivazione: fototrofia, eterotrofia, mixotrofia

Le microalghe sono organismi fotoautotrofi, ma molte di esse possono vivere in eterotrofia. Gli organismi fotoautotrofi utilizzano la luce solare per convertire la CO₂ e l'acqua in composti organici, ossigeno ed energia chimica, tramite il processo di fotosintesi. Gli organismi eterotrofi invece possono vivere in assenza di luce, ma necessitano di fonti di carbonio organiche da assimilare tramite la respirazione o la fermentazione. Se un organismo è in grado di assimilare carbonio organico ed allo stesso tempo utilizzare anche la luce come fonte di energia, allora la strategia di coltivazione è chiamata mixotrofia.

Durante la mixotrofia, è possibile che si verifichino delle variazioni delle vie metaboliche rispetto al caso in cui la crescita sia condotta in eterotrofia o fototrofia, il che può portare alla maggior produzione di un metabolita anziché un altro quindi, quando possibile, è importante selezionare un modus operandi che massimizzi la produzione del prodotto di interesse. Sebbene la produzione di microalghe tramite fototrofia sia una tecnica più economica poiché si sfrutta soltanto l'energia derivante dalla luce, essa presenta degli svantaggi come un minor quantitativo di biomassa prodotta. D'altro canto, non tutti i prodotti sono ottenibili per via eterotrofica, ad esempio i pigmenti, la cui produzione è strettamente collegata alla fotosintesi e quindi alla presenza di luce.

La mixotrofia è una valida alternativa poiché sfrutta l'effetto sinergico della presenza di luce e dei nutrienti, incrementando notevolmente la produttività e la velocità di crescita, e si mantiene la possibilità di ottenere prodotti fotosintetici di alto interesse commerciale che in eterotrofia non si produrrebbero (Caterina Celi et al., 2022). Per rendere la crescita ancor più competitiva sul piano economico è possibile utilizzare come fonte di carbonio organico le acque reflue o altre correnti di scarto. Occorre però tenere in considerazione che la scelta del tipo di strategia di coltivazione si basa sulla specie di microalga e sul prodotto di interesse.

2.1.2. Coltivazione delle microalghe su larga scala

A livello industriale le microalghe possono essere coltivate sfruttando differenti tecnologie, ad esempio, i fotobioreattori (71%), i fermentatori (10%) o le vasche aperte (19%).

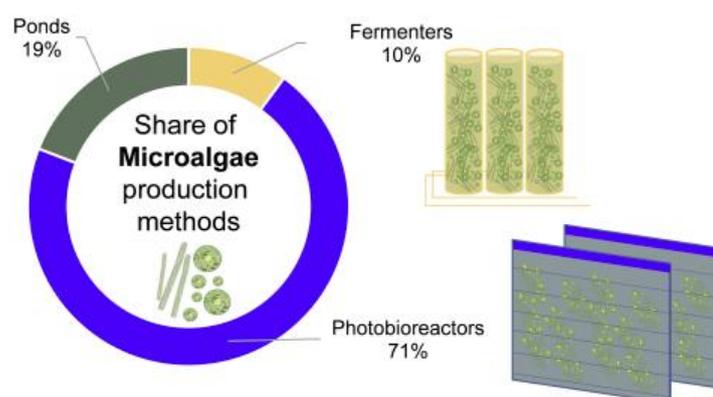


Figure 2.3: Distribuzione dei metodi di produzione delle microalghe (Rita Araùjo et al., 2020).

La coltivazione in *vasche aperte* richiede ampi spazi disponibili e condizioni climatiche favorevoli alla crescita delle alghe. Questa modalità di coltivazione è maggiormente utilizzata per la produzione di grandi volumi di composti a basso valore. Da un punto di vista economico, infatti, si hanno costi di investimento e costi operativi ridotti oltre che ad una minore spesa energetica, ma essendo un sistema aperto si ha un maggior rischio di contaminazione e un minor controllo delle condizioni operative (variazioni di temperatura e di esposizione alla luce durante la giornata). Queste caratteristiche non rendono il sistema delle vasche aperte adatto alla coltura su larga scala.



Figura 2.4: Vasche per la coltivazione di microalghe (Dos Santos Fernandes De Araujo Rita, 2019).

I *fermentatori* sono una tecnica di recente sviluppo utilizzata da circa il 10% dei produttori di microalghe. Con questo metodo le alghe vengono coltivate eterotroficamente fornendo zuccheri derivanti da composti organici come fonte di carbonio. È possibile, inoltre, coltivare le alghe in fototrofia o mixotrofia, utilizzando luce artificiale. Questi sistemi permettono di ottenere una maggiore produttività ed un miglior controllo della contaminazione e della qualità della biomassa durante le prime fasi di crescita.

Il sistema più diffuso in Europa è il *fotobioreattore* (PBR) che presenta diversi vantaggi ma vede associati alti costi di investimento e di gestione, nonché un elevato fabbisogno energetico. I fotobioreattori sono sistemi chiusi, che in quanto tali, permettono di avere un maggior controllo delle condizioni operative e un rischio ridotto di contaminazioni microbiche. Esistono varie tipologie di fotobioreattori che rendono questo sistema adatto a moltissime specie algali. Alcuni esempi sono i fotobioreattori tubolari (orizzontali, verticali, inclinati), sacchetti in polietilene (big bags), fotobioreattori a piastre (flat plates) e i fotobioreattori elicoidali a forma di cono troncopiramidale (Małgorzata Płaczek et al., 2017).

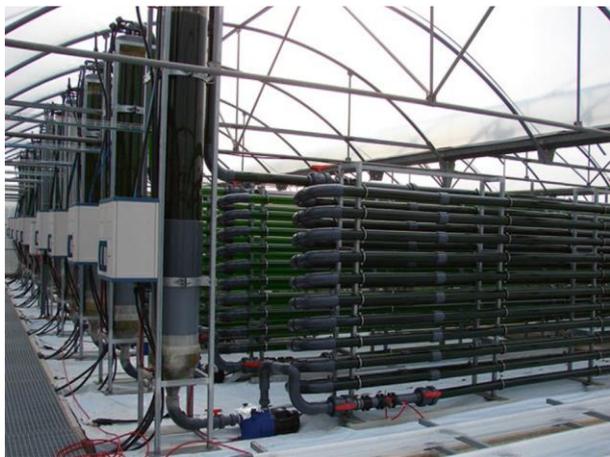


Figura 2.5: Fotobioreattore verticale tubolare a serpentina (F.G. Acién et al., 2017).



Figura 2.6: Fotobioreattore a piastre (flat plate) (F.G. Acién et al., 2017).



Figura 2.7: Sacchetti in polietilene (Małgorzata Placzek et al., 2017).



Figura 2.8: Fotobioreattore elicoidale a forma di troncopiramidale (gicon.de)

2.1.3. Curve di crescita delle microalghe

Le curve di crescita delle microalghe rappresentano il profilo di crescita nel tempo delle popolazioni di alghe. Queste curve possono fornire informazioni preziose sulla cinetica di crescita, il tasso di proliferazione e la fase di crescita delle microalghe.

Le curve di crescita classiche mostrano le diverse fasi della crescita di un microorganismo:

- 1) *Fase lag*: fase di adattamento caratterizzata da una lenta crescita.
- 2) *Fase log*: fase di crescita esponenziale caratterizzata da una rapida crescita, il numero di cellule aumenta in modo logaritmico nel tempo.
- 3) *Fase stazionaria*: il tasso di crescita si equilibra con il tasso di mortalità. In questa fase il numero di cellule rimane costante nel tempo.
- 4) *Fase di morte*: quando le condizioni ambientali diventano sfavorevoli, o se le risorse nutrienti sono esaurite, il numero di cellule diminuisce nel tempo.

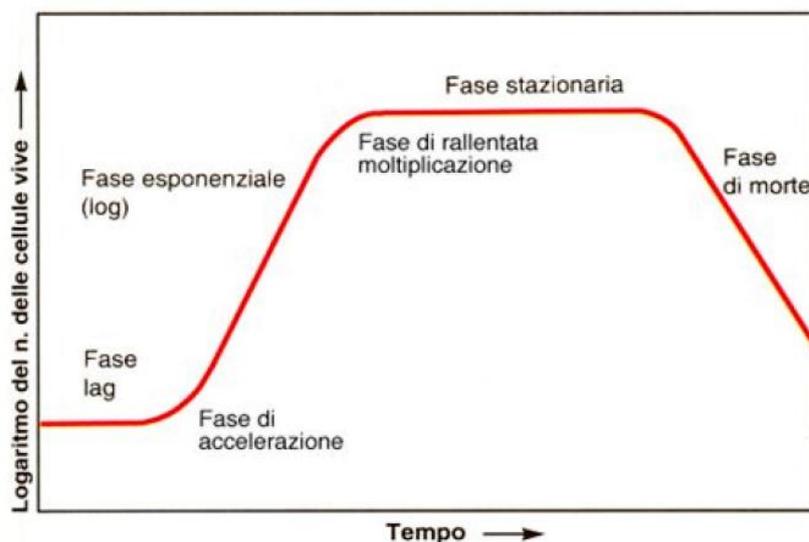


Figura 2.9: Curva di crescita delle microalghe in un reattore discontinuo. Figura tratta da: <https://slideplayer.it/slide/10971322/>

Per costruire la curva di crescita di una microalga coltivata in condizioni controllate si monitorano alcuni parametri come la densità cellulare, la concentrazione di un certo prodotto o la produzione di biomassa. I dati rilevati vengono posti su un grafico temporale e si visualizza l'andamento, che può variare in base alla specie microalgale, alle condizioni di processo (temperatura, intensità della luce, terreno di coltura e disponibilità di specifici nutrienti, pH) e alle modalità di coltivazione (in continuo, batch o semi-batch).

La curva di crescita ottenuta consente di ottenere, tramite formulazioni matematiche, importanti informazioni come la velocità massima di crescita, la velocità specifica di crescita e il tempo di duplicazione. Dall'interpretazione dei risultati ottenuti è possibile comprendere le condizioni ottimali di crescita e avere una migliore gestione delle colture in vista di uno scale-up a livello industriale.

2.1.4. Parametri di crescita

La tipologia di microalga va scelta con attenzione in base ai prodotti che si è interessati ad estrarre dalla biomassa, così come il tipo di terreno di coltura, i cicli di luce-buio, la temperatura e le altre condizioni operative.

I parametri che influenzano la crescita di una microalga sono suddivisibili in tre gruppi:

- *Fattori abiotici*: luce (intensità e lunghezza d'onda), temperatura, concentrazione dei nutrienti, ossigeno, anidride carbonica, pH, salinità e sostanze tossiche;
- *Fattori biotici*: agenti patogeni (batteri, funghi, virus), competizione con altre microalghe;
- *Fattori operativi*: intensità della miscelazione, rapporto tra la portata volumica e il volume del reattore, coltura continua o discontinua (Małgorzata Płaczek et al., 2017).

Si analizzano in dettaglio i principali fattori abiotici che intervengono nella fase di crescita.

- *Luce*

La luce è una fonte di energia fondamentale per la crescita dei microorganismi fotosintetici, grazie ad essa è possibile far avvenire la fotosintesi. Per garantire un'adeguata penetrazione della luce all'interno del fotobioreattore è importante definire un certo rapporto di area superficiale su volume, per questo fotobioreattori aventi geometria tubolare sono i più performanti sotto questo punto di vista. L'intensità di luce e i cicli buio-luce che consentono una crescita ottimale e una buona qualità della biomassa dipendono dalla specie microalgale.

L'apparato fotosintetico delle microalghe è costituito in maniera tale da far fronte ad un eventuale eccesso di energia rilasciando quest'ultima sottoforma di luce fluorescente o calore (Małgorzata Płaczek et al., 2017). In generale, l'aumento dell'intensità luminosa consente un aumento del tasso di crescita fino al raggiungimento di un valore di saturazione, oltre il quale viene favorita la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che sono nocive per le alghe in quanto coinvolte nel processo di fotoinibizione.

Durante la fotosintesi, le alghe utilizzano l'energia nella regione di spettro elettromagnetico compreso tra 400 e 700 nm. La radiazione compresa in questo campo, indicata come Radiazione Fotosinteticamente Attiva (PAR), può derivare da fonti luminose come il Sole, lampade o LED (F.G. Acien et al., 2017).

- *Temperatura*

Il range di temperatura ottimale per la crescita della maggior parte delle specie microalgali è compreso tra 20 °C e 35 °C. Al di sopra di queste temperature si rischia di accelerare la fase di morte delle cellule, per valori inferiori invece si ha una riduzione della velocità di crescita. Bisogna tenere conto che durante la crescita la temperatura tende a crescere in seguito all'assorbimento di energia derivante dalla fonte luminosa usata. Di conseguenza è necessario utilizzare sistemi di controllo della temperatura ed evitare surriscaldamenti ricorrendo all'uso di scambiatori, spray d'acqua o l'evaporazione dell'acqua (F.G. Acien et al., 2017).

- *Nutrienti*

I componenti principali che costituiscono la biomassa algale sono: il carbonio, l'azoto, e il fosforo, e in minor quantità K, Mg, S, Ca, Na, Cl, Fe, Zn, Cu, Mo, Mn, Co e B (Kamrul Hasan Chowdury et al., 2020). La presenza di questi elementi nel terreno di coltura, in determinate concentrazioni, è fondamentale per una crescita ottimale e per la produzione di specifiche sostanze. Generalmente le ricette dei terreni di coltura prevedono la presenza di nutrienti di due categorie: micronutrienti, presenti cioè in piccole quantità, e macronutrienti, presenti in maggior quantità. Il terreno di coltura è di solito arricchito di questi nutrienti in quantità superiori rispetto a quelle che si trovano in natura, in modo da non limitare la crescita delle microalghe. Tali elementi sono infatti coinvolti in processi biologici indispensabili per la crescita e la corretta funzionalità cellulare.

Il carbonio è il macronutriente più abbondante, in quanto coinvolto nelle principali vie metaboliche e costituente principale delle sostanze sintetizzate dalle cellule. Il carbonio inorganico (CO₂ e bicarbonati) viene assimilato tramite la diffusione o il trasporto attivo, e viene convertito nella reazione di fotosintesi:



Il carbonio organico invece viene fornito alle specie che possono crescere in mixotrofia per favorirne la crescita e la produttività, oppure in caso di eterotrofia.

L'azoto è un altro elemento fondamentale per la sintesi di proteine, acidi nucleici, vitamine e pigmenti. Può essere assimilato dalle microalghe sotto forma di N₂, oppure dalle fonti inorganiche NO⁻³, NO⁻², NO, NH⁺⁴, o organiche come l'urea o gli amminoacidi. Studi dimostrano che le diverse fonti di azoto non determinano una variazione del tasso di crescita. È stato inoltre osservato che la limitazione di azoto in alcune specie di microalghe, tra cui *P. tricornutum*, determina una diminuzione del contenuto di clorofilla di tipo *a*.

Il fosforo, invece, è coinvolto in attività metaboliche, come il trasferimento di energia e la sintesi degli acidi nucleici e lipidi. È importante determinare il rapporto N:P ottimale poiché influenza la produttività e la specie dominante nel terreno di coltura.

Inoltre, per una crescita adeguata, il terreno di coltura deve contenere anche i micronutrienti citati precedentemente. In particolare, il magnesio, coinvolto nel processo di fotosintesi, il ferro, anch'esso coinvolto nella fotosintesi e nel trasporto di elettroni, e lo zolfo (Kamrul Hasan Chowdury et al., 2020).

Per una classe microalgale in particolare, le diatomee, è essenziale anche la presenza del silicio, elemento che ne costituisce la parete cellulare (Industrial Plankton, 2023).

- *Mixing*

È importante mantenere la coltura in continua agitazione per evitare la sedimentazione delle cellule e favorire la distribuzione della CO₂, dell'ossigeno e dei nutrienti. Grazie a questo continuo movimento le cellule vengono spostate dalle zone di buio alle zone di luce, favorendo una simile esposizione alla luce (Małgorzata Płaczek et al., 2017).

La miscelazione può essere effettuata in diversi modi: mediante insufflaggio di aria, ricircolo del liquido tramite pompe o agitatori meccanici. In ogni caso il mixing comporta l'uso di energia e dunque costi aggiuntivi. Per ottenere il risultato desiderato ed evitare spese superflue è fondamentale definire un'opportuna intensità della miscelazione. Miscelazioni troppo spinte possono anche danneggiare le cellule e ridurre la crescita (F.G. Acien et al., 2017).

2.1.5. Prodotti e applicazioni delle microalghe

Saranno descritte in questo paragrafo le molecole presenti nella biomassa algale, la loro funzione biologica e le applicazioni in ambito industriale. La conoscenza di tali informazioni è indispensabile per lo sviluppo dei processi su larga scala che partano dalle microalghe e consentano la produzione di prodotti di interesse commerciale. Come si può notare dalla figura 2.10 la bioraffineria basata sulle microalghe presenta una sezione dedicata alla produzione di biocarburanti mediante diversi processi chimici, e una sezione dedicata all'estrazione di prodotti ad elevato valore aggiunto, a partire da lipidi, proteine, carboidrati e altri componenti della biomassa algale, trovando impiego in numerosi settori, tra cui quello alimentare, farmaceutico e cosmetico.

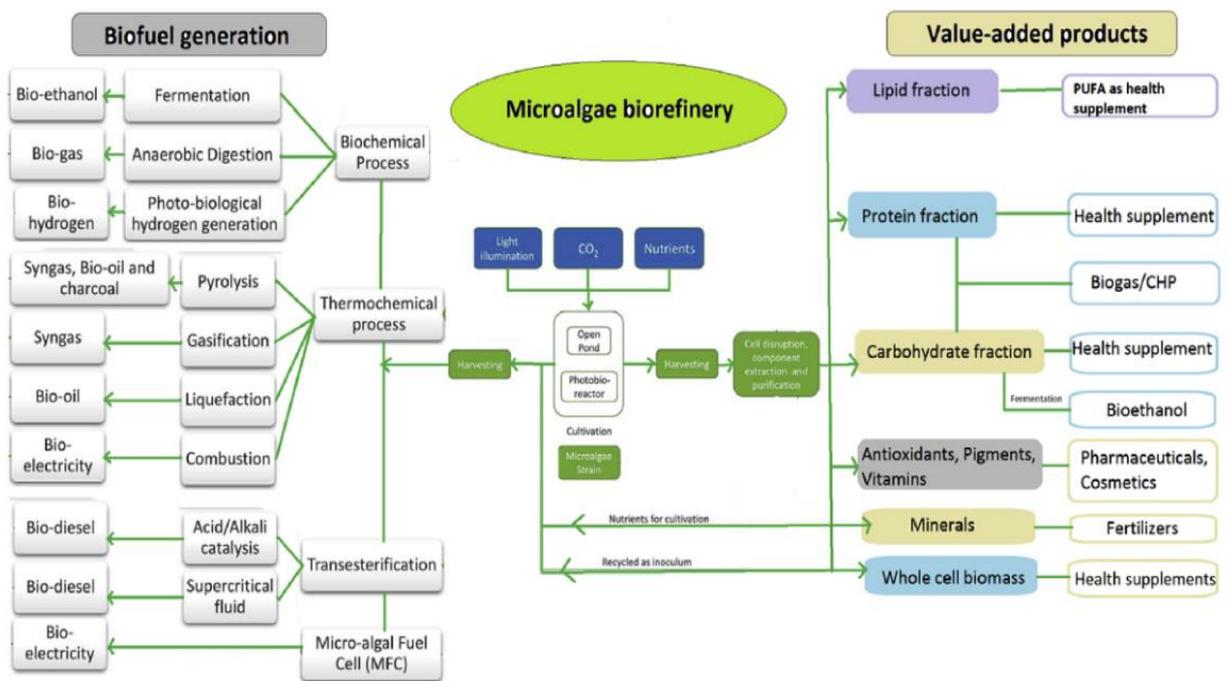


Figura 2.10: Diagramma sintetico della bioraffineria delle microalghe. (Munna Bhattacharya, Saswata Goswami, 2020).

Il contenuto di *proteine* nelle microalghe può assumere valori molto differenti, dal 10% al 70% del peso secco della biomassa, a seconda della specie e delle condizioni di crescita. Le proteine svolgono principalmente funzioni biologiche, strutturali e di riserva di azoto. Il contenuto di amminoacidi nelle microalghe è simile a quello delle tradizionali fonti proteiche come carne, uova e latte, che possono quindi essere integrate o sostituite, riducendo inoltre l'impatto ambientale causato dagli allevamenti. Oltre agli scopi alimentari e nutraceutici alcune proteine, come i peptidi bioattivi e le ficobiliproteine trovano impiego nell'ambito farmaceutico (Vincenzo Michele Sellitto, 2021). Le ficobiliproteine sono proteine fluorescenti di vari colori, che si formano dal legame di proteine idrosolubili con le ficobiline o i cromofori durante il processo di fotosintesi. Hanno un grande potenziale nel campo farmaceutico grazie alle loro proprietà antinfiammatorie, antiossidanti, antivirali e antitumorali, ma anche nell'ambito cosmetico e alimentare come coloranti (Izabela Michalak, Katarzyna Chojnacka, 2014).

Una frazione importante è costituita dai *carboidrati*, il cui contenuto può raggiungere il 60% del peso secco della biomassa in alcune specie microalgali. I carboidrati che costituiscono le microalghe sono principalmente glucosio, amido, cellulosa e altri polisaccaridi. L'amido è utilizzato nella produzione di bioetanolo e idrogeno, e come fonte di carbonio nelle fermentazioni industriali. I polisaccaridi di origine algale sono considerati prodotti ad elevato valore aggiunto che trovano applicazione in una moltitudine di settori come quello alimentare, cosmetico, tessile e farmaceutico. I polisaccaridi solforati, come i fucoidani e la carragenina, sono polimeri bioattivi che si trovano sulle pareti cellulari delle alghe, oltre ad applicazioni nel campo dei materiali, della cosmetica e alimentare presentano un grande potenziale nel campo farmaceutico, grazie alla loro azione antinfiammatoria, antimicrobica, antitumorale e antivirale (Hong-Wei Yen et al., 2012).

Un'altra classe di composti chiave sono i *lipidi*, tra cui gli acidi grassi, lipidi polari, lipidi non polari, triacilgliceridi (TAG), steroidi e ossilipine. Tutti i lipidi sono costituiti dagli acidi grassi, che svolgono funzioni molto importanti all'interno del nostro organismo e si distinguono in acidi grassi saturi o insaturi. Gli acidi grassi insaturi a loro volta si distinguono in monoinsaturi (MUFAs) e polinsaturi (PUFAs). La maggior parte degli acidi grassi può essere sintetizzato dal nostro organismo ad eccezione degli acidi grassi essenziali che devono essere introdotti mediante la dieta. Si distinguono due classi di acidi grassi essenziali, gli omega-3 (ω -3), che comprendono l'acido α -linolenico (ALA), l'acido stearidonico (SDA), l'acido eicosapentaenoico (EPA) e l'acido docosaesaenoico (DHA), e gli acidi grassi omega-6 (ω -6) tra cui l'acido γ -linolenico (GLA) e l'acido arachidonico (ARA) (Caterina Celi et al., 2022). L'assunzione di queste sostanze è particolarmente importante per la salute umana ma sono pochi gli alimenti che le contengono. Le alghe sono tra le poche fonti di omega-3, oltre al pesce, la cui quantità attualmente disponibile non è sufficiente a soddisfare l'intero fabbisogno mondiale (Sanjeet Mehariya et al., 2021). Infatti, solo 0,2 milioni di tonnellate di EPA/DHA sono ottenute da fonti ittiche, a fronte di 1,3 milioni di tonnellate necessarie per la popolazione mondiale. Questi dati sono stati forniti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità che raccomanda un'assunzione di omega-3 pari a circa 500 mg al giorno. Gli acidi grassi, in particolare gli omega-3, forniscono grandi benefici per la salute umana poiché possiedono proprietà antinfiammatorie che riducono il rischio di malattie cardiache e migliorano la vista e la funzionalità celebrale.

Il settore di applicazione più interessante per i lipidi algali è nella produzione di biodiesel, sebbene vi siano ancora numerosi ostacoli da superare, come la necessità di grandi quantità di biomassa, la bassa resa con le attuali tecniche, ma soprattutto gli elevati costi di produzione. Questo settore è ancora in fase di ricerca e necessita di nuove tecniche volte a massimizzare la resa e minimizzare i costi.

Le microalghe presentano tre classi di *pigmenti*: le clorofille, i carotenoidi e le ficobiliproteine. Le clorofille sono pigmenti in grado di assorbire l'energia luminosa ed effettuare la fotosintesi. Nelle microalghe troviamo cinque tipologie di *clorofille*, *a*, *b*, *c*, *d* ed *f*.

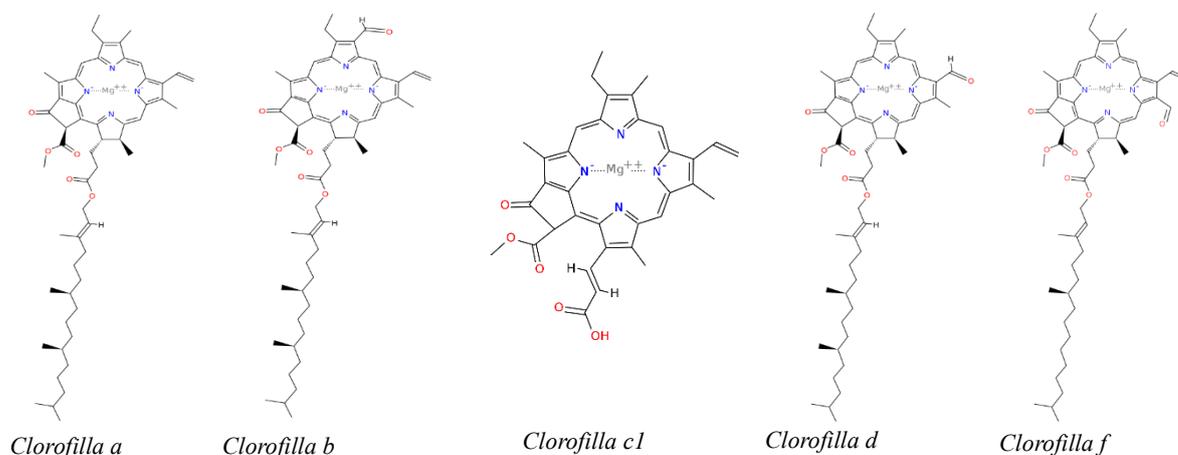


Figura 2.11: Clorofille *a*, *b*, *c1*, *d*, *f* (PubChem, 2023).

La struttura di questi pigmenti naturali comprende un anello porfirinico con un atomo di magnesio centrale e una lunga catena idrocarburica con la funzione di ancorare la molecola di clorofilla alle membrane tilacoidali dei cloroplasti. La clorofilla *a* è presente in tutti gli organismi fotosintetici, comprese le microalghe, ed è responsabile delle reazioni fotochimiche. La clorofilla *b* si trova principalmente nelle alghe verdi e nelle piante terrestri, come pigmento accessorio per facilitare la cattura dell'energia luminosa. La clorofilla *c* è anch'essa un pigmento accessorio che si trova solo in alcune tipologie di alghe, tra cui le diatomee. Le clorofille *d* ed *f* sono forme più rare presenti in specifiche specie microalgali (Vincenzo Michele Sellitto, 2021).

I *carotenoidi*, pigmenti liposolubili con azione antiossidante, sono utilizzati come coloranti naturali nell'industria alimentare, farmaceutica e cosmetica. Inoltre, offrono protezione alle microalghe da danni dovuti all'irradiazione e all'esposizione ai raggi UV e vengono impiegate sia a livello cosmetico nella formulazione di agenti anti-età, sia a livello medico per la cura e prevenzione di disturbi legati allo stress ossidativo, come diabete, obesità, tumori e infarti. Tra i carotenoidi più comunemente prodotti vi sono la luteina, astaxantina, β -carotene e zeaxantina.

Le *xantofille* appartengono al gruppo dei carotenoidi, pigmenti che svolgono un ruolo cruciale nella protezione dei cloroplasti dagli effetti dannosi dovuti all'eccesso di energia luminosa assorbita. Durante la fotosintesi, se le alghe assorbono una quantità di energia luminosa superiore rispetto alla loro capacità fotosintetica, può verificarsi la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) dannose per la cellula, poiché in grado di ossidare qualsiasi pigmento, lipide o proteina andando così a compromettere l'apparato fotosintetico (fotoinibizione).

Le xantofille permettono di dissipare l'energia luminosa in eccesso, evitando questo fenomeno (Caterina Celi et al., 2022). Fra le xantofille più interessanti vi è la fucoxantina, responsabile della colorazione bruna delle alghe che la contengono. La fucoxantina ha suscitato particolare interesse in ambito nutrizionale e farmaceutico per i numerosi benefici riscontrati sulla salute umana grazie alla sua funzione antiossidante, anticancerogena, antiobesità, antidiabetica (Runqing Yang et al., 2020).

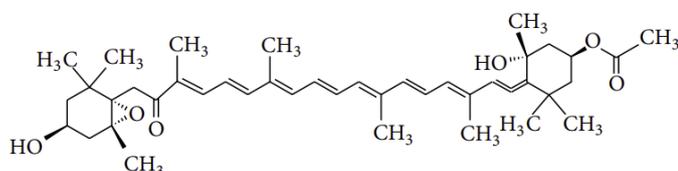


Figura 2.12: Fucoxantina (Gaurav Rajauria, Nissreen Abu-Ghannam, 2013).

In ambito industriale la fucoxantina viene principalmente ottenuta a partire dalle alghe brune, tuttavia, recenti studi sulle microalghe hanno dimostrato che esse sono in grado di accumulare fucoxantina con una concentrazione da 5 a 10 volte superiori rispetto alle macroalghe. Per questo motivo sono sempre di più gli studi volti ad ottimizzare la produzione di fucoxantina partendo dalla coltivazione di microalghe in fotobioreattori. La fucoxantina può essere prodotta anche per via sintetica ma questo metodo non è vantaggioso per una produzione su larga scala (Hugo Pereira et al., 2021).

Le microalghe sono un'importante fonte di *vitamine*, in particolare A, B1, B2, B3 (niacina), B6, B12, C, E, acido folico e acido pantotenico. Per favorire la produzione di vitamine sono necessarie fonti di azoto accessibili dalle microalghe (Munna Bhattacharya, Saswata Goswami, 2020).

La composizione delle cellule algali varia a seconda della specie e delle condizioni ambientali. È possibile dunque favorire la produzione di una sostanza attivando o interrompendo determinati percorsi metabolici ricorrendo all'ingegneria genetica oppure aumentando o limitando la presenza di specifici nutrienti. Ad esempio, per favorire la produzione di lipidi si può manipolare il metabolismo della cellula algale andando a diminuire la quantità di azoto.

2.2. Diatomee

La microalga oggetto di questa tesi è chiamata *Phaeodactylum tricornutum* ed appartiene alla classe delle diatomee.

Le diatomee sono alghe unicellulari non flagellate esistenti da più di 180 milioni di anni, di dimensioni comprese tra 1 μm e 200 μm . Costituiscono una delle classi di microalghe più abbondanti ed è coinvolta in importanti cicli biogeochimici, in particolare nella fissazione del carbonio, responsabile di più del 20% della produzione mondiale di ossigeno. Le diatomee inoltre sono la base della catena alimentare fornendo nutrimento alla maggior parte delle specie acquatiche (Caterina Celi et al., 2022). Sono organismi che si adattano molto velocemente alle diverse condizioni ambientali, possono infatti vivere sia in acque dolci che salate e in ambienti particolarmente estremi, questo grazie alla loro complessa storia evolutiva (Runqing Yang et al., 2020).

Sono costituite da una speciale parete cellulare, chiamata frustolo, composta da silice (biossido di silicio idrato) e da alcune proteine e carboidrati. Un'altra struttura unica delle diatomee è il plastidio, una membrana a quattro strati evolutasi dall'endosimbiosi secondaria tra un eucariota eterotrofo e un'alga rossa (Runqing Yang et al., 2020). Il frustolo delle diatomee si divide in due teche, una più grande, detta epiteca, e una più piccola, detta ipoteca. Le teche sono a loro volta costituite da una parte piatta orizzontale, detta valva, e un bordo laterale detto cingolo. Si parla dunque di ipovalva ed ipocingolo per la parte inferiore ed epivalva ed epicingolo per la parte superiore. Le due parti sono leggermente sovrapposte (UCL-London's Global University, *Diatoms*).

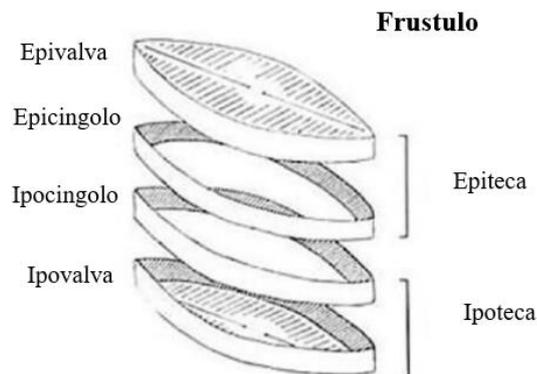


Figura 2.13: Schema semplificato del frustolo di una diatomea. (ISPRA Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, *Cosa sono le Diatomee*, 2014).

Le valve presentano sulla loro superficie una serie di ornamentazioni, come linee, pori, sporgenze e depressioni che permettono di distinguere e identificare le diverse specie. Le diatomee presentano forme e disegni molto diversi tra loro e ciò le rende fra le specie di microorganismi più diversificata.

Le diatomee si dividono in due ordini: le *Centrales* e le *Pennales*. Le diatomee centriche (*Centrales*) sono radialmente simmetriche, con un profilo circolare, triangolare o quadrato. Sono a loro volta divisibili in tre sottordini: *Coscinodiscineae*, *Rhizosoleniineae* e *Biddulphiineae*, che si distinguono in base alla loro forma e polarità. Le diatomee pennate (*Pennales*) sono bilateralmente simmetriche rispetto all'asse longitudinale, e hanno forma ellittica, bastoncennale o a navetta. Si suddividono in due sottordini: le *Fragilariineae* che presentano un rafe, sono infatti chiamate arafidi, e le *Bacillariineae* che invece presentano il rafe. Il rafe è una fessura che attraversa longitudinalmente la valva, a seconda della posizione si distinguono rafe assiali, eccentriche o circonferenziali. Il sistema del rafe permette di secernere del materiale mucillaginoso che consente, seppur limitata, una certa mobilità cellulare (UCL-London's Global University, *Diatoms*).

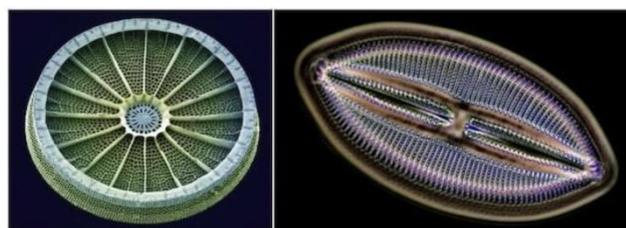


Figura 2.14: A sinistra l'immagine di una diatomea centrica, a destra di una pennata.

Le cellule delle diatomee contengono gli organuli tipici delle cellule eucariotiche. Tra questi vi sono i cloroplasti, gli organuli responsabili della fotosintesi, nei quali si trovano preziosi metaboliti come la clorofilla e pigmenti accessori come xantofille e caroteni.

Tra le macromolecole più abbondanti si trovano i carboidrati divisi in insolubili e solubili, i primi hanno funzione strutturale e li troviamo ad esempio nel frustulo, quelli solubili hanno funzione di deposito di energia e sono la crisolaminarina, i polisaccaridi extracellulari (EPS) e gli zuccheri liberi. La crisolaminarina, che costituisce il 10-20% del carbonio totale accumulato nella fase esponenziale, è prodotta durante il periodo di esposizione alla luce e consumata poi in quello di buio per alimentare il metabolismo eterotrofo (Caterina Celi et al., 2022).

Le diatomee trovano impiego in numerose applicazioni, grazie ai diversi prodotti che sono in grado di accumulare, i quali presentano importanti proprietà che possono portare a benefici per l'uomo e per l'ambiente. Alcuni esempi di sostanze sintetizzate dalle diatomee sono la crisolaminarina (ChrI), l'acido eicosapentaenoico (EPA) e la fucoxantina (Fx), utilizzate in acquacoltura, nell'alimentazione e nella produzione di farmaci e cosmetici.

Inoltre, le diatomee trovano impiego anche come bioindicatori per valutare la qualità dell'acqua negli ecosistemi acquatici. Un cambiamento nel numero e nella specie di diatomee può fornire informazioni circa le condizioni ambientali e il livello di inquinamento (ISPRA Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Cosa sono le Diatomee, 2014).

2.2.1. *Phaeodactylum tricornutum*

Phaeodactylum tricornutum è una diatomea marina ampiamente studiata nell'ambito della biochimica, della biologia molecolare e dei processi di bioraffineria per la sua capacità di sintetizzare composti ad alto valore aggiunto, come la fucoxantina, l'acido eicosapentaenoico (EPA) e l'acido docosaesaenoico (DHA). È considerata una specie adatta alla produzione su larga scala grazie alla sua elevata velocità di crescita e alla produzione di prodotti commercialmente rilevanti.

La sua composizione biochimica, su peso secco, presenta circa il 36.4 % di proteine, il 26.1 % di carboidrati, il 18.0 % di lipidi, e il 15.9 % di ceneri, tuttavia, questa può variare in base alle condizioni di crescita. L'interesse è in particolare rivolto al suo utilizzo nella produzione di biocarburanti a partire dai lipidi che questa diatomea è in grado di sintetizzare (Caterina Celi et al., 2022). Le dimensioni di ogni cellula vanno dai 5 ai 10 micrometri.

Il suo genoma è stato completamente sequenziato nel 2008, ciò ha permesso di comprendere i percorsi biosintetici che portano alla produzione di composti di interesse commerciale come la fucoxantina e l'acido eicosapentaenoico (EPA), e i meccanismi di regolazione in caso di esposizione a determinate condizioni ambientali. Grazie a queste informazioni è stato possibile valutare le condizioni ottimali di crescita e l'influenza dei fattori esterni sulla sintesi di prodotti ad elevato valore (Runqing Yang et al., 2020).

Una caratteristica che la distingue dalle altre diatomee è la presenza di tre morfotipi diversi: fusiforme, triradiata, e ovale. Recenti studi dimostrano la presenza di un quarto morfotipo più raro, detto cruciforme. Il morfotipo più comune è il fusiforme ed è anche il più rilevante dal punto di vista commerciale per il suo elevato tasso di crescita e per la maggiore attività antibatterica rispetto al morfotipo ovale, attribuibile al contenuto di EPA, acido esadecatrienoico e acido palmitoleico (Thomas Butler et al., 2020). Si può avere la transizione da una forma all'altra al variare delle condizioni di crescita quali temperatura, pH, salinità e tipologia di terreno di coltura. Diversi morfotipi presentano diverse composizioni biochimiche, è possibile dunque sfruttare questa caratteristica per favorire la produzione di una sostanza anziché un'altra.

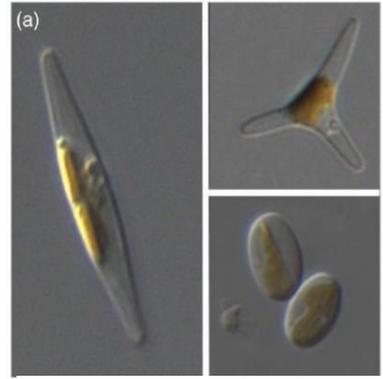


Figura 2.15: I tre morfotipi di *P. tricornutum* (Assaf Vardi et al., 2008).

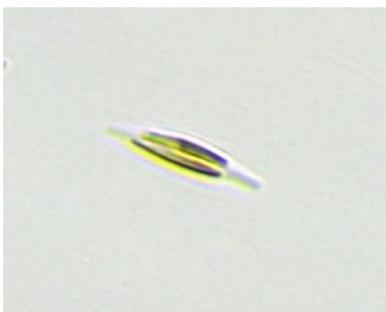


Figura 2.16: Cellula fusiforme di *P. tricornutum* durante la divisione binaria.

Le diatomee si riproducono per divisione binaria, processo in cui la cellula madre si divide in due cellule figlie identiche. Di seguito viene riportata la foto di una cellula di *P. tricornutum* durante il processo di scissione binaria, scattata durante la fase di crescita esponenziale.

2.2.2. Condizioni ottimali di crescita per *P. tricornutum*

Il processo di coltivazione di *P. tricornutum* è influenzato da diversi parametri operativi, quali l'intensità della luce, la temperatura e i nutrienti. Variando questi parametri è possibile incrementare la velocità di crescita e ottimizzare la produzione di composti di interesse.

È in grado di crescere in fototrofia, mentre la strategia di coltivazione in eterotrofia per questa specie di microalga è possibile solo ricorrendo all'ingegneria genetica. Quindi, la modalità di coltivazione più promettente per questa microalga è costituita dalla mixotrofia, che permette di beneficiare dell'effetto sinergico dato dalla luce e dalla fonte di carbonio organico, incrementando così la produttività e arricchendo la biomassa di preziosi metaboliti.

L'illuminazione influenza primariamente la produzione di biomassa e la sua composizione, per questo è importante determinare l'intensità luminosa, la lunghezza d'onda e il periodo di luce:buio più opportuno. Per *P. tricornutum* è stato dimostrato che aumentando l'intensità luminosa è possibile incrementare la produzione di DHA e dei carboidrati, dato che la loro degradazione avviene in assenza di luce, mentre a basse intensità luminose si rileva un incremento di fucoxantina (Wei Ding et al., 2023). La fucoxantina, essendo un pigmento in grado di catturare l'energia luminosa, viene naturalmente sintetizzato dalle microalghe quando si trovano in condizioni di scarsa luminosità, in modo da aumentare la loro capacità di catturare la luce.

La temperatura ottimale di crescita per *P. tricornutum* è di 21°C, è quindi importante mantenere la temperatura vicino a questo valore durante tutta la crescita per evitare la degradazione cellulare e una diminuzione della produttività.

Anche la fonte di carbonio utilizzata è un parametro importante che influenza la crescita di *P. tricornutum*. Sono state testate diverse fonti di carbonio per la crescita mixotrofica di questa diatomea, come il glucosio, l'acetato, il fruttosio e il glicerolo, ed è emerso che il glicerolo è quella più adatta per la sua crescita in mixotrofia, in quanto permette di raggiungere una maggiore produttività di biomassa e contenuto lipidico (Thomas Butler et al., 2020).

Nel processo di produzione del biodiesel, uno dei maggiori sottoprodotti è proprio il glicerolo, che può essere utilizzato come fonte di carbonio per *P. tricornutum*. In questo modo si trasforma un prodotto di scarto in una risorsa fondamentale per la crescita di questa diatomea, ottimizzando il processo sia da un punto di vista economico che di sostenibilità.

È ipotizzato che il glicerolo entri nelle vie metaboliche di *P. tricornutum* convertendosi in glicerolo fosfato ad opera dell'enzima glicerolo chinasi, il quale costituisce il precursore per la sintesi dei trigliceridi, favorendo quindi la sintesi di lipidi. Il glicerolo inoltre è convertito, ad opera della glicerolo-3-fosfato deidrogenasi, in diidrossiacetone fosfato che entra nel metabolismo del carbonio centrale attraverso la glicolisi e la via del pentoso fosfato (PPP).

In figura 2.16 viene schematizzato l'ipotetico percorso metabolico del glicerolo durante la crescita mixotrofica di *P. tricornutum*.

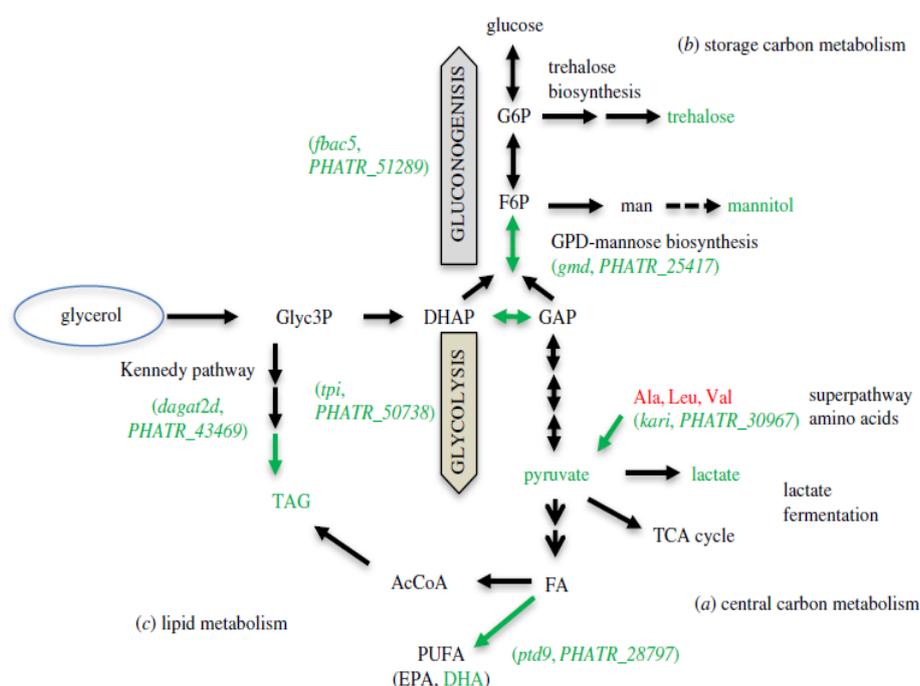


Figura 2.17: Ipotetico percorso metabolico del glicerolo durante la crescita mixotrofica di *P. tricornutum*. (Villanova et al., 2017).

La crescita di *P. tricornutum* è stata studiata utilizzando diverse concentrazioni di glicerolo nel terreno di coltura, in particolare 0,005 M, 0,01 M 0,05 M e 0,1 M. È emerso che la concentrazione iniziale ottimale di glicerolo è 0,1 M. Per concentrazioni di glicerolo più elevate è stata rilevata una lag phase, un periodo di adattamento, che aumenta all'aumentare della concentrazione, e determina un rallentamento della crescita microalgale (M.C. Cerón García et al., 2000).

La composizione del terreno di coltura, oltre ad influenzare la crescita microalgale, può produrre modificazioni nella composizione biochimica della biomassa risultante. Per esempio, è stato dimostrato che ridurre la concentrazione di azoto nel terreno di coltura è il metodo più efficace per favorire l'accumulo di lipidi nelle microalghe, ma anche per modificare la composizione lipidica da acidi grassi liberi al triacilglicerolo (TAG) (Widjaja et al., 2009). L'aumento della quantità di azoto invece incrementa la produzione di fucoxantina (Gao Baoyan et al., 2017). La sintesi della fucoxantina è influenzata anche dalla durata della coltivazione, in particolare all'aumentare della durata si ha un rallentamento della produzione. Inoltre, la crescita cellulare e la produzione di fucoxantina non sono direttamente correlate, infatti, le migliori condizioni di crescita non sempre portano ad una più elevata produzione di questo prodotto.

2.3. Design of Experiment

Il Design of Experiment (DoE) è una metodologia statistica focalizzata sulla pianificazione, esecuzione, analisi e interpretazione di esperimenti eseguiti in condizioni controllate. Lo scopo del DoE è ottimizzare i risultati dei test e acquisire una comprensione approfondita dei fattori che influenzano una variabile di risposta specifica. Questo potente strumento sta assumendo un'importanza sempre maggiore nell'ambito della ricerca scientifica, dell'ingegneria e della produzione poiché permette di ridurre le tempistiche della fase sperimentale e il quantitativo dei reagenti necessari. Bisogna distinguere due tipologie di variabili: variabili indipendenti, dette fattori, determinate in base alle ipotesi del problema e che possono influenzare il risultato del test, e la variabile dipendente, ovvero la risposta che si vuole studiare. Possono esserci diversi livelli dei fattori, ovvero diversi valori che i fattori possono assumere. Una volta definite le variabili e i livelli si definisce il piano fattoriale, che presenta tutte le possibili combinazioni dei livelli dei fattori da considerare in ogni esperimento. A questo punto si procede effettuando i test definiti dal piano, ripetendo gli esperimenti più volte (replicati) per incrementare l'affidabilità dei risultati ottenuti. Si parla di fattoriale completo se si decide di studiare tutte le combinazioni possibili, se invece si studia solo una parte delle combinazioni possibili si parla di fattoriale frazionato. Uno dei vantaggi del DoE è che tiene conto dell'effetto combinato di più fattori contemporaneamente, al contrario dell'approccio OFAT (one factor at a time) in cui si varia un fattore alla volta, perdendo così informazioni utili circa l'influenza che può esercitare la variazione simultanea di due o più fattori, chiamata *interazione*. Questo avviene quando la differenza nella risposta tra i livelli di un fattore non è la stessa a tutti i livelli degli altri fattori e quindi c'è un'interazione tra i fattori. L'effetto di un fattore è dunque definito come il cambiamento nella risposta provocato da un cambiamento nel livello del fattore.

Per determinare l'effetto dei fattori sulla variabile di risposta e individuarne le combinazioni ottimali, i risultati dei test vengono analizzati mediante strumenti statistici (ANOVA e metodi statistici associati) che consentono una migliore comprensione del comportamento del sistema e la sua ottimizzazione (Jankovic et al., 2021).

L'iter procedurale tipico del Design of Experiment è quindi il seguente:

1. Selezione dell'obiettivo di studio;
2. Scelta dei fattori (variabili indipendenti) da investigare e dei loro valori (livelli);
3. Selezione della/e risposta/e (variabile dipendente);
4. Scelta del modello matematico;
5. Scelta del piano sperimentale;
6. Esecuzione dei test sperimentali;
7. Analisi dei dati;
8. Calcolo del modello matematico, validazione e valutazione della capacità predittiva.

Con l'uso di alcuni software è possibile effettuare agevolmente operazioni matematiche, anche molto complesse, che consentono di costruire il modello matematico che descrive la variazione della risposta (Y) al variare dei fattori. Nel caso di due fattori, il più semplice dei modelli matematici è il seguente:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \varepsilon \quad (2.1)$$

Dove X_1 e X_2 sono i fattori, β_1 , β_2 , β_{12} , β_{11} e β_{22} sono i coefficienti dei fattori, dell'interazione e dei termini quadratici, ε è l'errore sperimentale e β_0 è l'intercetta. Lo scopo finale è quello di ottenere per ogni risposta studiata una *superficie di risposta* nel dominio investigato (delineato cioè dai valori dei fattori) costruita in base ai risultati dei test sperimentali effettuati. I coefficienti sono quindi stimati dal modello attraverso i test. In questo modo è possibile ricercare le condizioni operative che determinino il raggiungimento dell'obiettivo individuato al punto 1, che varia a seconda del caso di studio. Ad esempio, è possibile che si vogliano trovare le condizioni che massimizzino la risposta oppure che la minimizzino; oppure ancora è possibile che si voglia ridurre la variabilità della risposta etc. Questo dimostra anche l'estremamente vasta applicazione che possiede il DoE.

In questo caso si è scelto di costruire un piano fattoriale completo costruito seguendo la nomenclatura delle combinazioni dei livelli di fattori. Esempio di piano fattoriale con tre fattori (A, B, C) ciascuno studiato a due livelli, uno alto (+) e uno basso (-).

$$\text{Numero esperimenti (livelli)}^{Fattori} = 2^3 = 8 \text{ test} \quad (2.2)$$

Test	A	B	C	Combinazione
1	-	-	-	(-1)
2	+	-	-	a
3	-	+	-	b
4	+	+	-	ab
5	-	-	+	c
6	+	-	+	ac
7	-	+	+	bc
8	+	+	+	abc

Tabella 2.1: Piano fattoriale con tre fattori ciascuno studiato su due livelli.

Il cubo riportato di seguito mostra il dominio studiato con i test, in cui ogni fattore (A, B, C) è studiato su due livelli.

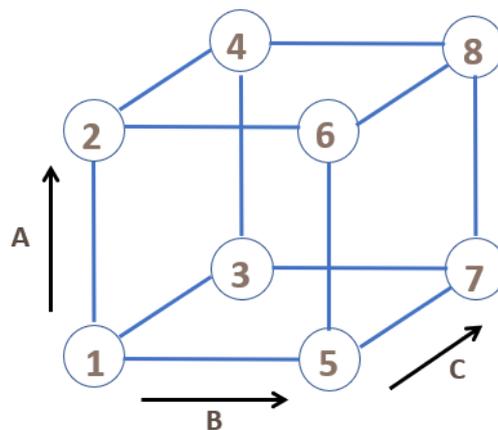


Figura 2.18: Rappresentazione grafica del dominio studiato nel DoE a 3 fattori su 2 livelli ciascuno.

3. Crescita di *Phaeodactylum tricornutum* e caratterizzazione della biomassa

3.1. Materiali e Metodi per la crescita

In questo capitolo sono descritte le procedure di laboratorio effettuate per la preparazione della coltura e il monitoraggio della crescita della diatomea *P. tricornutum*.

3.1.1. Composizione dei terreni di coltura

Per iniziare la crescita della microalga è stato inserito l'inoculo di *Phaeodactylum tricornutum* proveniente dalla collezione scozzese CCAP 1055/18, nel terreno di coltura precedentemente preparato con rapporto 1:10, in beute da 0,5 L. In particolare, sono stati testati due terreni di coltura diversi per la crescita: il terreno f/2 (Guillard and Ryther, 1962) e un terreno arricchito in nitrati f/2 NaNO₃ x10.

Terreno di coltura f/2

Riportiamo nella tabella 3.1 la composizione del terreno di coltura f/2 in 1 L di medium.

Stock nutrienti	Concentrazione (g/L)
NaNO ₃	0,075
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0,00565
Elementi in tracce	Tab. 3.2
Soluzione vitaminica	Tab. 3.3

Tabella 3.1: Composizione del terreno di coltura f/2.

Gli elementi presenti in tracce e la soluzione di vitamine sono riportati nelle tabelle sottostanti.

Nutriente	Concentrazione in 1 L di medium (g/L)
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	4,60E-03
FeCl ₃ · 6H ₂ O	3,15E-03
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2,20E-05
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1,00E-05
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1,80E-04
CoCl ₂ · 6H ₂ O	1,00E-05
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	6,00E-06

Tabella 3.2. Elementi presenti in tracce nei terreni di coltura f/2 ed f/2 NaNO₃ x10.

Nutriente	Concentrazione (g/L)
Tiamina HCl (vitamina B1)	1,00E-04
Biotina (vitamina H)	5,00E-07
Cianocobalamina (vitamina B12)	5,00E-07

Tabella 3.3: Vitamine presenti nei terreni di coltura f/2 ed f/2 NaNO₃ x10.

Terreno di coltura f/2 NaNO₃ x10

La composizione del terreno di coltura f/2 NaNO₃ x10 è la medesima, con la differenza che la quantità di nitrati viene incrementata di dieci volte come riportato in tabella 3.4.

Stock nutrienti	Concentrazione (g/L)
NaNO ₃	0,75
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0,00565
Elementi in tracce	Tab. 3.2
Soluzione vitaminica	Tab. 3.3

Tabella 3.4: Composizione del terreno di coltura f/2 NaNO₃ x10.

3.1.2. Design of Experiment

Per definire il numero di esperimenti da effettuare, in modo da testare tutte le possibili combinazioni di temperatura, tipologia di terreno di coltura e quantità di glicerolo, è stato stilato un Design of Experiment, come descritto precedentemente.

In questo caso sono stati definiti 3 fattori da studiare a 2 livelli ciascuno: la temperatura (20°C e 25°C), la tipologia di medium (f/2 e f/2 NaNO₃ x10) e la concentrazione di glicerolo (0,05 M e 0,1 M). Gli esperimenti complessivi da eseguire sono riportati nel piano fattoriale di seguito:

$$Livelli^{Fattori} = 2^3 = 8 \text{ test} \quad (3.1)$$

N test	Glicerolo (M)	Temperatura (°C)	Terreno di coltura
1	0,05	20	f/2
2	0,1	20	f/2
3	0,05	25	f/2
4	0,1	25	f/2
5	0,05	20	f/2 NaNO ₃ x 10
6	0,1	20	f/2 NaNO ₃ x 10
7	0,05	25	f/2 NaNO ₃ x 10
8	0,1	25	f/2 NaNO ₃ x 10

Tabella 3.5: Piano fattoriale per la crescita di *P. tricornutum*

Le beute, una volta inoculate, sono state poste a crescere in un incubatore agitato che mantiene costante la temperatura, pari a quella impostata dall'utente; quindi, sono stati eseguiti prima gli esperimenti a 20 °C successivamente quelli a 25°C. Nelle tabelle sottostanti, si riporta la suddivisione dei test:

T= 20°C		
N test	Glicerolo (M)	Terreno di coltura
1	0,05	f/2
2	0,1	f/2
5	0,05	f/2 NaNO ₃ x 10
6	0,1	f/2 NaNO ₃ x 10

Tabella 3.6: Piano fattoriale con i test di crescita a 20 °C.

T= 25°C		
N test	Glicerolo (M)	Terreno di coltura
3	0,05	f/2
4	0,1	f/2
7	0,05	f/2 NaNO ₃ x 10
8	0,1	f/2 NaNO ₃ x 10

Tabella 3.7: Piano fattoriale con i test di crescita a 25 °C.

3.1.3. Apparecchiature utilizzate

Come definito dal DoE sono state preparate 4 beute da 0,5 L con 0,18 L di terreno di coltura e 0,018 L di inoculo (1:10) per un totale di 0,198 L. Le beute sono state inserite in un incubatore per 24 giorni ed è stata monitorata la crescita misurando a giorni alterni l'assorbanza tramite uno spettrofotometro.

Incubatore



Figura 3.1: Incubatore da laboratorio utilizzato per la crescita di *P. tricornutum*

L'incubatore da laboratorio è un apparecchio utilizzato per condurre colture cellulari microbiche poiché in grado di mantenere una temperatura costante e di agitare le beute in modo da favorire la distribuzione omogenea dei nutrienti evitando la loro sedimentazione. La temperatura impostata nell'incubatore è stata di 20 °C per il primo set di esperimenti e 25°C per il secondo set, mentre l'agitazione è stata fissata a 130 rpm per entrambi i set. L'incubatore è provvisto di un coperchio trasparente che permette di visualizzare le beute contenute al suo interno e le espone alla luce. È stata posizionata una lampada LED (20 W 220-240V/50Hz) impostando un ciclo luce:buio di 16:8 h, ottimale per la crescita di *P. tricornutum*.

Spettrofotometro



Figura 3.2: Spettrofotometro.

Per monitorare la crescita è stata utilizzato un metodo turbidimetrico che consiste nel misurare la torbidità del campione prelevato, mediante la misura dell'assorbanza, o densità ottica (OD), ovvero l'intensità di radiazione elettromagnetica assorbita da un corpo, mediante uno spettrofotometro a lunghezza d'onda singola Hach DR 5000. L'assorbanza è proporzionale all'aumento del numero di cellule microalgali presenti nel campione, quindi, riportando i dati ottenuti in funzione logaritmica del tempo è possibile definire la curva di crescita e determinare i parametri caratteristici.

Per la misura dell'assorbanza, si posizionano le beute sotto la cappa biologica, si preleva 1 mL di liquido con una pipetta graduata e lo si inserisce all'interno di una cuvette. Lo spettrofotometro viene impostato in modalità di lunghezza d'onda singola e viene scelta una lunghezza d'onda di 750 nm, in questo modo non sono

rilevati i pigmenti, i quali sono assorbiti a lunghezze d'onda minori, che potrebbero falsare la misura e quindi il numero di cellule algali effettivamente presenti nel campione analizzato. Si tara lo strumento allo zero di assorbanza inserendo una cuvette contenente soltanto acqua distillata (bianco) e si procede con la misura delle assorbanze dei vari campioni.

Legge di Lambert-Beer

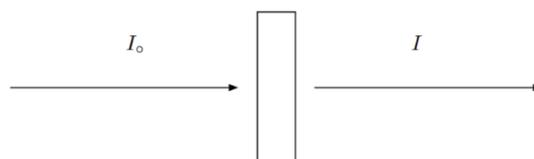
L'applicazione analitica delle misure di assorbimento spiegate sopra si basa sulla legge di Lambert-Beer, la quale afferma che l'assorbanza di una radiazione elettromagnetica monocromatica a lunghezza d'onda λ da parte di una soluzione contenente una specie chimica capace di assorbire a quella lunghezza d'onda può essere definita con la formula:

$$A_{\lambda} = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = dc\varepsilon^{\lambda} \quad (3.2)$$

In cui:

- A: assorbanza (adimensionale)
- d: cammino ottico (cm), ovvero lo spessore di soluzione attraversato dalla radiazione.
- c: concentrazione molare della specie che si sta analizzando (mol/L)
- ε^{λ} : coefficiente di estinzione molare della specie in esame alla lunghezza d'onda λ

I e I_0 sono rispettivamente le intensità luminose del fascio uscente ed entrante nel campione, infatti, quando la radiazione elettromagnetica attraversa il campione, parte dell'energia luminosa viene assorbita dal campione e si ha una diminuzione dell'intensità luminosa.



Cappa biologica



Per le operazioni in cui è stato necessario maneggiare i terreni di coltura, è stata utilizzata la cappa di sicurezza biologica Esco Airstream Class II. Le cappe biologiche sono dispositivi di protezione, indispensabili per proteggere l'operatore e l'ambiente circostante dall'esposizione ad agenti patogeni. Sono costituiti da una cabina che isola l'ambiente interno sterile da quello esterno. La sterilizzazione dell'aria all'interno della cappa viene realizzata mediante dei filtri ULPA (Ultra Low Penetration Air), realizzati in microfibra di vetro.

Figura 3.3: Cappa di sicurezza biologica Esco Airstream Class II.

3.2. Materiali e metodi per l'estrazione

In questo paragrafo saranno descritti i materiali e i metodi impiegati per la caratterizzazione della biomassa ottenuta da ogni coltura, focalizzandosi sull'analisi del contenuto di fucoxantina e di clorofilla.

Una volta terminata la crescita, la biomassa presente dispersa nel terreno di coltura liquido, è stata sottoposta a centrifugazione per allontanare il terreno, essiccata poi in stufa e conservata in freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fino al momento delle analisi. Prima di analizzarne la composizione biochimica, è stata polverizzata utilizzando un mortaio e ne sono stati prelevati circa 2-3 mg per ogni analisi.

Per analizzare il contenuto di fucoxantina e clorofilla, la procedura di estrazione migliore studiata in letteratura prevede l'aggiunta di un solvente, in questo caso 1 mL di Etanolo 100%, e l'estrazione dei pigmenti ponendo i campioni in un bagno d'acqua a ultrasuoni (59 KHz, 30°C , 8 min). Le falcon sono state poi centrifugate (13000 rpm, 10°C , 8 min) e l'estratto ottenuto è stato separato dalla biomassa esausta. Sono stati effettuati tre cicli di estrazione.

Durante queste procedure, i campioni contenenti gli estratti sono stati coperti dalla luce mediante l'utilizzo di carta stagnola da laboratorio, per evitare la degradazione dei prodotti di interesse dovuti all'esposizione alla luce.

Per l'analisi dell'estratto, è stato utilizzato un HPLC per determinare la concentrazione di fucoxantina e uno spettrofotometro per la valutazione delle concentrazioni di clorofilla.

3.2.1. Apparecchiature utilizzate

Ultrasuoni



Figura 3.4: Bagno ad ultrasuoni.

L'estrazione assistita da ultrasuoni è una tecnica innovativa e sostenibile che sfrutta l'azione meccanica prodotta dall'effetto di cavitazione generata dalle onde sonore ultrasoniche. Il fenomeno della cavitazione comprende una prima fase in cui si ha la formazione di piccole bolle di vapore, seguita da un loro incremento di volume finché queste non implodono generando microgetti di liquido. Questi incrementi locali di temperatura e pressione e creano delle turbolenze che possono danneggiare le pareti cellulari e favorire il processo di estrazione.

Con l'aumento del costo dell'energia e il problema delle emissioni di CO₂, le aziende chimiche stanno sempre più adottando tecnologie che riducano il consumo di energia e al contempo migliorino le prestazioni. La fase di estrazione, in alcuni casi, è particolarmente costosa poiché richiede l'utilizzo di energia e solventi spesso anche dannosi per l'ambiente. L'uso degli ultrasuoni nella fase di estrazione riduce le tempistiche e quindi la quantità di solvente e di energia necessari rendendo il processo più sostenibile. Questa tecnologia consente di ottenere estratti di alta qualità, ed è quindi particolarmente adatta all'industria alimentare e farmaceutica.

Il principio di funzionamento di un sonicatore consiste nella conversione di energia elettrica in ultrasuoni tramite un generatore, questa energia viene trasformata in vibrazioni meccaniche mediante un trasduttore e una sonda permette di incrementare l'ampiezza di tali vibrazioni. (Farid Chemat et al., 2017)

Durante l'estrazione con ultrasuoni si verificano diversi meccanismi:

- *Frammentazione:* sottoponendo una soluzione contenente del materiale solido agli ultrasuoni, si nota una rapida frammentazione di quest'ultimo. Ciò è dovuto alla collisione tra le particelle e alle onde d'urto causate dal collasso delle bolle di cavitazione. La velocità e la resa di estrazione aumentano poiché la riduzione delle dimensioni delle particelle si traduce in una maggiore area superficiale e quindi un maggiore trasferimento di materia.

- *Erosione*: l'erosione di un substrato solido, promossa dagli ultrasuoni, determina una maggiore accessibilità del solvente acquoso all'interno della matrice migliorando le prestazioni dell'estrazione e della solubilizzazione.
- *Capillarità ultrasonica*: questo meccanismo si riferisce all'incremento della velocità e della profondità di penetrazione del solvente all'interno dei pori e canali della matrice causato dall'effetto di cavitazione.
- *Detesturazione*: l'applicazione degli ultrasuoni determina la degradazione delle strutture cellulari dopo un periodo di tempo sufficiente. La distruzione della matrice favorisce la penetrazione del solvente di estrazione incrementando l'efficienza dell'operazione.
- *Sonoporazione*: consiste nella formazione di pori sulla membrana cellulare causata dalla cavitazione indotta dagli ultrasuoni. La formazione dei pori permette il rilascio delle sostanze presenti nella cellula nel solvente di estrazione.

Durante il processo di estrazione con gli ultrasuoni è molto probabile che si verifichi una combinazione dei meccanismi descritti sopra, accompagnata dall'intenso effetto di miscelazione causato dalla propagazione degli ultrasuoni che favorisce il trasferimento di massa e di conseguenza incrementa la resa di estrazione (Farid Chemat et al., 2017).

Distinguiamo due categorie di apparecchiature per l'estrazione con ultrasuoni: il bagno ad ultrasuoni e la sonda.

Il *bagno ad ultrasuoni* è costituito da una vasca in acciaio con uno o più trasduttori posti sulla base. Questo sistema è meno costoso e ha la possibilità di trattare un ampio numero di campioni per volta. Gli svantaggi sono la bassa riproducibilità e la minor potenza applicabile. Il sistema con la *sonda* è più potente ed è generalmente preferito per effettuare le estrazioni. Il trasduttore è collegato alla sonda che viene immersa nel liquido emettendo ultrasuoni. Le sonde possono avere diverse geometrie e dimensioni a seconda dell'applicazione e del volume del campione.

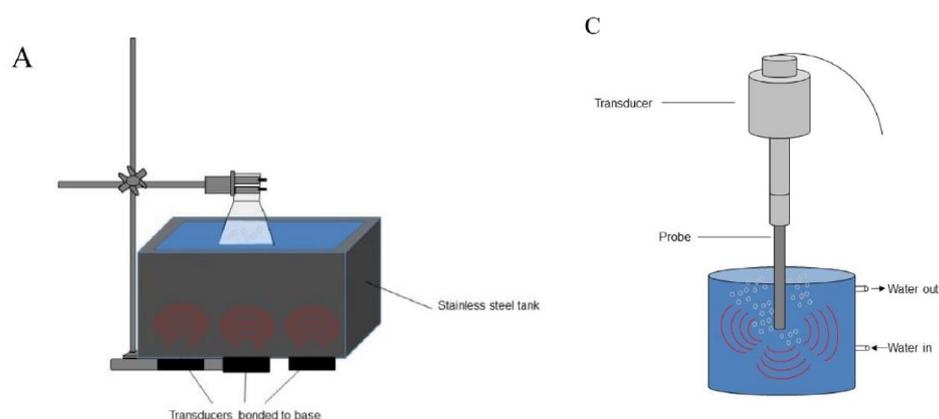


Figura 3.5: Vasca a ultrasuoni e sonda (Farid Chemat et al., 2017).

Per l'estrazione della fucoxantina e della clorofilla è stata utilizzata una vasca ad ultrasuoni FALC Labsonic LBS2.

Centrifuga



Figura 3.6: Centrifuga Thermo Scientific SL 16/16R.

La centrifuga da laboratorio è un'apparecchiatura utilizzata per separare sostanze con densità differenti. L'elemento principale di questo strumento è il rotore in grado di ruotare ad una velocità e per un tempo definiti dall'operatore. All'interno del rotore sono presenti gli alloggiamenti per i campioni da centrifugare. La forza che permette la separazione è quella centrifuga, la quale allontana le particelle più dense dall'asse di rotazione, che sedimentano sul fondo formando il pellet, e muove quelle più leggere in senso opposto formando il surnatante. Grazie all'elevata velocità di rotazione, le tempistiche richieste per la separazione sono molto ridotte. Per incrementare ulteriormente l'efficienza della separazione la maggior parte delle centrifughe possiedono un sistema di raffreddamento, in questo modo è possibile impostare la temperatura ottimale per ogni caso specifico.

High Performance Liquid Chromatography



Figura 3.7: High Performance Liquid Chromatography.

La cromatografia liquida ad alta prestazione (in inglese HPLC, "High Performance Liquid Chromatography") è una tecnica cromatografica che permette di separare e quantificare i componenti di una miscela sfruttando l'equilibrio di affinità tra una "fase stazionaria" e una "fase mobile". La fase stazionaria è un materiale solido presente all'interno della colonna cromatografica, le fasi mobili sono dei solventi liquidi inviati nella colonna tramite una pompa ad elevata pressione. Un iniettore invia il campione all'interno del flusso continuo della fase mobile che trasporta il campione alla colonna. I componenti del campione interagiscono in modo diverso con la fase stazionaria in base alle loro proprietà chimiche, determinando la loro separazione.

Una volta separati, i componenti vengono rilevati e quantificati tramite un rivelatore ed un computer che emette un cromatogramma. Infine, si utilizza una curva di calibrazione per correlare l'assorbimento misurato con la concentrazione della sostanza in soluzione.

Per le analisi è stato utilizzato l'HPLC Shimadzu LC40DXR con colonna cromatografica Kinetex Core-Shell C18 di diametro 5 μ m e dimensioni 150 \times 4.6 mm.

Per analizzare l'estratto ottenuto dalla centrifugazione se ne prelevano 1,5 mL, utilizzando siringhe con filtro per rimuovere eventuali particelle e impurità, che potrebbero danneggiare l'apparecchiatura, e si trasferisce il campione fotosensibile in vials ambrate in modo da proteggerlo dalla luce e si inserisce il campione in HPLC per l'analisi.

Le fasi mobili utilizzate per l'eluizione sono:

- Fase A: 0.5 M acetato d'ammonio in metanolo: acqua milli-Q (85:15)
- Fase B: acetonitrile: acqua milli-Q (90:10)
- Fase C: 100% etilacetato

Per analizzare un singolo campione sono necessari 53 minuti e viene seguito il seguente programma di eluizione a gradiente:

Tempo (min)	5	10	40	45	46	47	48	53
Fase A (%)	60	0	0	0	0	0	60	60
Fase B (%)	40	100	30	30	0	100	40	40
Fase C (%)	0	0	70	70	100	0	0	0

Tabella 3.8: Programma di eluizione.

Dall'analisi all'HPLC si può individuare il picco corrispondente alla fucoxantina, sul cromatogramma ad una lunghezza d'onda pari a 445 nm, dopo un tempo di ritenzione pari a circa 8 minuti. Dall'area di questo picco è possibile quantificare la quantità di fucoxantina estratta utilizzando una retta di taratura effettuata in precedenza analizzando all'HPLC campioni preparati a concentrazioni note di fucoxantina, utilizzando lo standard all-trans Fucoxanthin di Sigma-Aldrich:

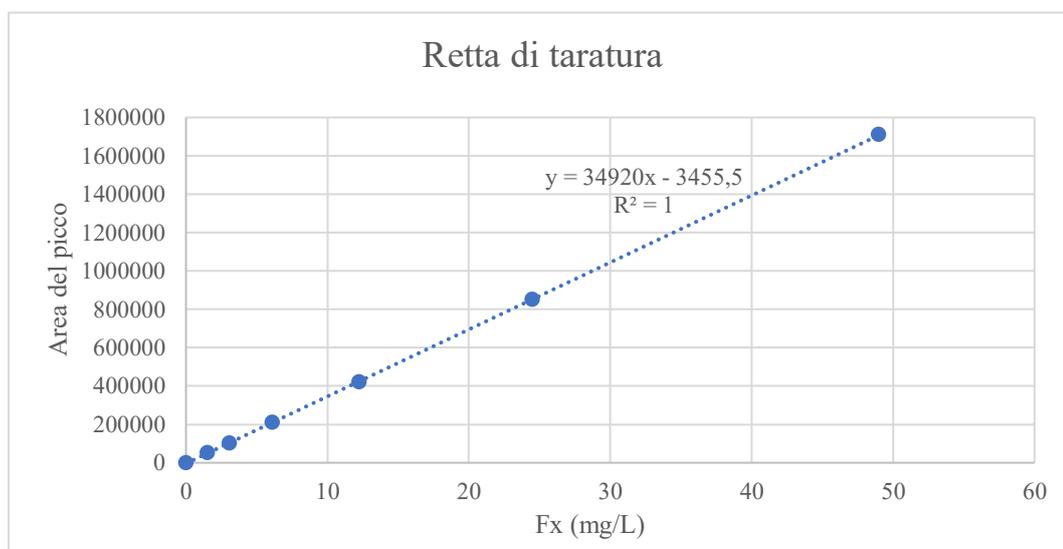


Figura 3.8: Retta di taratura per l'analisi HPLC della fucoxantina.

$$Fx \text{ (mg/L)} = \frac{\text{Area del picco} + 3455,5}{34920} \quad (3.3)$$

Una volta ottenuta la concentrazione di fucoxantina, a partire dall'equazione della retta di taratura, si moltiplica questo valore per il volume di solvente utilizzato per l'estrazione (3 mL di etanolo) ottenendo i mg di fucoxantina. Infine, per ottenere la percentuale di fucoxantina, si divide per i mg di biomassa di partenza e si moltiplica per cento.

Spettrofotometro

Per la quantificazione della clorofilla presente in ogni campione è stato prelevato 1 mL di surnatante, posto in una cuvette e misurata l'assorbanza con uno spettrofotometro. In questo caso lo zero di assorbanza si effettua utilizzando etanolo 100%.

Nella diatomea *P. tricornutum* si trovano in particolare clorofille a e c, per il calcolo delle loro concentrazioni sono state utilizzate le equazioni di Ritchie (2008):

$$\text{Clorofilla } a = 0.0604 \cdot E_{630} - 4.5224 \cdot E_{647} + 13.2969 \cdot E_{664} - 1.7453 \cdot E_{691} \quad (3.4)$$

$$\text{Clorofilla } c = 28.4593 \cdot E_{630} - 9.9944 \cdot E_{647} - 1.9344 \cdot E_{664} - 1.8093 \cdot E_{691} \quad (3.5)$$

Queste equazioni forniscono la concentrazione di clorofilla in $\mu\text{g/mL}$, per ottenere il valore percentuale è necessario moltiplicare per i mL di etanolo utilizzato, in questo caso 1 mL, e dividere per la biomassa iniziale, espressa in μg , moltiplicando infine per cento.

3.3. Risultati della crescita

3.3.1. Crescita a 20 °C

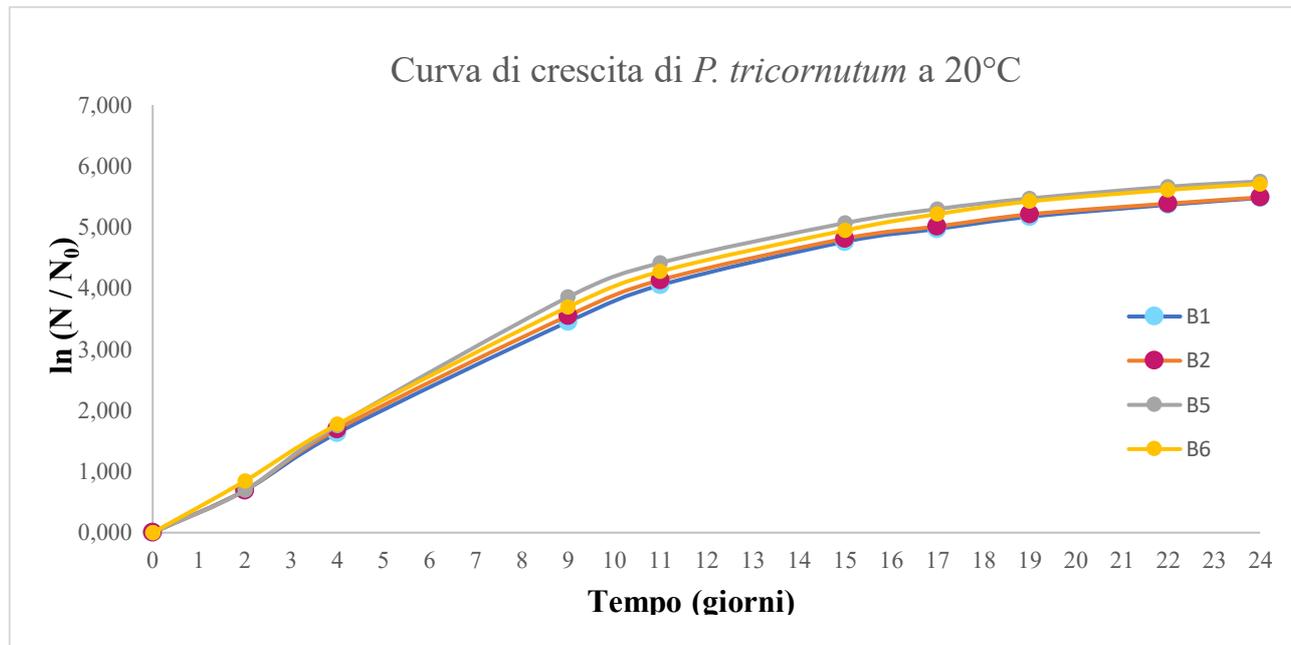


Figura 3.9. Curva di crescita di *P. tricornutum* a 20 °C.

Di seguito si riporta la curva di crescita ottenuta misurando l'assorbanza della coltura per 24 giorni. Sulle ascisse è riportato il tempo e sulle ordinate il logaritmo naturale del rapporto tra l'assorbanza misurata in un determinato giorno e l'assorbanza rilevata al giorno zero. Le curve presentano una prima fase lag molto breve seguita dalla fase di crescita esponenziale e l'inizio di una fase stazionaria caratterizzata da valori di assorbanza circa costanti.

Il monitoraggio della crescita consente di determinare alcuni parametri come la velocità specifica di crescita, la velocità massima di crescita e il tempo di duplicazione.

La *velocità specifica di crescita* corrisponde alla pendenza della curva di crescita durante la fase esponenziale. Per calcolarla è stato utilizzato il software GraphPad PRISM versione 9 che permette di effettuare una regressione lineare dei dati inseriti e fornisce l'equazione della retta tangente alla curva di crescita durante questa fase.

Il modello di regressione lineare è il seguente:

$$Y_i = b_0 + b_1 X_i + u_i \quad (3.6)$$

In cui: Y_i variabile dipendente

X_i variabile indipendente o regressore

b_0 intercetta della retta di regressione

b_1 coefficiente angolare della retta di regressione

u_i errore

$b_0 + b_1 X$ retta di regressione

In tabella 3.9 si riportano i risultati forniti dal software GraphPad PRISM 9.

Test	B1	B2	B5	B6
Retta di regressione	$Y = 0,374 \cdot X + 0,022$	$Y = 0,383 \cdot X + 0,024$	$Y = 0,414 \cdot X - 0,009$	$Y = 0,392 \cdot X + 0,081$
Coeff. Angolare (b_1)	0,374	0,383	0,414	0,392
Interecetta (b_0)	0,022	0,024	-0,009	0,081
Std. Error (b_1)	0,005	0,006	0,008	0,006
Std. Error (b_0)	0,035	0,043	0,050	0,042
R²	0,997	0,996	0,996	0,997

Tabella 3.9: Dati ottenuti con il software GraphPad PRISM 9 per la crescita a 20°C.

I coefficienti angolari (b_1) della retta di regressione ottenuti per i vari test corrispondono quindi alle velocità specifiche di crescita.

Il coefficiente di determinazione R^2 è un indice statistico che misura il legame tra la variabilità dei dati e la correttezza del modello utilizzato. In questo caso è un valore molto prossimo all'unità, il che sta ad indicare una buona approssimazione, confermata anche dai valori degli errori ottenuti.

La *velocità massima di crescita* μ , invece, è la massima velocità raggiunta nella fase esponenziale e viene calcolata con la formula:

$$\frac{dX}{dt} = X \cdot \mu \quad (3.7)$$

Con: X: il numero di cellule. In questo caso X corrisponde all'assorbanza registrata
t: tempo
 μ : velocità di crescita

Da cui, integrando, si ottiene:

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu(t - t_0) \quad (3.8)$$

Infine, il *tempo di duplicazione*, ovvero il tempo impiegato dalle cellule microalgali per raddoppiare in numero, è stato calcolato con la seguente formula:

$$\text{Tempo di duplicazione} = \frac{\ln(2)}{\text{velocità specifica di crescita}} \quad (3.9)$$

Un'altra informazione che si può ottenere alla fine della crescita è la *concentrazione finale di biomassa* o anche *produttività di biomassa*, che indica quanta biomassa è stata prodotta in una determinata coltivazione. Per ottenere questo parametro è stato misurato il volume di liquido presente in ogni beuta, questo è stato centrifugato in più cicli per separare la biomassa e poterla pesare, dopo passaggio di essiccazione in stufa. La concentrazione finale di biomassa è calcolata come il rapporto tra il peso della biomassa(g) e il volume centrifugato (L).

$$\text{Produttività di biomassa} \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{\text{Peso biomassa (g)}}{\text{Volume contrifugato (L)}} \quad (3.10)$$

Si riportano nelle tabelle sottostanti i risultati ottenuti per ogni test.

N test	Condizioni operative	Volume centrifugato (L)	Peso biomassa (g)	Produttività biomassa (g/L)
1	Gly 0,05 M, 20°C, f/2	0,178	0,070	0,393
2	Gly 0,1 M, 20°C, f/2	0,178	0,072	0,407
5	Gly 0,05 M, 20°C, f/2 NaNO ₃ x 10	0,182	0,107	0,587
6	Gly 0,1 M, 20°C, f/2 NaNO ₃ x 10	0,182	0,102	0,564

Tabella 3.10: Produttività di biomassa ottenuta dalla crescita a 20°C.

N test	Condizioni operative	Velocità specifica di crescita (giorni-1)	Velocità massima di crescita (giorni-1)	Tempo di duplicazione (giorni)
1	Gly 0,05 M, 20°C, f/2	0,374	0,469	1,855
2	Gly 0,1 M, 20°C, f/2	0,383	0,501	1,812
5	Gly 0,05 M, 20°C, f/2 NaNO ₃ x 10	0,414	0,530	1,674
6	Gly 0,1 M, 20°C, f/2 NaNO ₃ x 10	0,392	0,463	1,770

Tabella 3.11: Velocità di crescita e tempo di duplicazione ottenuti dalla crescita a 20°C.

Si noti che sono stati ottenuti concentrazioni finali di biomassa maggiori per i test condotti con terreni di coltura arricchiti in nitrati (test 5 e 6). Gli stessi presentano anche velocità di crescita più elevate.

Nelle figure 3.10 e 3.11 possiamo osservare l'aspetto delle colture al primo e all'ultimo giorno di crescita. Si nota che, man mano che la popolazione cellulare aumenta, la colorazione del terreno si fa più scura, in particolare il colore bruno è dovuto alla presenza di fucoxantina. Le beute 5 e 6 presentano colore nettamente più scuro, segno di una maggior concentrazione di fucoxantina, in linea con i risultati ottenuti.



Figura 3.10: Beute B1, B2, B5, B6 al primo giorno di crescita.



Figura 3.11: Beute B1, B2, B5, B6 dopo 24 giorni di crescita.

3.3.2. Crescita a 25 °C

Un procedimento analogo è stato seguito per determinare i parametri della crescita a 25 °C che si riportano di seguito.

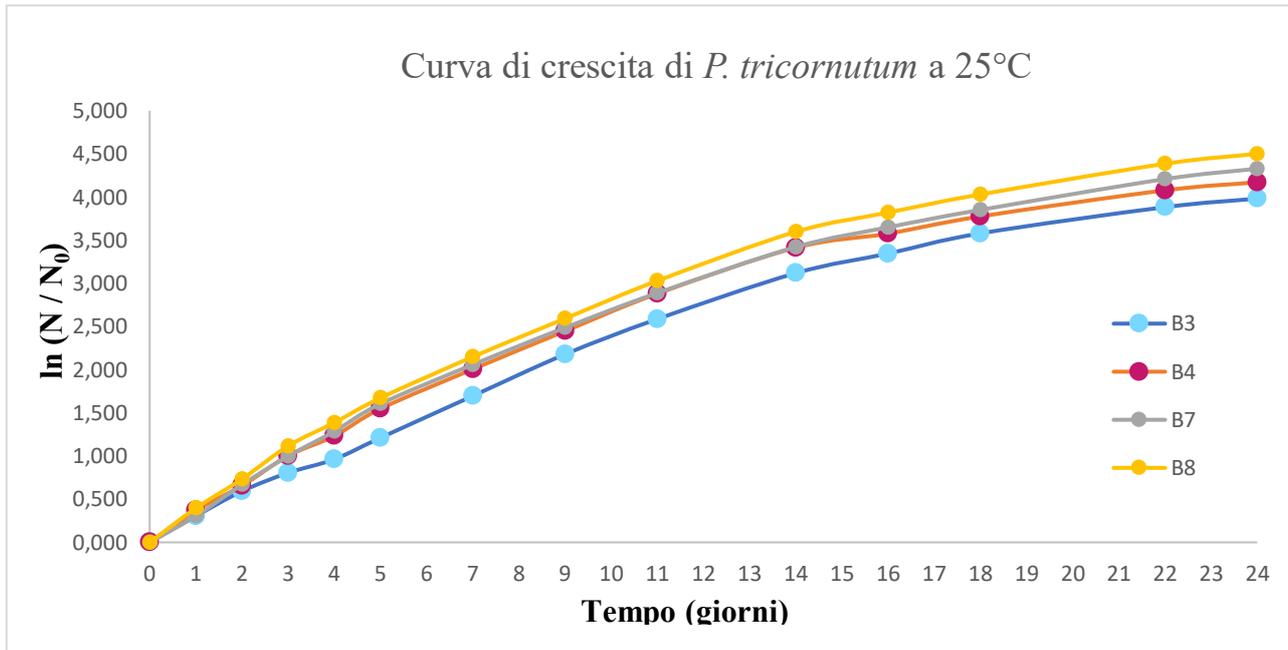


Figura 3.12: Curva di crescita di *P. tricornutum* a 25 °C.

Si riportano anche in questo caso i risultati ottenuti con il software GraphPad PRISM 9.

Test	B3	B4	B7	B8
Retta di regressione	$Y = 0,232 \cdot X + 0,067$	$Y = 0,259 \cdot X + 0,143$	$Y = 0,264 \cdot X + 0,137$	$Y = 0,271 \cdot X + 0,189$
Coeff. Angolare (b1)	0,232	0,259	0,264	0,271
Interecetta (b0)	0,067	0,143	0,137	0,189
Std. Error (b1)	0,002	0,005	0,006	0,007
Std. Error (b0)	0,013	0,029	0,034	0,038
R ²	0,998	0,991	0,988	0,986

Tabella 3.12: Dati ottenuti con il software GraphPad PRISM 9 per la crescita a 25°C.

Analogamente a quanto ottenuto con il primo set di esperimenti, si rilevano velocità di crescita e produttività maggiori nel caso dei terreni arricchiti in nitrati, tuttavia per la crescita a 25°C si registrano velocità di crescita minori rispetto ai valori ottenuti a 20°C, ciò è dovuto al fatto che la temperatura ottimale di crescita per questa microalga è 21°C.

N test	Condizioni operative	Volume centrifugato (L)	Peso biomassa (g)	Produttività biomassa (g/L)
3	Gly 0,05 M, 25°C, f/2	0,169	0,072	0,426
4	Gly 0,1 M, 25°C, f/2	0,171	0,073	0,425
7	Gly 0,05 M, 25°C, f/2 NaNO ₃ x 10	0,169	0,101	0,596
8	Gly 0,1 M, 25°C, f/2 NaNO ₃ x 10	0,170	0,100	0,588

Tabella 3.13: Produttività di biomassa ottenute dalla crescita a 25 °C.

N test	Condizioni operative	Velocità specifica di crescita (giorni ⁻¹)	Velocità massima di crescita (giorni ⁻¹)	Tempo di duplicazione (giorni)
3	Gly 0,05 M, 25°C, f/2	0,232	0,305	2,990
4	Gly 0,1 M, 25°C, f/2	0,259	0,372	2,680
7	Gly 0,05 M, 25°C, f/2 NaNO ₃ x 10	0,264	0,364	2,631
8	Gly 0,1 M, 25°C, f/2 NaNO ₃ x 10	0,271	0,397	2,559

Tabella 3.14: Velocità di crescita e tempi di duplicazione ottenuti dalla crescita a 25°C.

Di seguito le foto delle colture, il primo e l'ultimo giorno della crescita. Anche in questo caso possiamo notare una colorazione più scura delle colture con i terreni arricchiti in nitrati.



Figura 3.13: Beute B3, B4, B7, B8 il primo giorno di crescita.



Figura 3.14: Beute B3, B4, B7, dopo 24 giorni di crescita.

Analisi al microscopio ottico

Durante la fase di crescita è stato monitorato lo stato delle cellule microalgali per rilevare eventuali contaminazioni o anomalie e per visualizzare la presenza dei diversi morfotipi.

È stato utilizzato un microscopio ottico Nexcope NE910 con un obiettivo 40x. Il microscopio ottico è una tipologia di microscopio che utilizza la luce visibile e un sistema di lenti ottiche per visualizzare organismi non visibili ad occhio nudo.

Si possono acquisire immagini digitali, come quelle mostrate sotto, collegando una fotocamera sensibile alla luce.

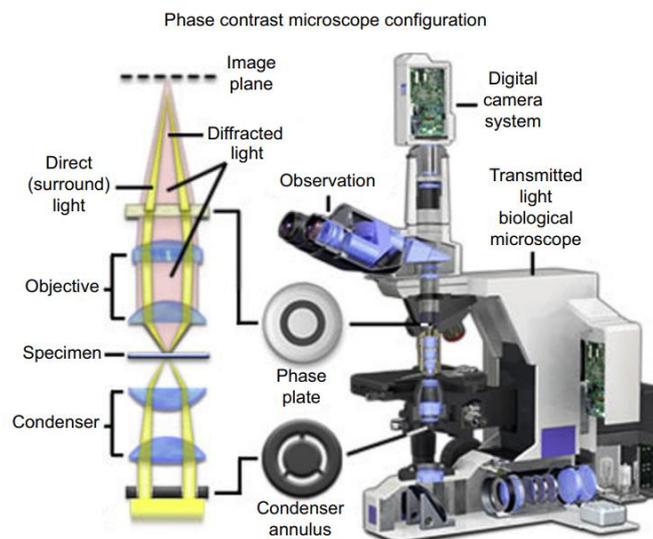


Figura 3.15: Principio di funzionamento di un microscopio ottico (A. Di Gianfrancesco, 2017).

Dalle immagini acquisite al microscopio possiamo notare che le cellule di *P. tricornutum* hanno dimensioni all'incirca di 15 μm e che il morfotipo preponderante è quello fusiforme. Si vedono anche diverse cellule triradiate. Più rara la forma ovale che quando è presente si trova per lo più in raggruppamenti cellulari.



Figura 3.16: Cellule di *P. tricornutum* al microscopio ottico.

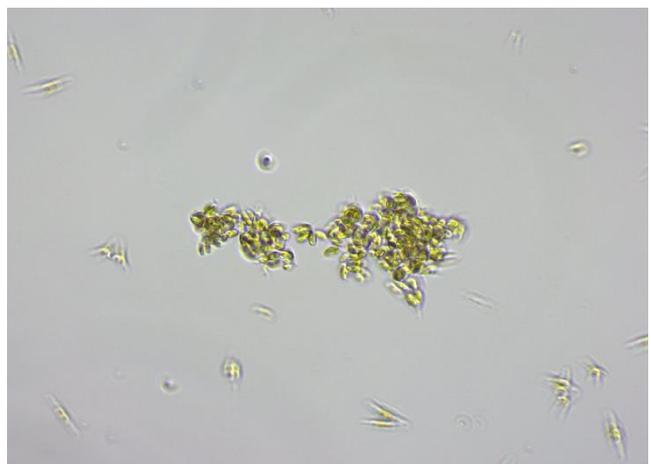


Figura 3.17: Raggruppamento di cellule con morfotipo ovale.

3.4. Risultati dell'estrazione: caratterizzazione della biomassa

3.4.1. Quantificazione fucoxantina: analisi HPLC

Dall'analisi HPLC sono stati ottenuti i seguenti valori percentuali di fucoxantina:

N test	Condizioni operative	Biomassa (mg)	Fucoxantina (mg Fx/mg biomassa) ·100
1	Gly 0,05 M, 20°C, f/2	2,4	1,19%
2	Gly 0,1 M, 20°C, f/2	2,3	0,82%
3	Gly 0,05 M, 25°C, f/2	3,7	0,68%
4	Gly 0,1 M, 25°C, f/2	3,1	0,87%
5	Gly 0,05 M, 20°C, f/2 NaNO ₃ x10	2,4	1,71%
6	Gly 0,1 M, 20°C, f/2 NaNO ₃ x10	2,2	0,80%
7	Gly 0,05 M, 25°C, f/2 NaNO ₃ x10	2,5	1,42%
8	Gly 0,1 M, 25°C, f/2 NaNO ₃ x10	2,2	1,46%

Tabella 3.15: Valori percentuali di fucoxantina ottenuti dall'analisi HPLC.

Le percentuali maggiori sono state ottenute per le crescite con il terreno f/2 NaNO₃ x10, risultato in linea con la letteratura in quanto l'apporto di azoto determina un incremento della produzione di fucoxantina. Diversi studi hanno infatti dimostrato che le cellule di *P. tricornutum* coltivate con scarso apporto di azoto presentano una riduzione nei livelli di espressione della maggior parte dei geni codificanti enzimi coinvolti nelle vie biosintetiche della clorofilla *a* e dei carotenoidi, tra cui la fucoxantina. In particolare, è stato registrato una diminuzione della presenza del glutammato, il principale precursore della biosintesi della clorofilla (Leila Alipanah et al., 2015).

3.4.2. Quantificazione clorofille: analisi spettrofotometrica

Per ogni campione sono state misurate le assorbanze a 630 nm, 647 nm, 664 nm e 691 nm, e i valori ottenuti sono riportati nella tabella sottostante.

Test	E_{630 nm}	E_{647 nm}	E_{664 nm}	E_{691 nm}
1	0,135	0,166	0,584	0,043
2	0,079	0,101	0,363	0,029
3	0,104	0,114	0,333	0,055
4	0,201	0,215	0,541	0,126
5	0,205	0,258	0,955	0,052
6	0,092	0,119	0,421	0,029
7	0,201	0,224	0,677	0,104
8	0,163	0,183	0,622	0,062

Tabella 3.16: Assorbanze rilevate per ogni test a 630 nm, 647 nm, 664 nm e 691 nm.

Di seguito i valori di concentrazione, in $\mu\text{g/mL}$ e in percentuale, delle due tipologie di clorofille prodotte da *P. tricornutum*, ottenuti per ogni test effettuato nelle diverse condizioni operative.

N test	Condizioni operative	Clorofilla a ($\mu\text{g/mL}$)	Clorofilla c ($\mu\text{g/mL}$)	Clorofilla a (%)	Clorofilla c (%)
1	Gly 0,05 M, 20°C, f/2	6,95	0,99	0,868	0,123
2	Gly 0,1 M, 20°C, f/2	4,32	0,47	0,564	0,061
3	Gly 0,05 M, 25°C, f/2	3,82	1,08	0,310	0,087
4	Gly 0,1 M, 25°C, f/2	6,01	2,30	0,582	0,222
5	Gly 0,05 M, 20°C, f/2 NaNO ₃ x10	11,45	1,32	1,431	0,165
6	Gly 0,1 M, 20°C, f/2 NaNO ₃ x10	5,02	0,56	0,684	0,077
7	Gly 0,05 M, 25°C, f/2 NaNO ₃ x10	7,82	1,98	0,938	0,238
8	Gly 0,1 M, 25°C, f/2 NaNO ₃ x10	7,34	1,49	1,002	0,204

Tabella 3.17: Concentrazioni delle clorofille a e c ottenute dall'analisi spettrofotometrica.

3.4.3. Modellazione ed analisi delle superfici di risposta

Considerazioni sulla crescita in base alle analisi effettuate

Come ultimo step dell'analisi si utilizza la Metodologia delle superfici di risposta (RSM), un insieme di tecniche matematiche e statistiche che permettono di elaborare un modello matematico che descriva la variazione della risposta (Y) in relazione alle variabili del sistema, con l'obiettivo di ottimizzare tale risposta. Per la modellazione è stato utilizzato il software CAT (Chemometric Agile Tool).

Inserendo nel software i dati ottenuti per le velocità specifiche di crescita si ottiene il seguente modello matematico:

$$Y = 0.323625 + 0.002625X_1 - 0.067125 X_2 + 0.011625 X_3 + 0.005875 X_1X_2 - 0.006375 X_1X_3 - 0.000625 X_2X_3 \quad (3.11)$$

In tabella si riportano i coefficienti dei fattori evidenziando la variabile a cui si riferiscono.

	Coefficienti
b ₀	0.323625
Glicerolo	0.002625
Temperatura	-0.067125
Terreno	0.011625
Glicerolo·Temperatura	0.005875
Glicerolo·Terreno	-0.006375
Temperatura·Terreno	-0.000625

Tabella 3.18: Coefficienti μSP .

Osservando graficamente i coefficienti dei fattori e della loro combinazione si può notare che il fattore più influente sulla velocità specifica di crescita è la temperatura, e che questa ha un effetto negativo, nel senso che all'aumentare di essa si produce una diminuzione sulla risposta μ . Il secondo fattore più influente è il terreno, mentre il glicerolo ha un effetto più leggero. L'interazione dei fattori Glicerolo-Temperatura produce un leggero effetto positivo, nel senso che quando la temperatura è 25°C si ha un leggero aumento della velocità di crescita all'aumentare della quantità di glicerolo somministrata. Il contrario succede per l'interazione dei fattori Glicerolo-Terreno: quando il terreno assume il valore più basso, una diminuzione di glicerolo comporta una drastica diminuzione della μ . L'interazione invece tra temperatura e terreno è praticamente nulla, cioè non produce alcun effetto sulla risposta.

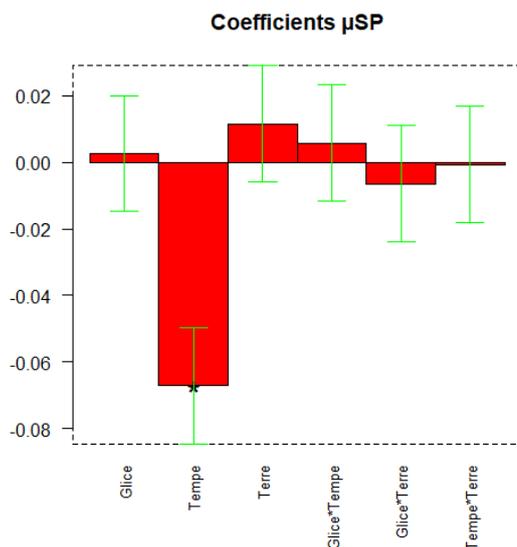


Figura 3.18: Coefficienti μ_{SP} .

Si riportano di seguito le superfici di risposta ottenute per ogni combinazione dei fattori.

Per una temperatura pari a 20°C la velocità specifica di crescita μ è massima in corrispondenza del valore massimo di terreno (terreno arricchito in nitrati) e del valore minimo di glicerolo (0,05 M). Si nota un forte effetto del fattore terreno, infatti all'aumentare di quest'ultimo, μ cresce notevolmente. Il glicerolo invece ha un effetto contrastante a seconda del valore del fattore terreno: quando il terreno è al minimo, il glicerolo ha uno scarso effetto, ad un suo aumento si ha un leggero aumento di μ . Quando il terreno è al massimo invece il glicerolo ha un effetto opposto e più marcato: al diminuire di esso, la velocità specifica aumenta.

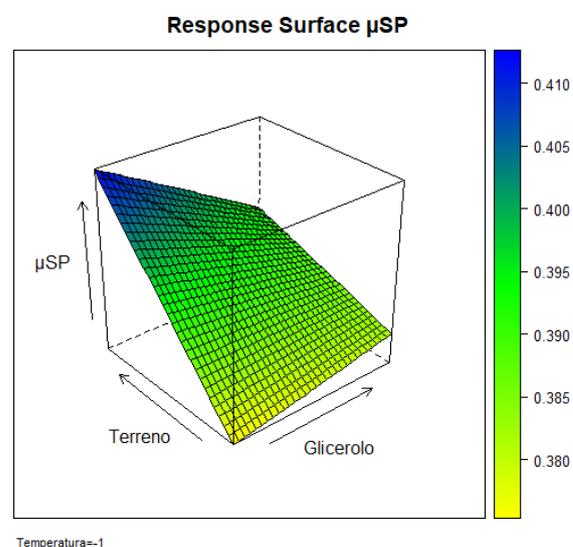
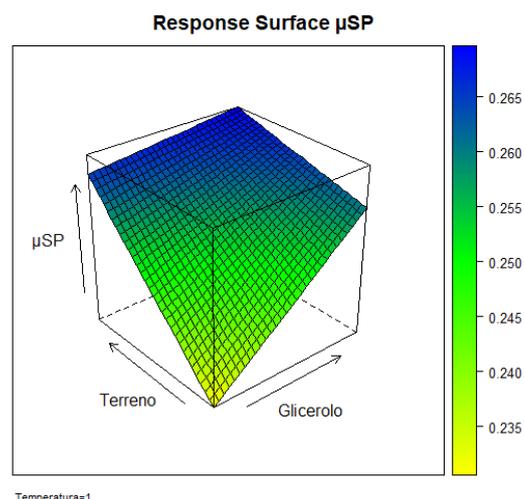


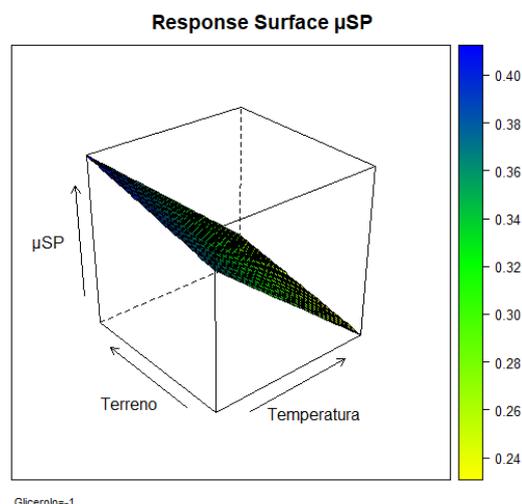
Figura 3.19: Superficie di risposta μ_{SP} , Terreno-Glicerolo ($T=20^{\circ}C$).

A 25°C invece sia il terreno che il glicerolo hanno degli effetti forti sulla velocità specifica di crescita. In particolare, questa aumenta sia all'aumentare della concentrazione di glicerolo che all'aumentare dei nutrienti nel terreno di coltura. Si ha infatti un massimo di μ in corrispondenza del valore massimo del terreno e del valore massimo di glicerolo. Nonostante questa condizione (verificatasi nel test 8) comporti un buon valore di μ , non sarebbe da implementare per la crescita di *P. tricorutum* in quanto l'aumento di μ non è abbastanza da giustificare l'aumento dei costi del processo legati all'utilizzo di una temperatura più alta, un aumento dei nutrienti e un aumento della fonte di glicerolo.



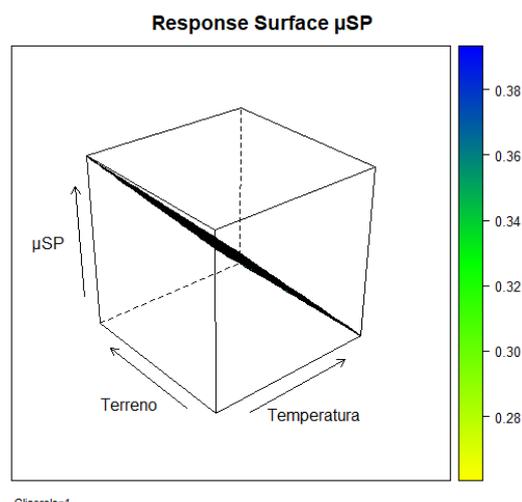
Temperatura=1
Figura 3.20: Superficie di risposta μ SP, Terreno-Glicerolo ($T=25^{\circ}\text{C}$).

Per una somministrazione di glicerolo pari a 0.05 M, il fattore terreno ha poca influenza sulla velocità di crescita μ , si ha, tuttavia, un aumento della risposta all'aumentare di questo fattore. L'effetto più importante che si può notare è quello della temperatura; infatti, all'aumentare di questa si ha un netto declino della risposta.



Glicerolo=1
Figura 3.21: Superficie di risposta μ SP, Terreno-Temperatura (Gly 0,05 M).

Nel caso in cui si somministri 0.1 M di glicerolo, la risposta mantiene lo stesso andamento del caso precedente. Il fattore più influente resta anche questa volta la temperatura.



Glicerolo=1
Figura 3.22: Superficie di risposta μ SP, Terreno-Temperatura (Gly 0,1 M).

Facendo crescere *P. tricornutum* con il terreno di coltura f/2, si nota scarsa influenza del fattore glicerolo, tuttavia, all'aumentare della sua concentrazione si ottiene un incremento di μ . Nuovamente però l'effetto più marcato è quello del fattore temperatura, che conferma la drastica diminuzione della velocità di crescita all'aumentare di questo fattore.

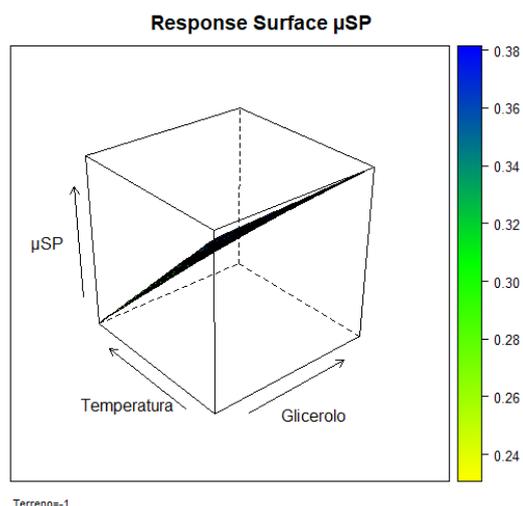


Figura 3.23: Superficie di risposta μ SP, Temperatura-Glicerolo (Terreno f/2).

Facendo crescere *P. tricornutum* con il terreno di coltura arricchito in NaNO_3 si ha lo stesso effetto della temperatura, mentre il glicerolo ha poca influenza in questo caso.

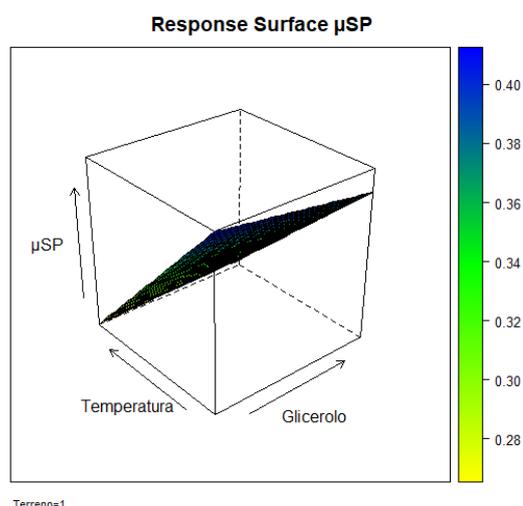


Figura 3.24: Superficie di risposta μ SP, Temperatura-Glicerolo (Terreno f/2 $\text{NaNO}_3 \times 10$).

In conclusione, per mantenere una buona velocità di crescita è necessario far crescere *P. tricornutum* a 20°C ; in questa condizione si può ottenere il massimo di questa risposta (tra i valori esplorati con i test) utilizzando un terreno di coltura arricchito in NaNO_3 e somministrando una quantità di glicerolo pari a 0.05 M.

Considerazioni sulla produzione di fucoxantina in base alle analisi effettuate

Sono state anche analizzate le risposte riferite alla fucoxantina estratta al variare dei fattori prestabiliti e il software CAT ha riportato i seguenti coefficienti:

	Coefficienti
b_0	1.11875
Glicerolo	-0.13125
Temperatura	-0.01125
Terreno	0.22875
Glicerolo·Temperatura	0.18875
Glicerolo·Terreno	-0.08625
Temperatura·Terreno	0.10375

Tabella 3.19: Coefficienti fucoxantina.

Il modello matematico in questo caso sarà:

$$Y = 1.11875 - 0.13125 X_1 - 0.01125 X_2 + 0.22875 X_3 + 0.18875 X_1 X_2 - 0.08625 X_1 X_3 + 0.10375 X_2 X_3 \quad (3.12)$$

Dal grafico dei coefficienti dei fattori e delle loro combinazioni si può notare che non è presente un fattore nettamente più influente rispetto agli altri. La composizione del terreno e il fattore glicerolo·temperatura, tuttavia, sono i fattori con un effetto più rilevante, seguiti dal glicerolo e i fattori temperatura·terreno e glicerolo·terreno. Infine, la temperatura ha un effetto quasi nullo sulla produzione di fucoxantina.

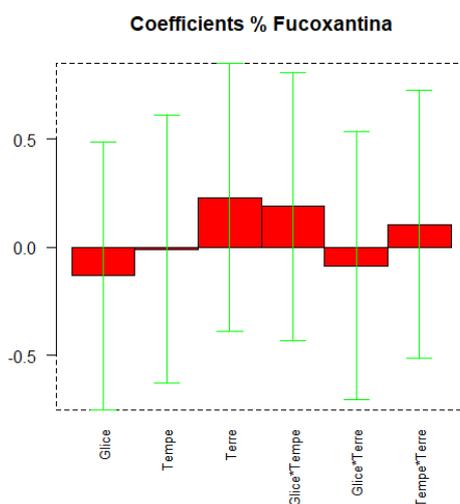


Figura 3.25: Coefficienti fucoxantina.

Si analizzano ora le superfici di risposta della percentuale di fucoxantina estratta ottenute per le diverse combinazioni dei fattori.

- Dalle seguenti superfici di risposta si nota che, indipendentemente dalla temperatura, il massimo di fucoxantina si ottiene con il terreno f/2 NaNO₃x10 e glicerolo 0,05 M. A 20°C e a concentrazioni di glicerolo pari a 0,1 M si ha il minimo di fucoxantina, a prescindere dal terreno utilizzato, mentre con glicerolo 0,05 M si ha un effetto positivo all'aumentare del fattore terreno. A 25°C e terreno f/2 NaNO₃x10 l'effetto del glicerolo è trascurabile; con terreno f/2 l'effetto invece, è leggermente positivo. A questa temperatura e con entrambe le concentrazioni di glicerolo, l'effetto dell'arricchimento del terreno si dimostra sempre positivo.

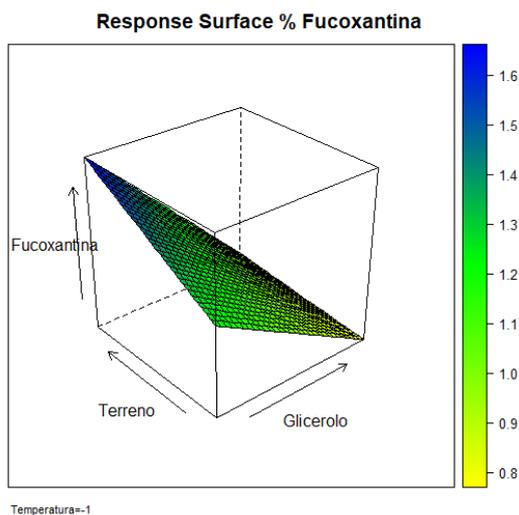


Figura 3.26: Superficie di risposta fucoxantina, Terreno-Glicerolo (Temperatura 20°C).

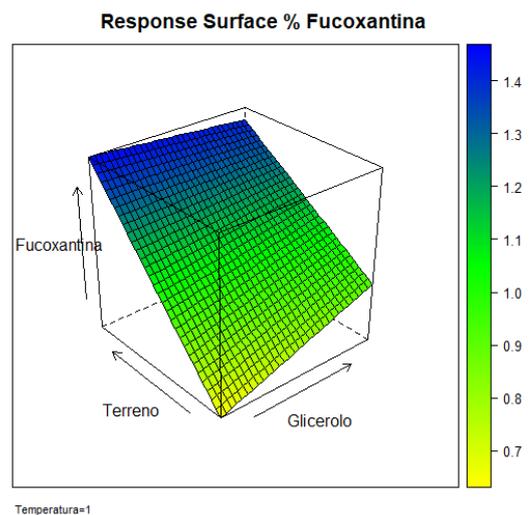
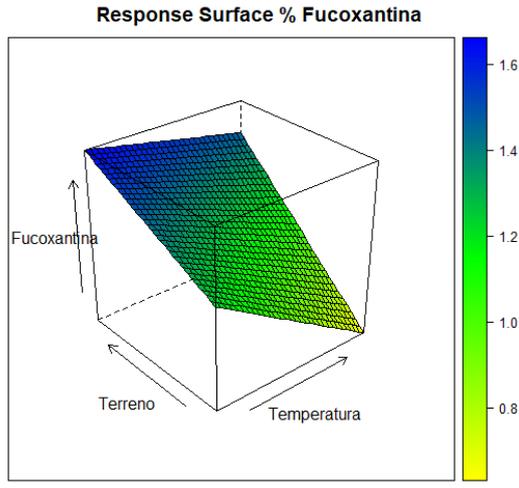


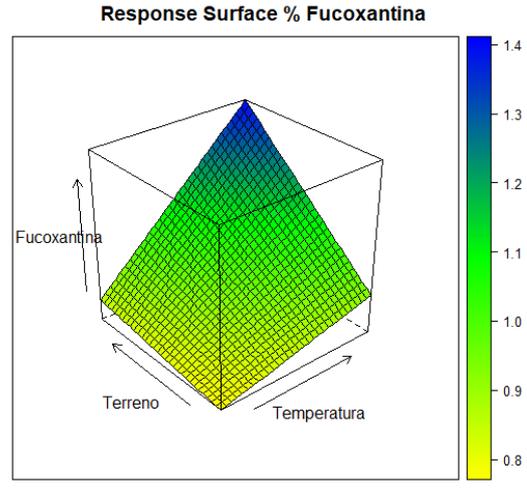
Figura 3.27: Superficie di risposta fucoxantina, Terreno-Glicerolo (Temperatura 25°C).

- Per una concentrazione di glicerolo pari a 0,05 M, l'aumento di fucoxantina è favorito da terreni più ricchi e temperature più basse. Al contrario, il minimo di fucoxantina si ottiene a temperature più elevate e terreni meno ricchi.

Nel caso in cui si somministri glicerolo 0,1 M si nota un comportamento differente: il massimo di fucoxantina si ottiene con il terreno più ricco e temperatura più elevata, mentre il minimo si ha in corrispondenza del terreno f/2 e alla temperatura di 20°C. Si noti inoltre che per terreni arricchiti l'effetto della temperatura è molto pronunciato, così come lo è l'effetto del terreno quando la temperatura è più elevata.

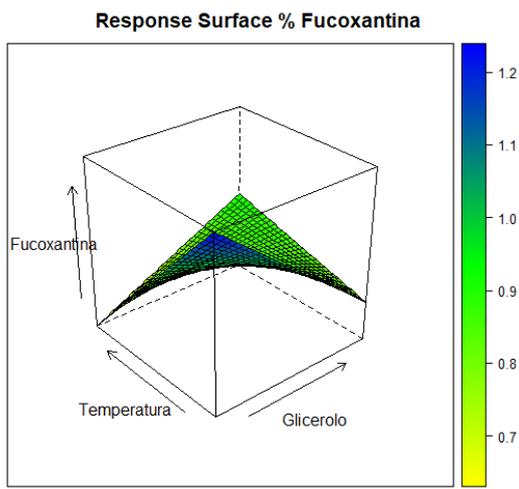


Glicerolo=1
Figura 3.28: Superficie di risposta fucoxantina, Terreno-Temperatura (Gly 0,05 M).

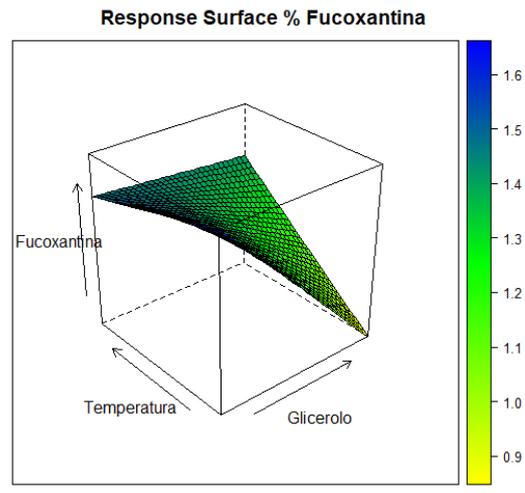


Glicerolo=1
Figura 3.29: Superficie di risposta fucoxantina, Terreno-Temperatura (Gly 0,1 M).

- Con entrambi i terreni di coltura il massimo di fucoxantina estratta si ottiene a 20°C e ad una concentrazione di glicerolo pari a 0,05 M, tuttavia, con il terreno arricchito si ottengono valori di fucoxantina elevati anche a 25°C. A bassa temperatura invece si registra un marcato effetto negativo all'aumentare del glicerolo. Con il terreno semplice f/2 si nota un marcato effetto negativo della temperatura per basse concentrazioni di glicerolo.



Terreno=1
Figura 3.30: Superficie di risposta fucoxantina, Temperatura-Glicerolo (Terreno f/2).



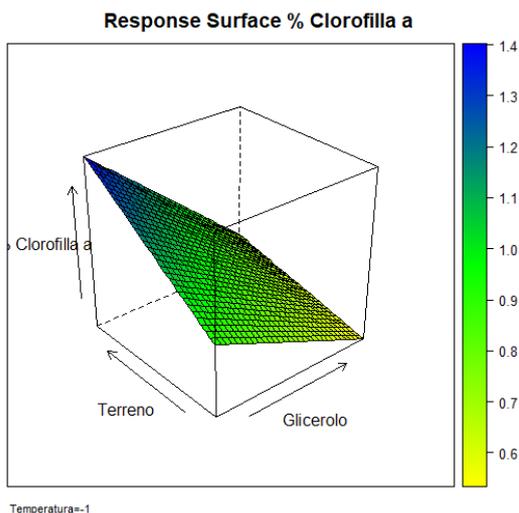
Terreno=1
Figura 3.31: Superficie di risposta fucoxantina, Temperatura-Glicerolo (Terreno f/2 NaNO₃ x10).

In questo caso, è più complesso fornire delle specifiche condizioni di crescita che consentano la massima produzione di fucoxantina, proprio perché l'interazione tra i fattori si dimostra importante. La decisione dei parametri di crescita dovrà essere effettuata a valle di considerazioni sul risparmio economico: si potrebbe quindi pensare di lavorare a temperatura di 20°C, essendo questa temperatura ottimale anche per l'aumento della velocità di crescita di *P. tricorutum*, e quindi in questo caso, la più alta concentrazione di fucoxantina si ottiene facendo crescere a 0,05 M di glicerolo e nel terreno arricchito di azoto.

Considerazioni sulla produzione di clorofilla *a* in base alle analisi effettuate

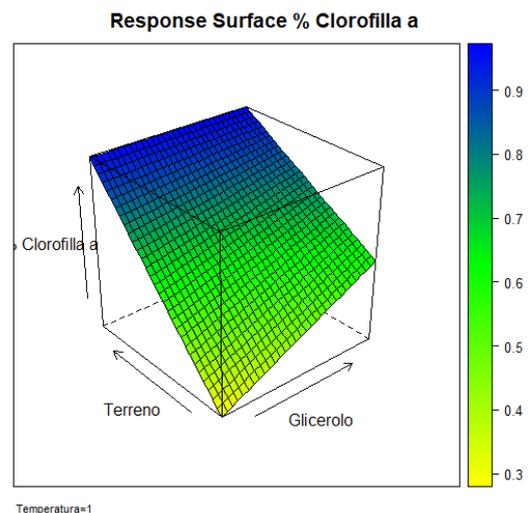
- Per una temperatura di 20°C, il massimo di clorofilla *a* si ottiene con terreno f/2 NaNO₃ x10 e glicerolo 0,05 M (test 5) ed è pari all'1,43%. Per concentrazioni elevate di glicerolo l'effetto del terreno è lieve, mentre a basse concentrazioni si nota un effetto positivo più marcato all'aumentare dei nutrienti nel terreno.

A 25 °C è evidente un minimo delle clorofille per terreno f/2 e glicerolo 0,05 M. All'aumentare dei nutrienti nel terreno si ha un aumento delle clorofille, indipendentemente dalla quantità di glicerolo. Con il terreno f/2 la produzione di clorofille aumenta all'aumentare della concentrazione di glicerolo.



Temperatura=-1

Figura 3.32: Superficie di risposta clorofilla *a*, Terreno-Glicerolo (Temperatura 20°C).

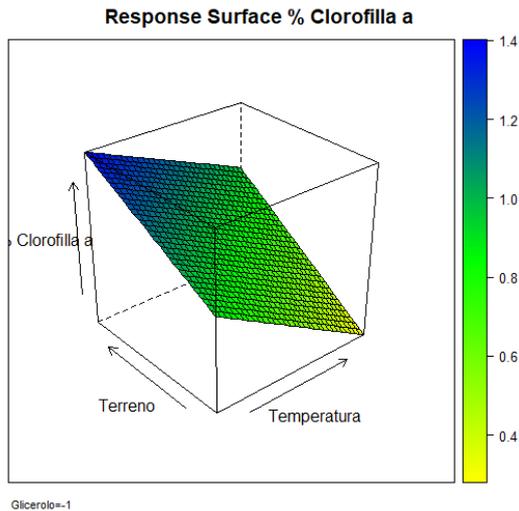


Temperatura=1

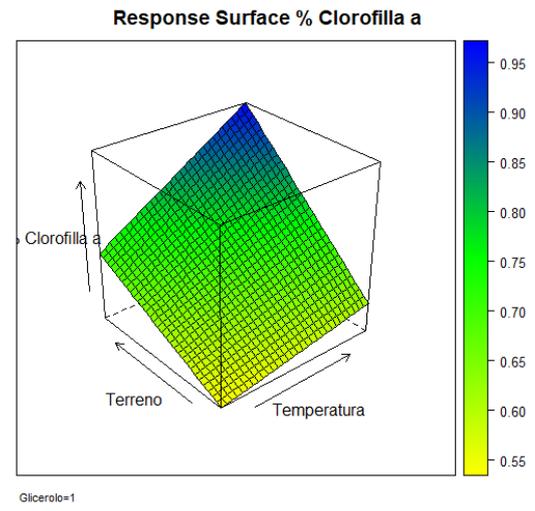
Figura 3.33: Superficie di risposta clorofilla *a*, Terreno-Glicerolo (Temperatura 25°C).

- Somministrando glicerolo 0,05 M si nota un effetto positivo dato dall'arricchimento del terreno, sia a 20°C che a 25°C. Si ha invece un effetto negativo della temperatura sia in caso di terreno f/2 che nel caso di terreno arricchito in nitrati.

Con glicerolo 0,1 M, si ottiene, anche in questo caso, un incremento della clorofilla *a* all'aumentare del fattore terreno, ma l'effetto è più marcato a 25°C. Diverso è l'effetto della temperatura, che in questo caso è positivo: all'aumentare di essa si registra un aumento della clorofilla *a*, leggero per terreno f/2 e più marcato per il terreno f/2 NaNO₃ x10.

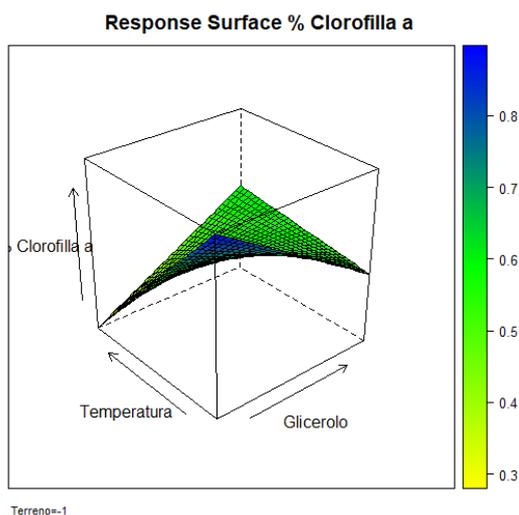


Glicerolo=-1
Figura 3.34: Superficie di risposta clorofilla *a*,
 Terreno-Temperatura (Gly 0,05M).

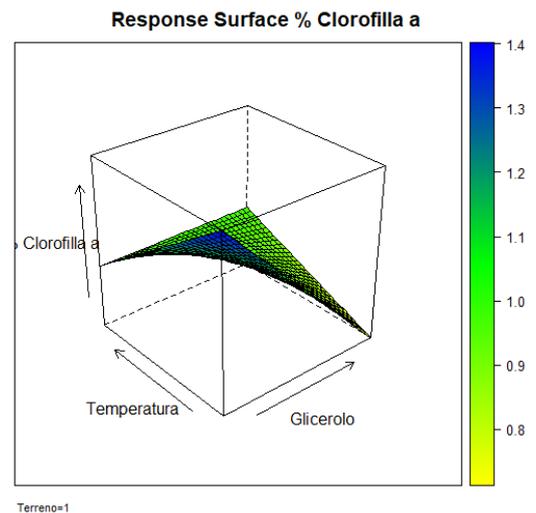


Glicerolo=1
Figura 3.35: Superficie di risposta clorofilla *a*,
 Terreno-Temperatura (Gly 0,1 M).

- Le superfici di risposta sono simili nel caso in cui si mantenga il fattore terreno costante. L'aumento di temperatura ha un effetto negativo sulla produzione di clorofilla *a* per concentrazioni di glicerolo pari a 0,05 M, mentre ha un effetto leggermente positivo con glicerolo 0,1 M. A 20°C l'aumento del glicerolo ha un effetto negativo più pronunciato nel caso di terreno arricchito, mentre a 25°C si registra un effetto positivo.



Terreno=-1
Figura 3.36: Superficie di risposta clorofilla *a*,
 Temperatura-Glicerolo (Terreno f/2).



Terreno=1
Figura 3.37: Superficie di risposta clorofilla *a*,
 Temperatura-Glicerolo (Terreno f/2 NaNO₃ x10).

Come nel caso della fucoxantina, le condizioni che portano alla maggior produzione di clorofilla *a* sono quelle del test 5, temperatura 20°C, glicerolo 0,05 M e terreno arricchito di azoto.

Considerazioni sulla produzione di clorofilla c in base alle analisi effettuate

- Per le superfici di risposta ottenute a temperatura costante valgono le considerazioni espresse per la clorofilla a.

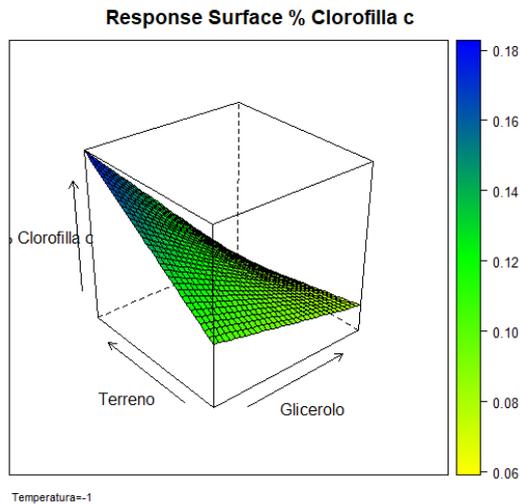


Figura 3.38: Superficie di risposta clorofilla c, Terreno-Glicerolo (Temperatura 20°C).

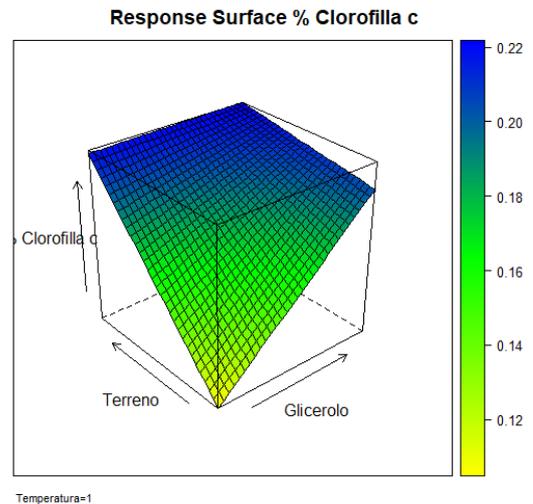


Figura 3.39: Superficie di risposta clorofilla c, Terreno-Glicerolo (Temperatura 25°C).

- Somministrando glicerolo 0,05 M si registra un incremento della clorofilla c all'aumentare del fattore terreno sia a 20°C che a 25°C. Con un terreno f/2 la temperatura non produce alcun effetto sulla produzione di clorofille c, mentre con un terreno f/2 NaNO₃ x10 si ha un leggero effetto positivo.

Del tutto differente è la situazione nel caso di glicerolo 0,1 M: si registra un marcato effetto positivo della temperatura indipendentemente dal terreno utilizzato. Il terreno ha poca influenza sia a 20 °C che a 25°C quindi se si decidesse di somministrare 0,1 M di glicerolo sarebbe conveniente incrementare leggermente la temperatura per ottenere una maggiore quantità di clorofilla c, anche se questo comporterebbe costi più elevati.

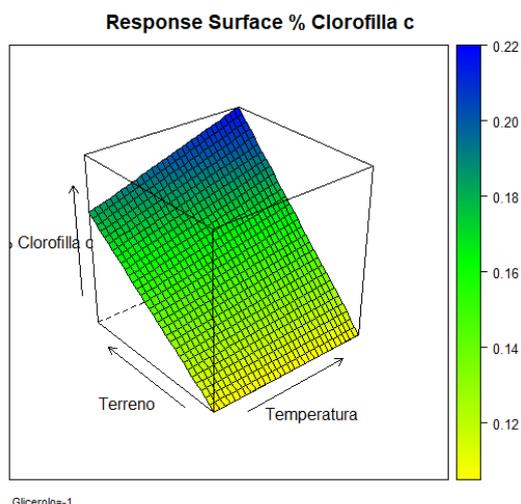


Figura 3.40: Superficie di risposta clorofilla c, Terreno-Temperatura (Gly 0,05M).

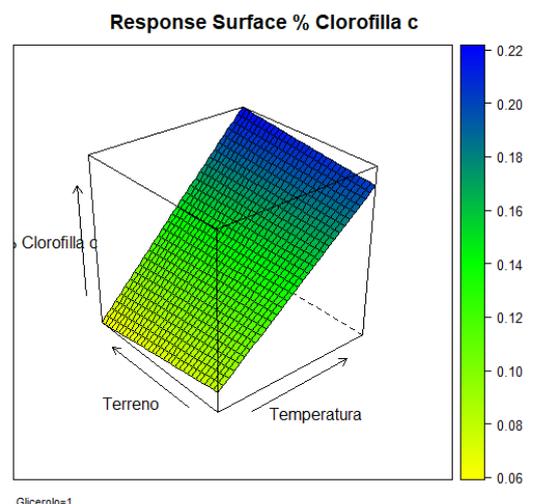


Figura 3.41: Superficie di risposta clorofilla a, Terreno-Temperatura (Gly 0,1 M).

- Utilizzando un terreno f/2 le condizioni che favoriscono la produzione di clorofille *c* sono la somministrazione di glicerolo 0,1 M e temperatura pari a 25°C (test 4). In queste condizioni operative si è ottenuto 0,22% di clorofilla *c*.

Con un terreno f/2 $\text{NaNO}_3 \times 10$ si ottiene il massimo di clorofille *c* (0,24%) a 25°C e glicerolo 0,1 M. Visto lo scarso beneficio del terreno arricchito e del maggior quantitativo di glicerolo, per ottenere elevate percentuali di clorofille *c*, è sufficiente innalzare la temperatura a 25°C. Si noti inoltre l'effetto negativo prodotto dall'aumento del glicerolo per basse temperature.

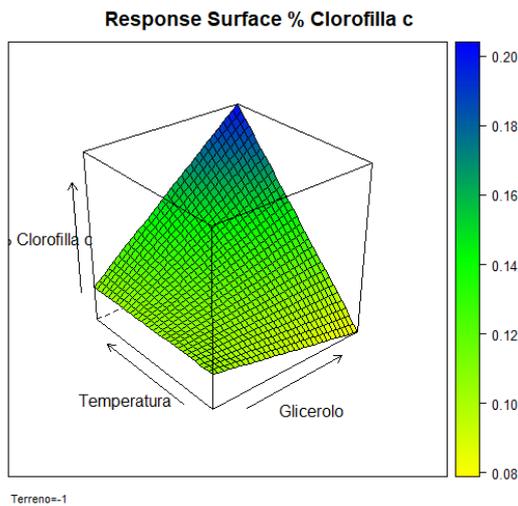


Figura 3.42: Superficie di risposta clorofilla *c*, Temperatura-Glicerolo (Terreno f/2).

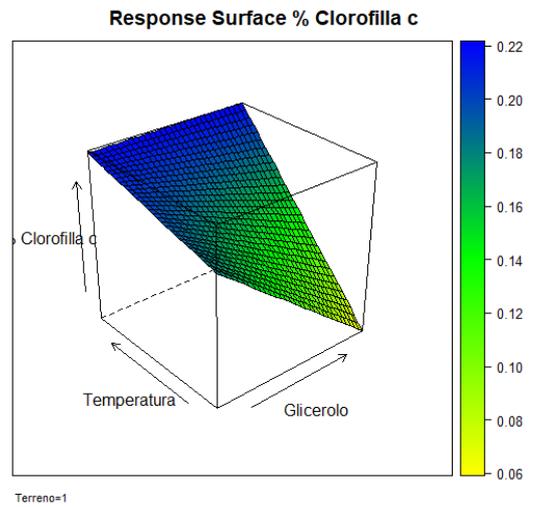


Figura 3.43: Superficie di risposta clorofilla *c*, Temperatura-Glicerolo (Terreno f/2 $\text{NaNO}_3 \times 10$).

4. Estrazione di fucoxantina con Natural Deep Eutectic Solvents

Un punto chiave dell'utilizzo di biomassa microalgale in applicazioni commerciali è l'estrazione di composti ad elevato valore aggiunto. Questa operazione è generalmente svolta mediante l'utilizzo dei tradizionali solventi organici, come le soluzioni acquose di acetone, etil acetato, metanolo, etanolo ed esano. Tuttavia, questi solventi non sempre rispecchiano un'etica di biodegradabilità e sicurezza, infatti la maggior parte di essi presentano un certo grado di tossicità, di infiammabilità/esplosività e un impatto ambientale non trascurabile (Sanjeet Mehariya et al., 2021). Si stanno studiando delle alternative per sostituire i solventi tradizionali con dei nuovi che siano ecocompatibili, facilmente riciclabili e riutilizzabili in più cicli di estrazione. Tra le varie proposte stanno suscitando particolare interesse i Natural Deep Eutectic Solvents, solventi biologici con elevata resa di estrazione.

4.1. Natural Deep Eutectic Solvents

4.1.1. Caratteristiche e proprietà

I Natural Deep Eutectic Solvents sono una nuova categoria di solventi green che presentano caratteristiche chimico-fisiche interessanti ai fini di un'estrazione ecocompatibile, come la non tossicità dei componenti e la non infiammabilità, essi sono infatti termicamente stabili, poco volatili e sono liquidi in un ampio intervallo di temperature. È opportuno considerare anche che, in caso di utilizzo di questi solventi per l'estrazione di un determinato composto di interesse dalla biomassa microalgale, sarebbe possibile non dover effettuare una fase di purificazione del prodotto ed utilizzare l'estratto direttamente in formulazioni alimentari o cosmetiche, in quanto i composti che generalmente costituiscono i NaDESs, sono già normalmente utilizzati per la formulazione di questi beni. Questo, quindi, determina un'interessante opportunità di approfondimento e studio per valutare l'effettiva applicabilità commerciale di estratti microalgali con queste tecniche estrattive.

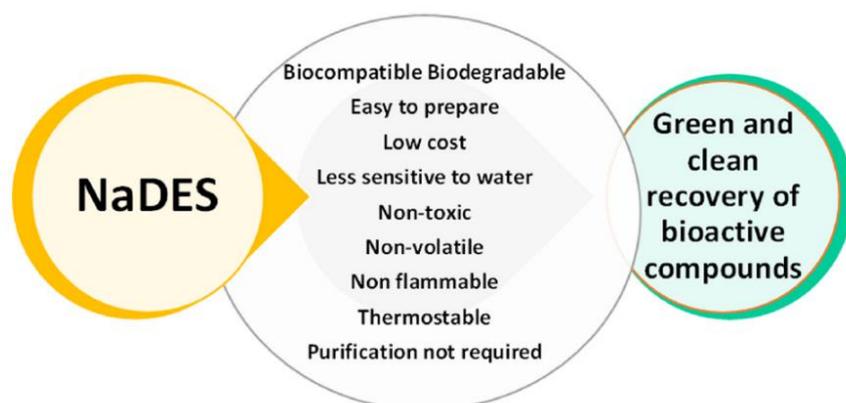


Figura 4.1: Principali caratteristiche dei NaDESs (Sanjeet Mehariya et al., 2021).

I NaDESs si ottengono miscelando due o più componenti naturali, tra cui zuccheri, alcoli dello zucchero, polialcoli, amminoacidi, acidi organici e basi organiche. Uno di questi composti funge da accettore di legami a idrogeno (HBA), l'altro da donatore di legami a idrogeno (HBD). La combinazione di due o più di questi composti in specifici rapporti molari porta alla formazione di legami a idrogeno che delocalizzano la carica e formano una miscela con un punto di fusione inferiore a quello dei singoli componenti, da qui il termine "eutettico". La miscelazione di HBD e HBA deve avvenire ad una specifica temperatura, generalmente tra 50 e 100 °C; si utilizza inoltre un miscelatore magnetico, per ottenere un liquido omogeneo (Dan Li, 2022). La miscela eutettica ottenuta viene poi portata a temperatura ambiente. Il solvente così sintetizzato è quindi pronto per la fase di estrazione.

Per incrementare ulteriormente la resa di estrazione è possibile combinare il processo a moderne tecnologie, come ultrasuoni (in questo caso si parla di *Ultrasounds-Assisted Extraction UAE*) o microonde (*Microwave-Assisted Extraction MAE*). Questo approccio presenta diversi vantaggi: rese maggiori, minor quantità di solventi necessari e minor tempo di estrazione rispetto ai solventi tradizionali.

L'estrazione assistita da microonde (MAE) consiste nell'applicazione di radiazioni elettromagnetiche non ionizzanti, di frequenza compresa tra 300 e 300.000 Mhz, che penetrando nel liquido lo riscaldano omogeneamente grazie agli effetti di rotazione del dipolo e di conduzione ionica. Il calore prodotto ha il duplice effetto di scindere i legami della parete cellulare e vaporizzare l'acqua presente all'interno della cellula, l'aumento di pressione causato dal passaggio di fase contribuisce alla rottura della cellula. Le variabili che possono influenzare la resa di estrazione sono l'intensità della radiazione, la temperatura, la natura del solvente e delle sostanze da estrarre, il volume di biomassa da trattare.

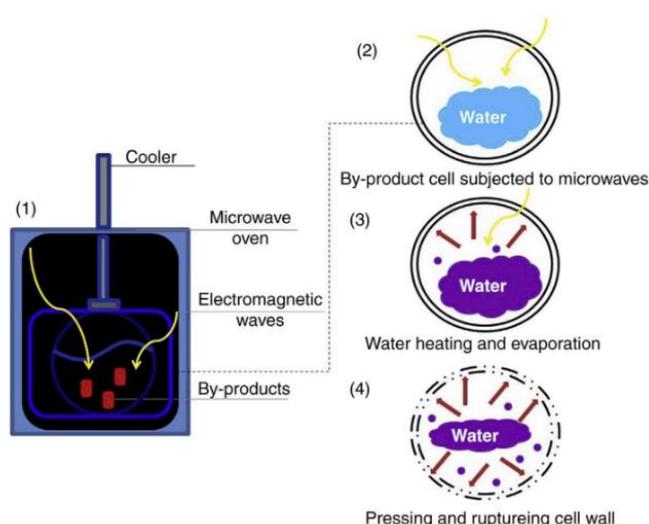


Figura 4.2: *Microwave-Assisted Extraction (MAE)* (Richard G. Maroun et al., 2017).

Come anticipato in precedenza l'estrazione assistita dagli ultrasuoni consiste nell'applicazione di onde di pressione ad ultrasuoni con frequenza compresa tra 20 kHz e 10 MHz. Queste onde generano delle microbolle, che scoppiando rilasciano energia, provocando forze di taglio, elevate pressioni e turbolenze che favoriscono la rottura delle pareti cellulari.

Questo fenomeno è noto come cavitazione e permette di incrementare l'efficienza estrattiva, poiché il solvente riesce a penetrare più rapidamente nel substrato portando ad una riduzione dei tempi di estrazione e ad un minor consumo energetico. Anche questa tecnologia permette di modulare alcuni parametri come la frequenza e l'intensità degli ultrasuoni, la potenza, la temperatura e la tipologia di apparecchiatura.

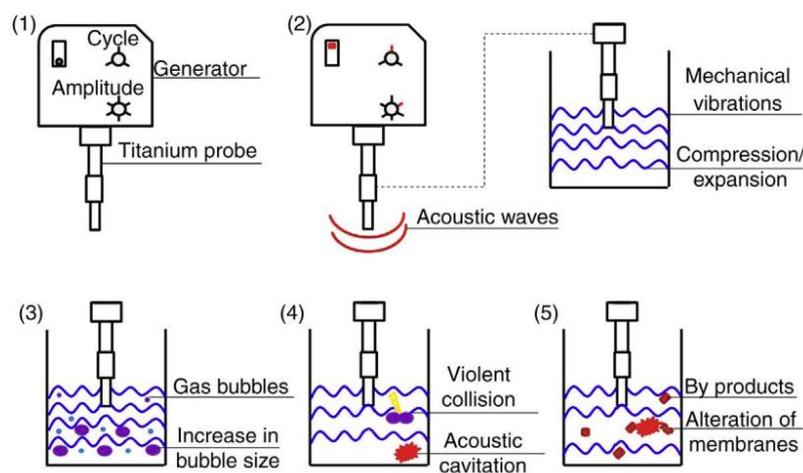


Figura 4.3: *Ultrasound- Assisted Extraction (UAE)* (Richard G. Maroun et al., 2017).

Entrambe le tecnologie causano un incremento della temperatura del sistema, è quindi buona norma adottare sistemi di controllo della temperatura, specialmente per l'estrazione di composti termolabili.

Numerosi studi dimostrano la maggior efficacia dell'estrazione assistita dagli ultrasuoni o dalle microonde rispetto all'estrazione semplice, tuttavia, queste tecnologie comportano un maggior consumo di energia, che deve essere compensato da un notevole incremento della quantità di prodotti estratti, in modo da rendere il processo competitivo sul piano economico.

Per quanto riguarda la sostenibilità del processo sono stati svolti diversi studi per quantificare le emissioni di gas serra nei due casi e determinare la tecnologia più vantaggiosa, ma l'efficienza estrattiva è influenzata dalle specifiche del processo; quindi, in alcuni casi può risultare migliore la UAE in altri casi la MAE.

Secondo uno studio condotto da Santana et al. sulla sostenibilità di un processo di estrazione assistito da ultrasuoni e dalle microonde mediante un NaDES ternario, si è riscontrato che i due processi sono sostenibili e non vi è una differenza rilevante fra i due in termini di consumi energetici. Tuttavia, è bene effettuare degli studi in laboratorio per verificare la tecnologia più vantaggiosa per il proprio processo prima di svilupparlo su scala industriale.

Si riportano di seguito le principali proprietà chimico-fisiche dei Natural Deep Eutectic Solvents.

Viscosità

La maggior parte dei DES si presenta come un liquido viscoso a temperatura ambiente, con valori di viscosità che si aggirano tra 0,1 e 50 Pa·s, ciò potrebbe ridurre e/o ostacolare l'efficacia estrattiva del solvente stesso a causa della riduzione dei coefficienti responsabili del trasferimento di materia che avviene durante l'estrazione dalla biomassa verso il solvente. La viscosità è dovuta all'elevato numero di legami idrogeno ed altre interazioni secondarie, come forze di Van der Waals ed elettrostatiche tra HBA e HBD, e dipende da diversi fattori come la natura chimica dei composti chimici, la temperatura, la massa molare e il rapporto molare. Per ridurre la viscosità del solvente e facilitare così le operazioni di estrazione è possibile agire in diversi modi. È possibile alzare la temperatura alla quale si fa avvenire l'estrazione in quanto la viscosità è un parametro che diminuisce all'aumentare della temperatura, con il rischio però di poter danneggiare composti termosensibili (come ad esempio la fucoxantina). Oppure si può aggiungere e/o incrementare il contenuto di acqua utilizzato per comporre il solvente. In questo modo si verifica una riduzione del numero di legami a idrogeno esistenti tra i componenti del solvente HBA e HBD, il che consente una maggiore solubilizzazione del soluto. Bisogna tuttavia fare attenzione a non incrementare la quantità di acqua oltre il 50% in volume per non solubilizzare i componenti stessi del NaDES in acqua, perdendo così l'identità del solvente stesso e la sua efficacia estrattiva (Dan Li, 2022).

Densità

La maggior parte dei NaDESs presenta una densità maggiore rispetto all'acqua, solitamente compresa tra 1,0 e 1,35 g/cm³, a temperatura ambiente. I fattori che influenzano la densità dei NaDESs sono l'organizzazione molecolare, la temperatura e il rapporto molare HBA: HBD. In particolare, l'innalzamento della temperatura determina un crescente movimento delle molecole e del volume libero con conseguente riduzione della densità (Anuradha Saini et al., 2022).

Conduttività elettrica

I NaDESs sono caratterizzati da una bassa conduttività (<1 mS/cm a temperatura ambiente). La conduttività elettrica dipende principalmente dalla temperatura, fornendo calore infatti aumenta l'energia cinetica degli ioni, che si muoveranno più velocemente determinando un aumento della conducibilità. L'aumento della temperatura ha anche l'effetto di diminuire la viscosità poiché l'energia fornita è utilizzata per vincere le forze intermolecolari. La conduttività e la viscosità sono quindi correlate (Anuradha Saini et al., 2022).

Polarità

La polarità è una proprietà molto importante in fase di estrazione poiché influisce sulla capacità dei NaDESs di solubilizzare determinati soluti. La scelta dei componenti del solvente è quindi molto importante e si basa sulla natura del componente che si vuole estrarre e dalla matrice di partenza. I NaDESs che presentano maggior polarità sono quelli costituiti dagli acidi organici, seguiti da quelli a base di amminoacidi. Quelli con minor polarità sono invece costituiti da zuccheri e polialcoli. La polarità dei NaDESs può essere inoltre modulata incrementando il contenuto di acqua (Yuntao Dai et al., 2013).

Tensione superficiale

La tensione superficiale è una grandezza che indica l'energia necessaria per aumentare l'area superficiale di un liquido. Nei NaDESs si riscontra generalmente un'elevata tensione superficiale e questa è influenzata da diversi fattori, tra i quali le forze intermolecolari, la natura del catione e la temperatura. Studi sperimentali hanno riportato che i cationi con catene alchiliche più lunghe sono caratterizzati da valori più elevati di tensione superficiale, mentre si ha una diminuzione con l'aumento della frazione molare di HBA, poiché diminuiscono le interazioni intermolecolari (Dan Li, 2022).

4.1.2. Fattori operativi che influenzano l'efficacia estrattiva dei NaDESs

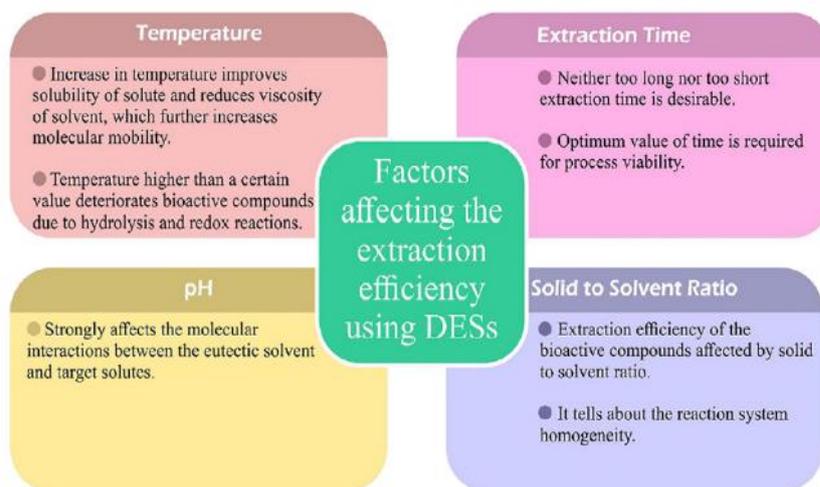


Figura 4.4: Fattori che influenzano l'efficacia estrattiva dei NaDESs (Anuradha Saini et al., 2022)

Temperatura

La temperatura è un fattore cruciale nel processo di estrazione, generalmente un suo innalzamento favorisce l'operazione grazie al conseguente incremento della solubilità del soluto e alla riduzione della viscosità che consente una maggior mobilità molecolare (Anuradha Saini et al., 2022). La temperatura ottimale di estrazione deve però tenere conto della termolabilità dei composti coinvolti, delle reazioni secondarie e dei costi energetici.

Spesso, infatti, si ha a che fare con sostanze che possono venire degradate dalle alte temperature, quindi, è bene mantenersi al di sotto del valore critico. Inoltre, non sempre una temperatura più alta determina rese di estrazione maggiori, poiché subentrano dei fenomeni chimici che possono favorire il verificarsi di reazioni secondarie che ostacolano l'estrazione del prodotto di interesse. Oltretutto, se la resa di estrazione non è nettamente incrementata dall'aumento di temperatura, è consigliato condurre l'estrazione ad un valore più basso per evitare di avere costi superflui per il riscaldamento del solvente.

Tempo di estrazione

Il tempo di estrazione è un altro fattore fondamentale nel processo di estrazione. Non esiste una tempistica comune, ma il tempo ottimale va determinato considerando vari fattori tra cui, il NaDES utilizzato, il composto che si vuole estrarre, la matrice di partenza e le altre variabili operative. Un tempo di estrazione troppo elevato può portare alla degradazione ossidativa delle sostanze di interesse mentre un tempo troppo breve può non essere sufficiente a completare l'estrazione. In entrambi i casi si ha una riduzione dell'efficienza estrattiva e uno spreco di risorse energetiche ed economiche. Determinare un tempo di estrazione ottimale permette di minimizzare la spesa energetica necessaria per il riscaldamento dei reagenti e al contempo di massimizzare la resa di estrazione (Anuradha Saini et al., 2022).

pH

Il pH ha una forte influenza sulle interazioni molecolari tra il NaDES e il composto da estrarre, per questo è un importante fattore da tenere in considerazione nella fase di estrazione. Variazioni del pH possono infatti modificare la capacità del solvente di estrarre un determinato composto, riducendo o incrementando la resa dell'operazione. Solventi più acidi sono generalmente più estrattivi poiché in grado di scindere un maggior numero di legami. L'acidità dei NaDESs è in particolare influenzata dalla natura chimica del donatore di legami a idrogeno, diversi studi hanno infatti dimostrato che la presenza di un composto acido come HBD rende la miscela eutettica più acida. Il pH può essere inoltre soggetto a variazioni in seguito all'aggiunta di acqua (Faiznur Mohd Fuad et al., 2021).

Rapporto solido/solvente

Il rapporto solido/solvente è un fattore chiave nel processo di estrazione con i NaDESs poiché assicura l'omogeneità del sistema di reazione. Valori ottimali di questo rapporto devono essere determinati da caso a caso, considerando la tipologia di NaDES, le condizioni operative e le caratteristiche fisico-chimiche del sistema. Valori troppo bassi di questo rapporto significano quantità elevate di solvente con conseguente mal distribuzione rispetto al solido da estrarre, riduzione della resa di estrazione e al contempo costi più elevati. Valori troppo elevati del rapporto invece stanno ad indicare una minor quantità di solvente che interagisce con il solido, quindi una peggiore dispersione che ne riduce anche in questo caso la capacità estrattiva. Elevate concentrazioni di substrato possono inoltre limitare la cinetica della reazione di estrazione in quanto le particelle del solido richiederebbero un tempo di diffusione maggiore.

4.2. Screening NaDESs

4.2.1. Scopo dell'esperimento

Questa fase sperimentale si divide in due step:

- In un primo momento è stata effettuata una campagna di screening per selezionare il NaDES che fornisse rese di estrazione di fucoxantina maggiori. A tal proposito sono stati selezionati diversi NaDESs, tenendo conto della biomassa e del prodotto che si è interessati ad estrarre, sono state effettuate le prove di estrazione, analizzando infine la quantità di fucoxantina estratta con HPLC.
- Sono stati scelti i due NaDESs che hanno dimostrato maggior efficacia nell'estrazione ed è stato sviluppato un DoE per effettuare una serie di estrazioni in diverse condizioni di temperatura, tempo e tecnologia di estrazione. Dall'analisi dei risultati è stato possibile determinare le condizioni ottimali per ottenere la massima la produttività di fucoxantina.

4.2.2. Scelta dei NaDESs

Poiché in questo studio si è interessati all'estrazione della fucoxantina, un pigmento largamente utilizzato nella cosmetica, è stata condotta un'attenta analisi di letteratura per selezionare dei NaDESs con determinati rapporti molari, che presentassero elevate capacità estrattive e che fossero costituiti da composti naturali, biodegradabili e già presenti in alcune formulazioni cosmetiche.

Sono stati scelti undici NaDESs che presentassero le proprietà citate sopra.

Componente 1	Componente 2	Rapporto molare	Identificativo	Solubilità
Betaina	Glicerolo	1:2	Bet-Gly	Idrofilo
Betaina	Glicerolo	1:4	Bet-Gly	Idrofilo
Acido lattico	Betaina	2:1	Lac-Bet	Idrofilo
Acido lattico	Glicerolo	1:1	Lac-Gly	Idrofilo
Mentolo	Acido lattico	1:2	Ment-Lac	Idrofobo
Mentolo	Acido ottanoico	1:1	Ment-Oct	Idrofobo
Mentolo	Acido levulinico	1:2	Ment-Lev	Idrofobo
Acido ottanoico	Acido laurico	3:1	Oct-Lau	Idrofobo
Acido nonanoico	Acido laurico	3:1	Non-Lau	Idrofobo
Cloruro di benziltriethylammonio	Acido ottanoico	1:2	BTEA-Oct	Idrofilo
Cloruro di benziltriethylammonio	Acido lattico	1:2	BTEA-Lac	Idrofilo

Tabella 4.1: NaDESs scelti per l'estrazione della fucoxantina.

In generale i NaDESs idrofili hanno mostrato una viscosità più elevata ad eccezione di quelli contenenti acido lattico, mentre NaDESs idrofobici hanno tutti mostrato una bassa viscosità, il che può favorire il trasferimento di massa favorendo il processo estrattivo.

Di seguito una rassegna dei componenti utilizzati per la sintesi dei NaDESs e le loro principali caratteristiche e applicazioni. Come si può notare, sono stati esclusi i composti non autorizzati per l'uso nelle formulazioni cosmetiche come ad esempio la Colina Cloridrato, composto molto spesso utilizzato per sintetizzare Deep Eutectic Solvents.

Betaina

- Formula molecolare: $C_5H_{11}NO_2$
- Peso molecolare: 117.15 g/mol
- n. CAS 107-43-7

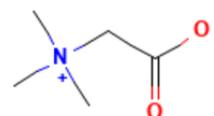


Figura 4.5: Betaina (PubChem, 2023).

La betaina è un derivato trimetilico della glicina, per questo è anche nota come trimetilglicina o N,N,N trimetilammonioacetato (IUPAC). È sintetizzata nel fegato e nei reni e può essere assunta tramite la dieta, in particolare dalle barbabietole da zucchero che ne sono la principale fonte. È un composto stabile, non tossico e solubile in acqua. Svolge un ruolo importante nell'idratazione cellulare e nel mantenimento della funzione cellulare. (Christopher R. Day, Stephen A. Kempson, 2016). Diversi studi hanno anche rilevato effetti benefici nella cura di malattie come l'obesità, il diabete, il cancro, e l'Alzheimer (Guangfu Zhao et al., 2018).

Glicerolo

- Formula molecolare: $C_3H_8O_3$
- Peso molecolare: 92.09 g/mol
- N. CAS 56-81-5

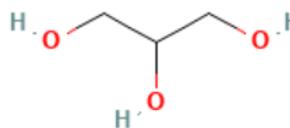


Figura 4.6: Glicerolo (PubChem, 2023).

Il glicerolo, o glicerina, è un composto organico costituito da tre atomi di carbonio legati a tre gruppi ossidrilici. Si presenta come un liquido viscoso incolore e inodore. Grazie alla presenza dei gruppi -OH è una molecola igroscopica e solubile in acqua. È un composto molto versatile che trova impiego in diversi settori industriali, tra cui quello cosmetico, nella produzione di creme e balsami, grazie alle sue proprietà emollienti e antiinfiammatorie. Nell'industria alimentare è utilizzato come additivo o intermedio per la produzione di una vasta gamma di prodotti. È inoltre utilizzata in formulazioni farmaceutiche per il suo effetto umidificante e lubrificante. Negli ultimi anni si sta diffondendo l'uso di biocarburanti, in particolare uno dei maggiori sottoprodotti della produzione di biodiesel è il glicerolo grezzo, prodotto in quantità tali da suscitare l'interesse di molti studiosi che ne stanno analizzando il potenziale (Nur Izyan Wan Azelee et al., 2019).

Acido lattico

- Formula molecolare: $C_3H_6O_3$
- Peso molecolare: 90,08 g/mol
- n. CAS 50-21-5

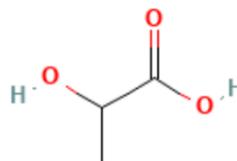


Figura 4.7: Acido lattico (PubChem, 2023).

L'acido lattico (nome IUPAC: acido 2-idrossipropanoico) è un acido organico che si presenta sottoforma di solido di colore bianco, miscibile in acqua. Grazie al suo riconoscimento come prodotto chimico GRAS (Generally Recognized As Safe) trova impiego in molte applicazioni industriali. Il campo in cui trova maggior impegno è quello alimentare per la produzione di yogurt e formaggi. Nel campo cosmetico è utilizzato nella formulazione di creme e prodotti per la cura della pelle, grazie alle sue proprietà antimicrobiche e idratanti. In campo farmaceutico è utilizzato per la creazione di farmaci dermatologici e contro l'osteoporosi. Esistono due stereoisomeri, l'isomero L (+) che può essere sintetizzato dal nostro organismo, e l'isomero D (-). A seconda dell'applicazione si predilige l'uno o l'altro, o una miscela racemica. Inoltre, l'acido lattico può essere prodotto tramite fermentazione o sintesi chimica (Fabio Andres Castillo Martinez et al., 2013).

Acido ottanoico

- Formula molecolare: $C_8H_{16}O_2$
- Peso molecolare: 144,21 g/mol
- n. CAS 124-07-2

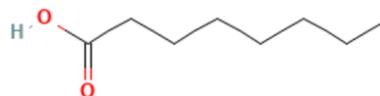


Figura 4.8: Acido ottanoico (PubChem, 2023).

L'acido ottanoico, conosciuto anche come acido caprilico, è un acido carbossilico presente nel latte di alcuni mammiferi e in misura minore nell'olio di cocco e dei palmisto. Si trova in diversi alimenti come agente aromatizzante. Grazie al suo potere antimicrobico, pesticida, alghicida, battericida e fungicida, trova impiego come igienizzante di superfici a contatto con gli alimenti e per la cura di alcune infezioni batteriche. È impiegato anche nell'industria alimentare come agente aromatizzante o negli integratori che aiutano a bruciare le calorie in eccesso. L'acido caprilico è uno dei vari alimenti medicinali che hanno particolari benefici per la salute e in particolare nel controllo di malattie neurodegenerative, come la demenza e l'Alzheimer (Manjun Mungali et al., 2021).

Acido nonanoico

- Formula molecolare: $C_9H_{18}O_2$
- Peso molecolare: 158,24 g/mol
- n. CAS 112-05-0

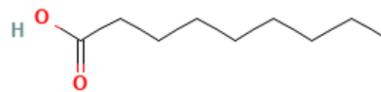


Figura 4.9: Acido nonanoico (PubChem, 2023).

L'acido nonanoico, conosciuto anche come acido pelargonico, è un acido grasso utilizzato nella cosmetica come tensioattivo detergente ed emulsionante e nell'industria alimentare come sostanza aromatizzante o adiuvante (Wilbur Johnson Jr et al., 2011).

Acido laurico

- Formula molecolare: $C_{12}H_{24}O_2$
- Peso molecolare: 200,32 g/mol
- n. CAS 143-07-7

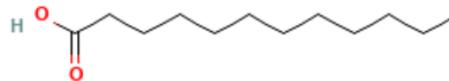


Figura 4.10: Acido laurico (PubChem, 2023).

L'acido laurico è un acido grasso saturo, che si presenta come un solido di colore bianco. La fonte principale di questo composto naturale è l'olio di cocco. L'acido laurico è inoltre presente naturalmente nei trigliceridi della pelle per questo motivo trova impiego nella formulazione di creme e prodotti per la pelle. Presenta attività antimicrobica ed è particolarmente attivo verso batteri gram positivi e diversi virus e funghi. Questo composto chimico non presenta alcuna tossicità per l'uomo, infatti circa il 5% degli acidi grassi presenti nel latte umano sono costituiti dall'acido laurico (Fabian M. Dayrit, 2015).

Acido levulinico

- Formula molecolare: $C_5H_8O_3$
- Peso molecolare: 116,11 g/mol
- n. CAS 123-76-2

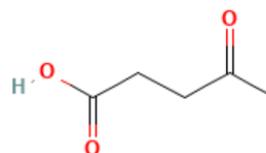


Figura 4.11: Acido levulinico (PubChem, 2023).

L'acido levulinico è un acido carbossilico derivato dall'acido 3-idrossipropanoico ed è solitamente prodotto dalla degradazione della cellulosa, attraverso processi di idrolisi e deidratazione. È utilizzato come intermedio nella sintesi di numerosi prodotti ad elevato valore aggiunto impiegati nella produzione di plastiche biodegradabili, solventi biologici e biocarburanti. Trova anche impiego in formulazioni cosmetiche con lo scopo di migliorare la stabilità e conferire proprietà idratanti, nell'industria alimentare come conservante o agente aromatizzante e nell'industria farmaceutica per la produzione di pillole, capsule e antidoti (Anuj Kumar et al., 2020).

Cloruro di benziltriethylammonio

- Formula molecolare: $C_{13}H_{22}ClN$
- Peso molecolare: 227,77 g/mol
- n. CAS 56-37-1

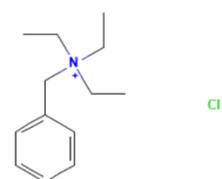


Figura 4.12: Cloruro di benziltriethylammonio (PubChem, 2023).

Il cloruro di benziltriethylammonio è un'ammina quaternaria che si presenta come una polvere bianca cristallina. Viene utilizzato nell'industria chimica come agente polimerizzante e come catalizzatore per trasferimento di fase. Inoltre, trova impiego nel settore cosmetico come agente antistatico (National Center for Biotechnology Information, PubChem, Benzyltriethylammoniumchloride, 2023).

Mentolo

- Formula molecolare: $C_{10}H_{20}O$
- Peso molecolare: 156.26 g/mol
- n. CAS 1490-04-6

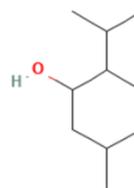


Figura 4.13: Mentolo (PubChem, 2023).

Il mentolo è un monoterpene ciclico contenente un gruppo ossidrilico che si presenta come un solido cristallino incolore a temperatura ambiente. Viene estratto dall'olio essenziale della *Mentha canadensis* e della *Mentha piperita* che gli conferisce un forte aroma caratteristico ed è per questo utilizzato come additivo aromatizzante in numerosi prodotti alimentari, cosmetici, farmaceutici. È noto anche per il suo effetto rinfrescante quando viene inalato, masticato o applicato sulla pelle, grazie alla sua capacità di attivare il TRPM8, un canale ionico termosensibile. È diffuso anche nell'ambito farmaceutico grazie alle proprietà analgesiche, antinfiammatorie, antifungine, antivirali e antibatteriche (Guy P.P. Kamatou et al., 2013).

4.2.3. Preparazione dei NaDESs



Figure 4.14: Riscaldamento della miscela eutettica per la sintesi del NaDES.

I NaDESs vengono sintetizzati miscelando le due o tre sostanze che lo costituiscono, nel rapporto molare prefissato. Vengono inseriti i vari componenti in un apposito contenitore, pesandoli con una bilancia da laboratorio. La miscela viene poi riscaldata su una piastra termica per mantenerla alla temperatura di 80 °C agitandola magneticamente mediante un'ancoretta posta all'interno del contenitore, fino ad ottenere un liquido incolore. Questa tipologia di solvente presenta elevata viscosità, dunque il riscaldamento e il mixing sono importanti per ottenere un prodotto omogeneo.

Nella foto di seguito si possono vedere gli 11 NaDESs sintetizzati, che presentano un aspetto simile, ovvero liquidi trasparenti relativamente viscosi.

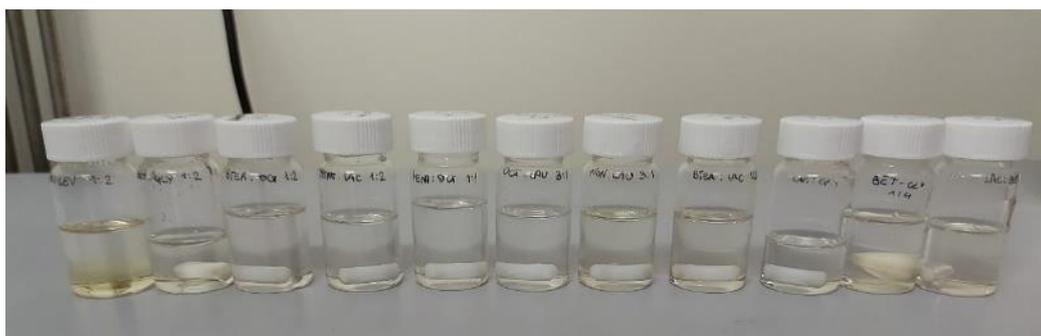


Figura 4.15: NaDESs sintetizzati.

4.2.4. Misura della densità

Per determinare la densità dei singoli NaDESs è stato prelevato 1 mL di solvente con una pipetta graduata, lo si è pesato con una bilancia di precisione ed è stata calcolata la densità con la formula:

$$\text{Densità} \left(\frac{g}{mL} \right) = \frac{\text{Massa (g)}}{\text{Volume (mL)}} \quad (4.1)$$

Nella tabella 4.2 si riportano i risultati ottenuti:

NaDES	Densità (g/mL)
Bet-Gly	1,205
Bet-Gly	1,241
Lac-Bet	1,205
Lac-Gly	1,233
Ment-Lac	1,004
Ment-Lev	1,894
Ment-Oct	0,896
Oct-Lau	0,891
Non-Lau	0,963
BTEA-Oct	1,092
BTEA-Lac	1,018

Tabella 4.2: Densità dei NaDESs sintetizzati.

4.2.5. Estrazione ed analisi HPLC

Per effettuare l'estrazione sono stati prelevati 2 g di NaDES e inseriti all'interno di una falcon da 15 mL alla quale sono stati aggiunti 0,1 g di biomassa algale già essiccata e polverizzata di *Phytobloom Phaeodactylum tricornutum* acquistata da Necton, azienda specializzata nella coltivazione e commercializzazione di microalghe e loro derivati per applicazioni in ambito cosmetico, farmaceutico, nutraceutico e mangimistico.

È stata eseguita un'estrazione a 35°C per circa un'ora, passando la falcon nel vortex a intervalli di 10 minuti. Si è poi centrifugato a 25°C, 5000 rpm, per 10 minuti ottenendo due fasi, la biomassa esausta e il surnatante contenente la fucoxantina estratta. Il surnatante è stato prelevato e diluito con etanolo puro con rapporto di diluizione 1:50 per poter essere analizzato all'HPLC.

Di seguito si possono visualizzare gli estratti ottenuti dall'estrazione con i vari NaDESs, diluiti con etanolo.

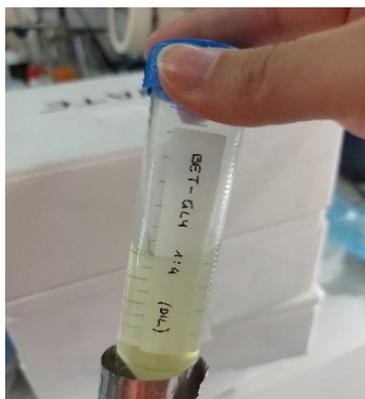


Figura 4.16: *Bet-Gly 1:4.*

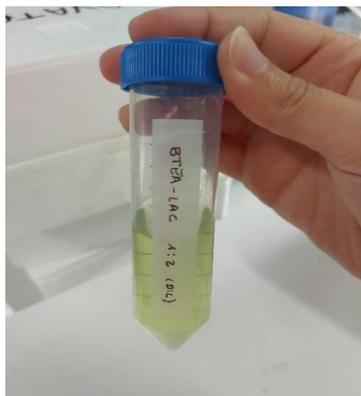


Figura 4.17: *BTEA-Lac 1:2*



Figura 4.18: *Bet-Gly 1:2.*

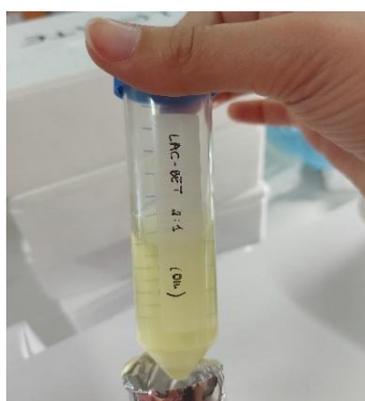


Figura 4.19: *Lac-Bet 2:1.*



Figura 4.20: *BTEA-Oct 1:2.*



Figura 4.21: *Lac-Gly 1:1.*

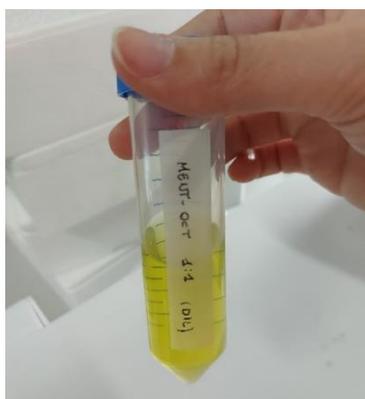


Figura 4.22: *Ment-Oct 1:1.*

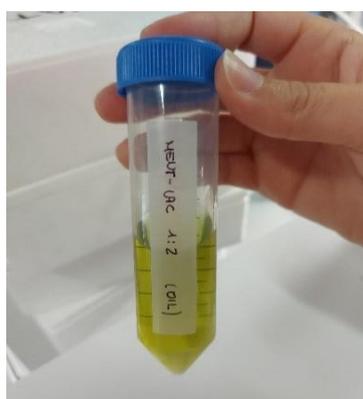


Figura 4.23: *Ment-Lac 1:2.*



Figura 4.24: *Oct-Lau 3:1.*

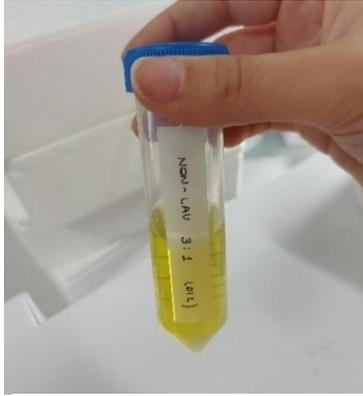


Figura 4.25: *Non-Lau 3:1.*

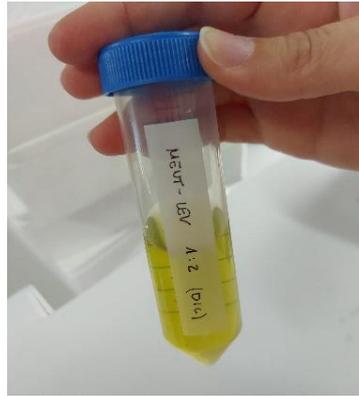


Figura 4.26: *Ment-Lev 1:2.*

4.2.6. Risultati screening

L'analisi all'HPLC permette di ottenere l'area del picco corrispondente alla fucoxantina e da questo è possibile calcolarne la concentrazione (mg/L) mediante la retta di taratura, ottenuta precedentemente.

$$Fx \text{ (mg/L)} = \frac{\text{Area del picco} + 3455,5}{34920} \quad (4.2)$$

Si moltiplica poi per il volume di NaDES utilizzato per l'estrazione e per il fattore di diluizione con etanolo (50), ottenendo i mg di fucoxantina.

Infine, si calcola la percentuale di fucoxantina come il rapporto tra i mg della stessa e i mg di biomassa iniziale, moltiplicato per 100.

NaDESs	Area picco Fx	Fx (mg/L)	Fx (mg)	Fx (%)
Ment-Lev 1:2	333470	482,43	0,954	0,95
Non-Lau 3:1	233903	339,86	0,766	0,76
Oct-Lau 3:1	188181	274,39	0,615	0,61
Ment-Lac 1:2	181126	264,29	0,527	0,52
Ment-Oct 1:1	155890	228,16	0,514	0,51
Lac-Gly 1:1	139447	204,61	0,333	0,33
Btea-Oct 1:2	88405	131,53	0,274	0,27
Lac-Bet 2:1	47144	72,45	0,121	0,12
Bet-Gly 1:2	45243	69,73	0,116	0,12
Btea-Lac 1:2	34945	54,98	0,102	0,10
Bet-Gly 1:4	21829	36,20	0,059	0,06

Tabella 4.3: *Dati ottenuti dall'analisi HPLC.*

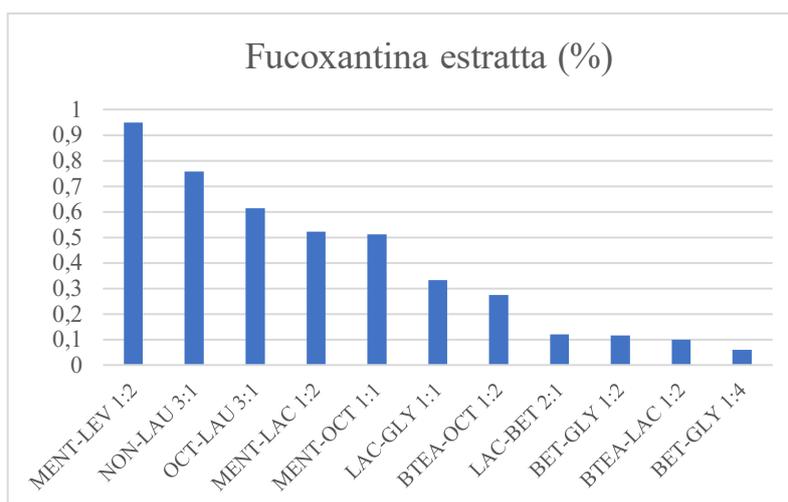


Figura 4.27: Riepilogo dei valori percentuali di fucoxantina estratta con ciascun NaDES.

Nella tabella 4.18 sono stati riportati i dati ottenuti dall'analisi all'HPLC in ordine di fucoxantina estratta. Possiamo notare che le combinazioni di NaDESs che hanno fornito i risultati più promettenti sono Ment:Lev (1:2) e Non:Lau (3:1). Come si può vedere dalle foto sopra, il liquido estratto con questi solventi presenta una colorazione più scura rispetto agli altri, ciò potrebbe indicare una concentrazione maggiore di fucoxantina.

4.3. Estrazione di fucoxantina con Ment:Lev e Non:Lau

A fronte dei risultati riportati si è deciso di elaborare un Design of Experiment per le estrazioni di fucoxantina con i due NaDESs che hanno riportato rese di estrazione maggiori, ovvero, Ment:Lev (NaDES 1) e Non:Lau (NaDES 2).

Si è deciso di valutare l'influenza dei seguenti fattori operativi sulla resa di estrazione: temperatura e tempo di estrazione, tipo di solvente (tra i due migliori ottenuti dallo screening), l'utilizzo di ultrasuoni oppure l'estrazione semplice.

4.3.1. Variabili operative testate

Di seguito è riportato un riepilogo delle condizioni operative che sono state testate.

NaDES	Tecnica	Temperatura	Tempo di estrazione
Ment:Lev	Semplice	25 °C	5 minuti
Non:Lau	Ultrasuoni	40 °C	10 minuti
		50 °C	20 minuti

Tabella 4.4: Riepilogo delle variabili operative testate.

4.3.2. Design of Experiment

Come descritto in precedenza i fattori da investigare sono:

- Temperatura;
- Tempo di estrazione;
- Tipologia di estrazione (ultrasuoni o no);
- Tipologia di solvente (Ment:Lev o Non:Lau).

In questo caso, a differenza del DoE ottenuto per valutare la crescita, non è possibile utilizzare lo stesso metodo per produrre il piano sperimentale dei test in quanto alcune variabili sono quantitative (temperatura e tempo) per le quali è possibile definire un livello alto ed un livello basso, mentre altre sono variabili qualitative (tipologia di estrazione e tipologia di solvente) che non hanno un livello alto e basso ma semplicemente due “qualità” diverse. Pertanto, per ottenere un piano sperimentale dei test è necessario utilizzare un approccio differente chiamato D-optimal, molto utile nei casi in cui non è possibile utilizzare il design classico a causa della tipologia delle variabili, o anche nel caso in cui si vogliono investigare i fattori ad un numero diverso di livelli (ad esempio il fattore A da investigare su 3 livelli ed il fattore B da investigare su 5 livelli).

Il design D-optimal è una metodologia che utilizza un determinato criterio (il criterio dell’optimal) per massimizzare il determinante della matrice $X^T X$, dove X è la matrice dei coefficienti del modello e X^T è la sua trasposta, tramite una procedura iterativa. Fattivamente, mediante l’utilizzo del software CAT, si forniscono il numero di variabili da investigare (fattori), la loro tipologia (qualitative o quantitative) e i livelli (o qualità) da investigare. Il software restituisce la variazione del logaritmo del determinante della matrice $X^T X$ al variare del numero di test sperimentali che si vuole effettuare. Il massimo del determinante corrisponde al massimo della curva e corrisponde anche al massimo di informazioni che è possibile ricavare dal modello se si effettua un numero di test pari a questo punto della curva.

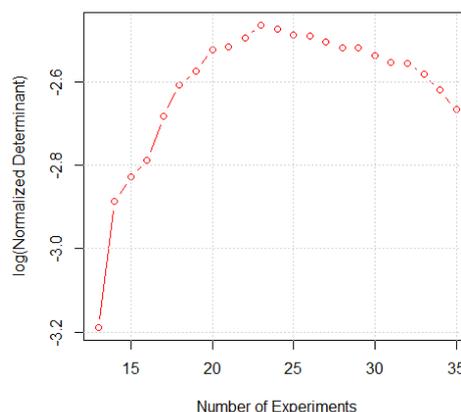


Figura 4.28. Grafico che rappresenta la variazione del logaritmo del determinante della matrice $X^T X$ al variare del numero di test.

Dal grafico si vede come il maggior numero di informazioni può essere ottenuto effettuando 23 test e nuovamente si sottolinea l'importanza di utilizzare approcci di Design of Experiment che consentono di risparmiare tempo e risorse. Infatti, se si decidesse di effettuare 35 test si sprecherebbero risorse non aggiungendo peraltro nessuna informazione aggiuntiva allo studio.

Si è quindi deciso di procedere effettuando questi 23 test, le cui combinazioni di condizioni operative sono fornite direttamente dal software. Ogni test è stato effettuato in duplicato.

Le condizioni testate sono le seguenti:

ESTRAZIONE SEMPLICE			
Test	NaDES	Tempo (minuti)	Temperatura (°C)
1	Ment-Lev	5	25
2	Non-Lau	5	25
5	Ment-Lev	10	25
9	Ment-Lev	20	25
10	Non-Lau	20	25
18	Non-Lau	10	40
21	Ment-Lev	20	40
25	Ment-Lev	5	50
26	Non-Lau	5	50
33	Ment-Lev	20	50
34	Non-Lau	20	50

Tabella 4.5: *Riepilogo test da effettuare con estrazione semplice.*

ESTRAZIONE CON ULTRASUONI			
Test	NaDES	Tempo (minuti)	Temperatura (°C)
3	Ment-Lev	5	25
4	Non-Lau	5	25
8	Non-Lau	10	25
11	Ment-Lev	20	25
12	Non-Lau	20	25
15	Ment-Lev	5	40
24	Non-Lau	20	40
27	Ment-Lev	5	50
28	Non-Lau	5	50
31	Ment-Lev	10	50
35	Ment-Lev	20	50
36	Non-Lau	20	50

Tabella 4.6: *Riepilogo test da effettuare con estrazione con ultrasuoni.*

Test effettuati con metodo semplice

Dopo aver preparato il NaDES e averne inseriti 2 g in una falcon da 15 mL, si aggiunge 0,1 g di biomassa *Phaeodactylum tricornutum*. Le falcon sono state avvolte poi con un foglio di alluminio per non far penetrare i raggi UV dannosi per la fucoxantina, e agitate con un vortex per facilitare la dispersione della biomassa nel solvente. Le falcon sono state così inserite in un bagno termico alla temperatura richiesta dall'esperimento e per il tempo di estrazione previsto. In seguito, il campione è stato centrifugato a 5000 rpm per 10 minuti impostando una temperatura di 25 °C. Si ottiene un pellet (biomassa esausta) e il surnatante contenente la FX. Sono stati prelevati 5 mL di surnatante con una pipetta graduata ed è stata effettuata una diluizione 1:50 con etanolo puro.

Test effettuati con gli ultrasuoni

I test che richiedono l'ausilio degli ultrasuoni sono stati eseguiti con un procedimento analogo al metodo di estrazione semplice, ma nel bagno termico è stata inserita una sonda ad ultrasuoni VCX 750, prodotta dalla Sonics Vibra-Cell, impostando ultrasuoni ad intervalli di 5 secondi.

4.3.3. Risultati ottenuti dall'analisi HPLC

Per il calcolo della percentuale di fucoxantina si è seguita la procedura descritta nei paragrafi precedenti e i risultati sono stati riassunti nella seguente tabella.

Condizioni operative	Test	Fx (%)
25°C, 5 min, NaDES1, Semplice	1	0,39
25°C, 5 min, NaDES1, Semplice	1 dupl	0,41
25°C, 5 min, NaDES2, Semplice	2	0,43
25°C, 5 min, NaDES2, Semplice	2 dupl	0,40
25°C, 5 min, NaDES1, Ultrasuoni	3	0,51
25°C, 5 min, NaDES1, Ultrasuoni	3 dupl	0,42
25°C, 5 min, NaDES2, Ultrasuoni	4	0,52
25°C, 5 min, NaDES2, Ultrasuoni	4 dupl	0,47
25°C, 10 min, NaDES1, Semplice	5	0,42
25°C, 10 min, NaDES1, Semplice	5 dupl	0,39
25°C, 10 min, NaDES2, Ultrasuoni	8	0,56
25°C, 10 min, NaDES2, Ultrasuoni	8 dupl	0,48
25°C, 20 min, NaDES1, Semplice	9	0,44
25°C, 20 min, NaDES1, Semplice	9 dupl	0,38
25°C, 20 min, NaDES2, Semplice	10	0,44
25°C, 20 min, NaDES2, Semplice	10 dupl	0,48
25°C, 20 min, NaDES1, Ultrasuoni	11	0,37
25°C, 20 min, NaDES1, Ultrasuoni	11 dupl	0,29
25°C, 20 min, NaDES2, Ultrasuoni	12	0,42

25°C, 20 min, NaDES2, Ultrasuoni	12 dupl	0,42
40°C, 5 min, NaDES1, Ultrasuoni	15	0,31
40°C, 5 min, NaDES1, Ultrasuoni	15 dupl	0,31
40°C, 10 min, NaDES2, Semplice	18	0,48
40°C, 10 min, NaDES2, Semplice	18 dupl	0,47
40°C, 20 min, NaDES1, Semplice	21	0,33
40°C, 20 min, NaDES1, Semplice	21 dupl	0,41
40°C, 20 min, NaDES2, Ultrasuoni	24	0,38
40°C, 20 min, NaDES2, Ultrasuoni	24 dupl	0,35
50°C, 5min, NaDES1, Semplice	25	0,39
50°C, 5min, NaDES1, Semplice	25 dupl	0,34
50°C, 5min, NaDES2, Semplice	26	0,34
50°C, 5min, NaDES2, Semplice	26 dupl	0,31
50°C, 5 min, NaDES1, Ultrasuoni	27	0,24
50°C, 5 min, NaDES1, Ultrasuoni	27 dupl	0,25
50°C, 5 min, NaDES2, Ultrasuoni	28	0,59
50°C, 5 min, NaDES2, Ultrasuoni	28 dupl	0,59
50°C, 10 min, NaDES1, Ultrasuoni	31	0,48
50°C, 10 min, NaDES1, Ultrasuoni	31 dupl	0,53
50°C, 20 min, NaDES1, Semplice	33	0,62
50°C, 20 min, NaDES1, Semplice	33 dupl	0,56
50°C, 20 min, NaDES2, Semplice	34	0,63
50°C, 20 min, NaDES2, Semplice	34 dupl	0,62
50°C, 20 min, NaDES1, Ultrasuoni	35	0,67
50°C, 20 min, NaDES1, Ultrasuoni	35 dupl	0,57
50°C, 20 min, NaDES2, Ultrasuoni	36	0,55
50°C, 20 min, NaDES2, Ultrasuoni	36 dupl	0,57

Tabella 4.7: Risultati della fucoxantina (%) estratta in ogni test.

Col fine di rendere la lettura dei risultati più immediata si riporta un grafico a colonne che mette in evidenza i test che hanno ottenuto una percentuale di fucoxantina maggiore.

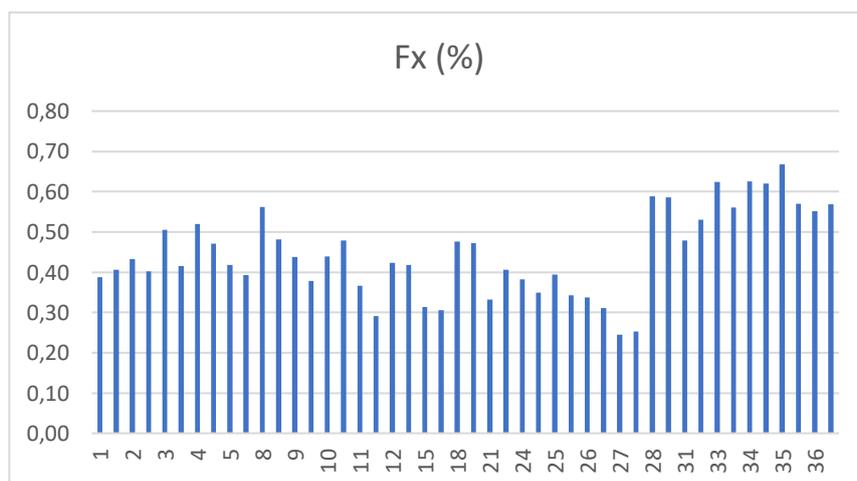


Figura 3.29: Risultati della fucoxantina (%) estratta in ogni test.

4.3.4. Modellazione ed analisi delle superfici di risposta

La Metodologia delle superfici di risposta è stata applicata anche per le estrazioni di fucoxantina con i due NaDESs selezionati ed è stato utilizzato il software CAT per ottenere il modello matematico che descriva le superfici di risposta, in questo caso riferite solamente alla percentuale di fucoxantina estratta, al variare dei diversi fattori. Come si può notare dal grafico dei coefficienti, i fattori con maggiore influenza sono i termini quadratici del tempo e della temperatura, e il termine che rappresenta la loro combinazione, seguiti dai fattori tempo, temperatura e tipologia di solvente e infine il fattore tempo·tecnica.

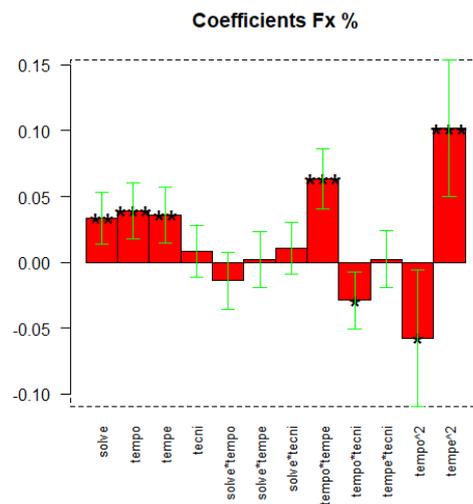
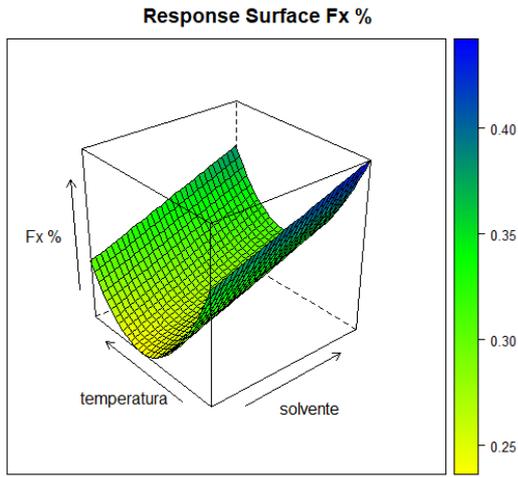


Figura 4.30: Coefficienti fucoxantina (%).

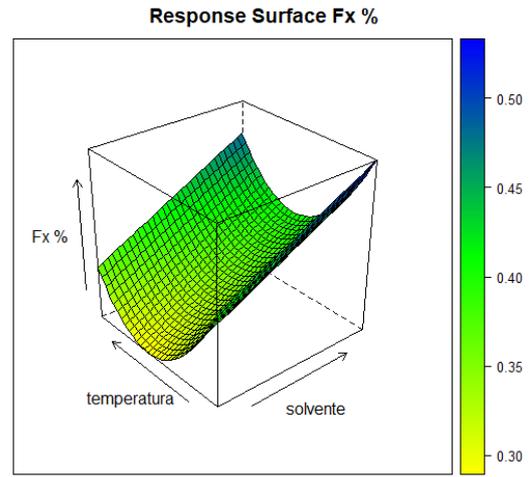
Si analizzano ora le superfici di risposta ottenute dalla combinazione dei fattori tempo, temperatura, solvente e tecnica di estrazione.

- Dal confronto delle superfici di risposta riportate nella pagina successiva, si può notare che per tempistiche uguali, l'andamento delle superfici al variare della temperatura e del solvente non presenta particolari cambiamenti al variare della tecnica di estrazione. Il massimo di fucoxantina si è ottenuto in tutti i casi con il solvente Non-Lau e alla temperatura di 50 °C, ad eccezione dell'estrazione durata 5 minuti che assume il valore massimo a 25°C. Il minimo della fucoxantina si registra per temperature intermedie, con entrambi i solventi.



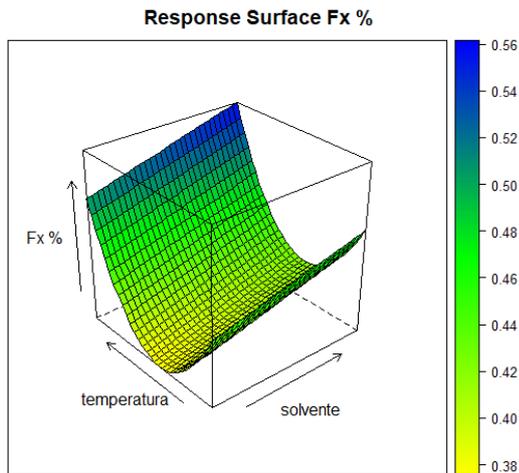
tempo=-1, tecnica=-1

Figura 4.31: Superficie di risposta fucoxantina, Temperatura-Solvente (5 min, semplice).



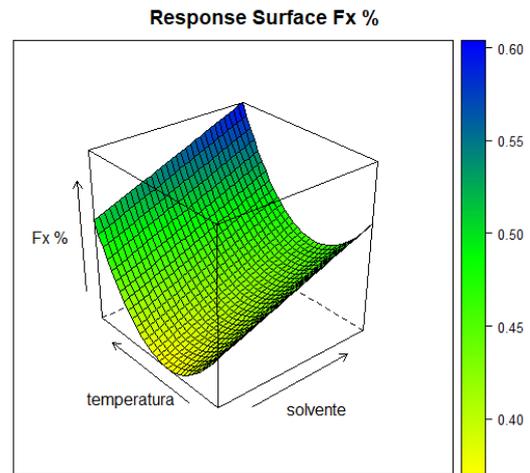
tempo=-1, tecnica=1

Figura 4.32: Superficie di risposta fucoxantina, Temperatura-Solvente (5 min, ultrasuoni).



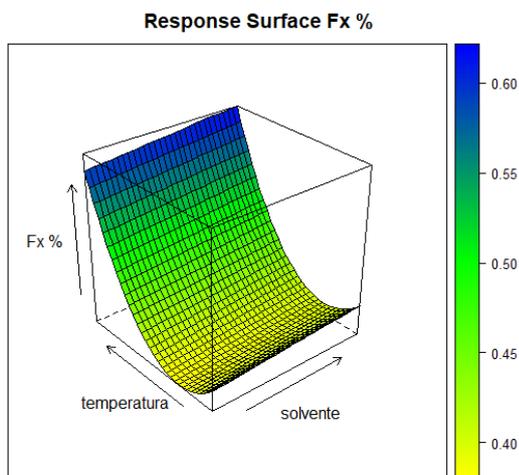
tempo=0, tecnica=-1

Figura 4.33: Superficie di risposta fucoxantina, Temperatura-Solvente (10 min, semplice).



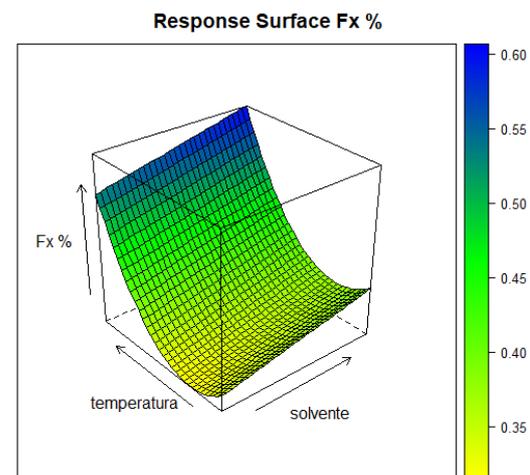
tempo=0, tecnica=1

Figura 4.34: Superficie di risposta fucoxantina, Temperatura-Solvente (10 min, ultrasuoni).



tempo=1, tecnica=-1

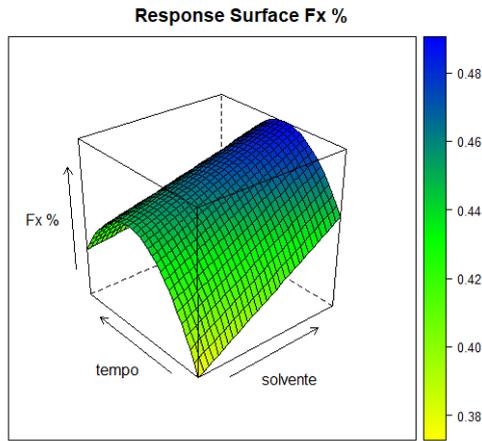
Figura 4.35: Superficie di risposta fucoxantina, Temperatura-Solvente (20 min, semplice).



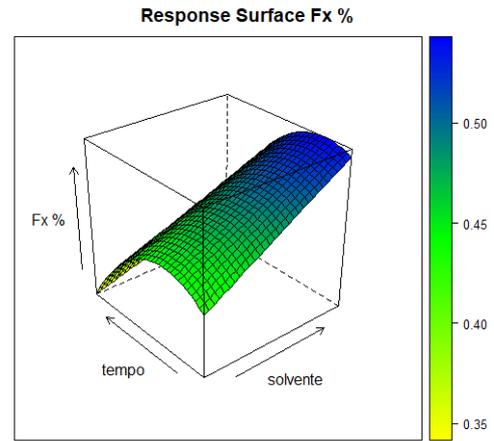
tempo=1, tecnica=1

Figura 4.36: Superficie di risposta fucoxantina, Temperatura-Solvente (20 min, ultrasuoni).

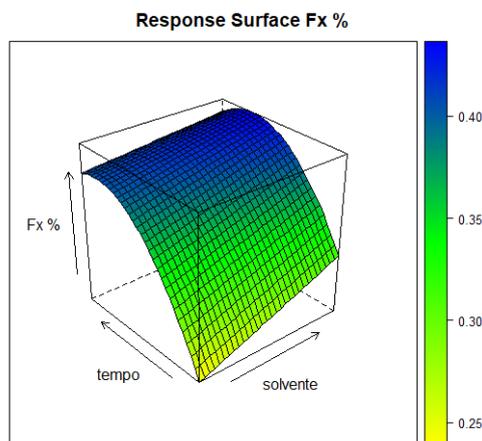
- Si analizzano ora le superfici ottenute a temperatura e tecnica costante. Anche da queste si nota che il solvente migliore per questa estrazione è Non-Lau, il cui effetto positivo è più marcato a tempi più brevi. Il tempo ottimale di estrazione varia da caso a caso, ma in generale l'applicazione degli ultrasuoni riduce il tempo necessario per raggiungere il massimo di fucoxantina.



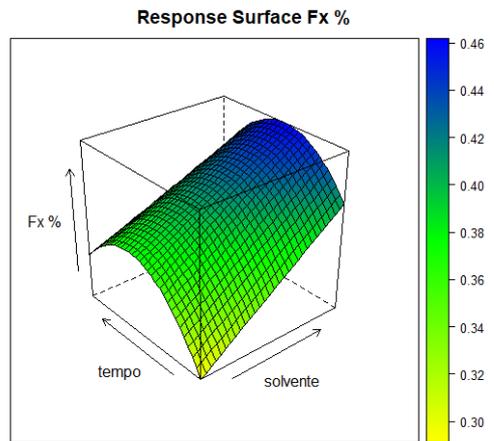
temperatura=-1, tecnica=-1
Figura 4.37: Superficie di risposta fucoxantina, Tempo-Solvente (25°C, semplice).



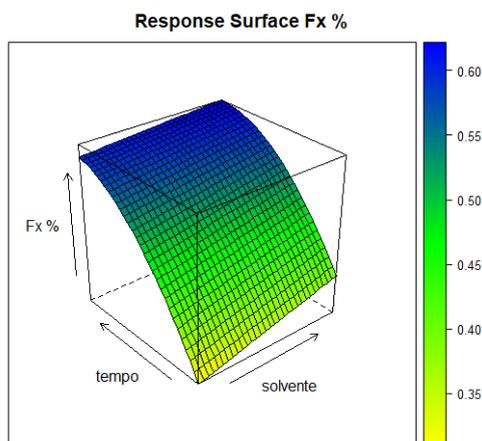
temperatura=-1, tecnica=1
Figura 4.38: Superficie di risposta fucoxantina, Tempo-Solvente (25 °C, ultrasuoni).



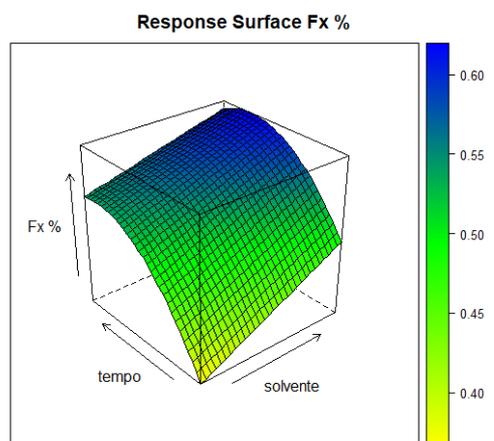
temperatura=0, tecnica=-1
Figura 4.39: Superficie di risposta fucoxantina, Tempo-Solvente (40°C, semplice).



temperatura=0, tecnica=1
Figura 4.40: Superficie di risposta fucoxantina, Tempo-Solvente (40°C, ultrasuoni).



temperatura=1, tecnica=-1
Figura 4.41: Superficie di risposta fucoxantina, Tempo-Solvente (50°C, semplice).



temperatura=1, tecnica=1
Figura 4.42: Superficie di risposta fucoxantina, Tempo-Solvente (50°C, ultrasuoni).

- Dalle seguenti superfici si nota invece che a basse temperature si raggiunge il massimo per un tempo intermedio mentre ad alta temperatura il massimo viene raggiunto a tempi più lunghi. Questo comportamento si rileva con entrambi i solventi testati.

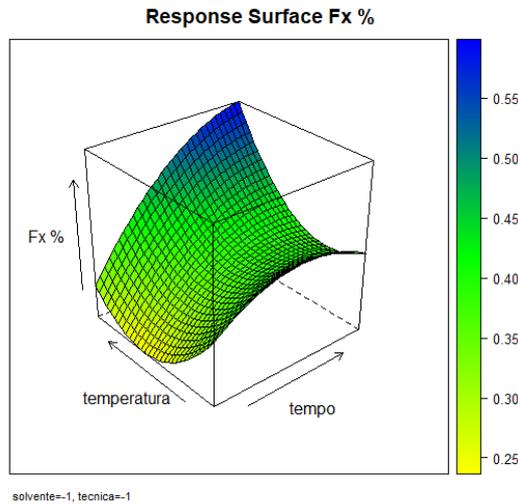


Figura 4.43: Superficie di risposta fucoxantina, Temperatura-Tempo (Ment-Lev, semplice).

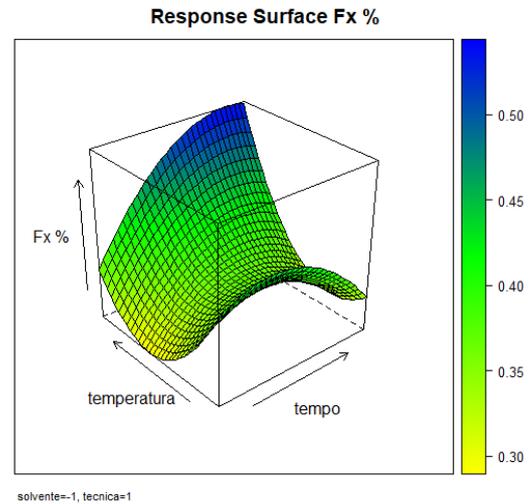


Figura 4.44: Superficie di risposta fucoxantina, Temperatura-Tempo (Ment-Lev, ultrasuoni).

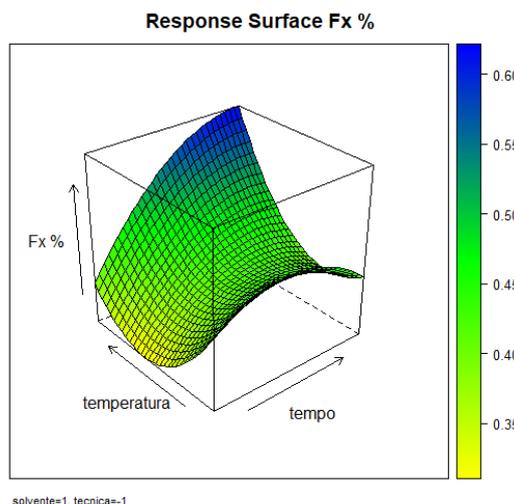


Figura 4.45: Superficie di risposta fucoxantina, Temperatura-Tempo (Non-Lau, semplice).

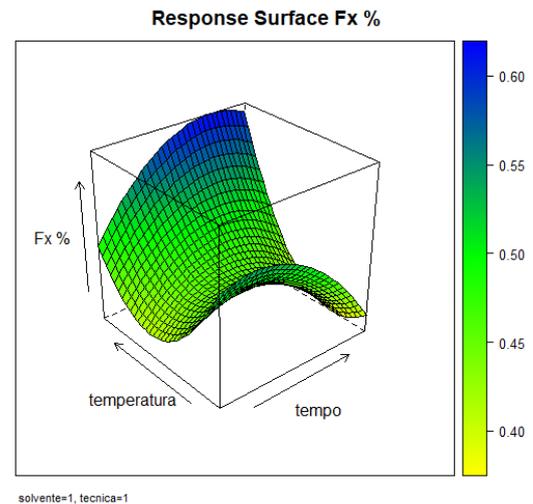


Figura 4.46: Superficie di risposta fucoxantina, Temperatura-Tempo (Non-Lau, ultrasuoni).

Anche in questo caso, l'individuazione delle condizioni operative migliori deve essere effettuata dopo un'analisi economica ed energetica per valutare la modalità migliore che permetta anche di evitare spese superflue e ottimizzare la resa del prodotto desiderato. Nel caso dell'estrazione di fucoxantina con solventi NaDESs, qui studiata, i test che hanno portato alla maggiore concentrazione di prodotto (simile) sono i test 34 e 35. Test 34: 50°C, 20 min, NADES2 (Non-Lau), estrazione semplice. Test 35: 50°C, 20 min, NADES1 (Ment-Lev), ultrasuoni. Di conseguenza, considerazioni economiche andranno fatte circa il costo dei reagenti necessari e anche i costi energetici per mantenere una certa temperatura e eventualmente l'utilizzo degli ultrasuoni, che ovviamente comporterebbe un consumo energetico maggiore.

5. Conclusioni

In questa tesi si è studiato il processo di coltivazione della diatomea *Phaeodactylum tricornutum*, e successivamente l'estrazione dalla biomassa microalgale, di un pigmento ad elevato valore aggiunto, la fucoxantina. I recenti prezzi di mercato per 1 kg di fucoxantina variano da 40.000 a 80.000 dollari USA. La domanda globale della fucoxantina è in rapida crescita grazie all'ampio spettro di applicazioni in campo farmaceutico, alimentare e cosmetico. La fucoxantina è comunemente prodotta dalle macroalghe, ma negli ultimi anni sta crescendo l'interesse per le microalghe, in particolare le diatomee, nelle quali il contenuto di fucoxantina è molto più elevato (1,0-2,5% del peso secco delle cellule) rispetto alle macroalghe (0,01-0,1% del peso secco delle cellule) (Chaitanya Kumar Reddy Pocha et al., 2022).

Lo scopo della tesi consiste nella determinazione delle condizioni di crescita più favorevoli che consentano di ottenere la più elevata velocità di crescita e la maggior produzione di fucoxantina. Dopo aver monitorato la crescita mixotrofica di *P. tricornutum* per 24 giorni e aver effettuato un'estrazione semplice con etanolo per analizzare la biomassa prodotta è emerso che le condizioni migliori per *P. tricornutum* in termini di velocità di crescita e produzione di fucoxantina sono: la temperatura pari a 20°C, il terreno arricchito in nitrati (f/2 NaNO₃ x10) e una concentrazione di glicerolo pari a 0,05 M. La fucoxantina prodotta in questo test è pari a 1,71%; nelle stesse condizioni, ma utilizzando un terreno f/2 si è ottenuto 1,19%. Come ci si aspettava, una temperatura più prossima alla temperatura ottimale di crescita e un terreno ricco di nutrienti, in particolare di nitrati, favoriscono la sintesi della fucoxantina.

Le fasi di estrazione e purificazione sono generalmente quelle a più alto impatto economico, in alcuni casi rappresentano fino al 70% del costo totale dei prodotti biologici. Generalmente queste fasi prevedono l'utilizzo di solventi organici, spesso non sicuri per l'uomo e per l'ambiente, e tecniche estrattive ad elevato costo, come la cromatografia o la distillazione. La necessità di sviluppare processi più competitivi sul piano economico ha incentivato la ricerca di nuovi metodi di estrazione. In un'ottica di sostenibilità e di espansione su larga scala si è deciso di testare una nuova categoria di solventi, i Natural Deep Eutectic Solvents, che presentano elevate rese di estrazione e sono costituiti da componenti naturali già presenti in molte formulazioni cosmetiche. L'utilizzo di questi solventi riduce l'impatto ambientale e consente di limitare i costi della fase di purificazione.

Si sono quindi cercate le condizioni che ottimizzano la resa in fucoxantina, valutando diversi NaDESs e condizioni operative. Per incrementare ulteriormente la resa di estrazione sono stati applicati al processo gli ultrasuoni (Ultrasound-Assisted Extraction UAE). Questo approccio presenta diversi vantaggi: rese maggiori, minor quantità di solventi necessari e minor tempo di estrazione rispetto ai solventi tradizionali. Tra i solventi testati, quelli che hanno dimostrato maggior efficacia estrattiva verso la fucoxantina sono stati Mentolo:Acido levulinico (1:2) e Acido nonanoico:Acido laurico (3:1). È stato sviluppato un DoE per effettuare una serie di estrazioni in diverse condizioni di temperatura (25°C, 40°C, 50°C), tempo (5, 10, 20 minuti) e tecnologia di estrazione (semplice e ultrasuoni). Dall'analisi dei risultati, è stato possibile determinare le condizioni ottimali per ottenere la massima la produttività di fucoxantina. In particolare, è stata utilizzata la Metodologia delle superfici di risposta implementata dal software CAT che elabora un modello matematico che descrive le superfici di risposta della percentuale di fucoxantina estratta, al variare dei fattori.

La determinazione delle condizioni operative ottimali è una fase complessa poiché bisogna considerare l'effetto dei singoli fattori e dell'influenza che hanno l'uno sull'altro. In generale si è notato che l'impiego dell'alta temperatura (50°C) ha permesso il raggiungimento di percentuali di fucoxantina maggiori e che l'applicazione degli ultrasuoni riduce il tempo necessario per raggiungere il massimo di fucoxantina.

Sebbene i risultati ottenuti in questo studio siano promettenti e i prodotti ottenibili dalla biomassa algale siano redditizi, è necessaria ancora ricerca in questo ambito per permetterne l'espansione su larga scala. Sviluppi futuri di questo studio, possono riguardare analisi di fattibilità tecnico-economica per l'estrazione di fucoxantina con NaDESs anche su scala pilota.

Bibliografia e sitografia

A. Di Gianfrancesco, *Technologies for chemical analyses, microstructural and inspection investigations*, (2017), Materials for Ultra-Supercritical and Advanced Ultra-Supercritical Power Plants, DOI: 10.1016/B978-0-08-100552-1.00008-7.

Anuj Kumar, Diwakar Z. Shende, K.L. Wasewar, *Production of levulinic acid: A promising building block material for pharmaceutical and food industry*, (2020), Materials Today: Proceedings, DOI: 10.1016/j.matpr.2020.04.749.

Anuradha Saini, Anil Kumar, Parmjit Singh Panesar, Avinash Thakur, *Potential of deep eutectic solvents in the extraction of value-added compounds from agro-industrial by-products*, (2022), Applied Food Research, DOI: 10.1016/j.afres.2022.100211.

Assaf Vardi, Kimberlee Thamatrakoln, Kay D. Bidl, Paul G. Falkowski, *Diatom genomes come of age*, (2008), Genome Biology, DOI: 10.1186/gb-2008-9-12-245.

Caterina Celi, Debora Fino, Francesco Savorani, *Phaeodactylum tricornutum as a source of value-added products: A review on recent developments in cultivation and extraction technologies*, (2022), Bioresource Technology Reports, DOI 10.1016/j.biteb.2022.101122.

Chaitanya Kumar Reddy Pocha, Wen Yi Chia, Kit Wayne Chew, Heli Siti Halimatul Munawaroh, Pau Loke Show, *Current advances in recovery and biorefinery of fucoxanthin from Phaeodactylum tricornutum*, (2022), Algal Research, DOI: 10.1016/j.algal.2022.102735.

Chantal Bergeron, Danielle Julie, Carrier Shri Ramaswamy, *Biorefinery Co-Products: Phytochemicals, Primary Metabolites and Value-Added Biomass Processing*, (2012), John Wiley & Sons, ISBN: 9780470973578

Christien Enzing, Matthias Ploeg, Maria Barbosa, Lolke Sijtsma, *Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe*, (2014), JRC Scientific and Policy Reports, DOI: 10.2791/3339.

Christopher R. Day, Stephen A. Kempson, *Betaine chemistry, roles, and potential use in liver disease*, (2016), BBA - General Subjects, DOI: 10.1016/j.bbagen.2016.02.001.

Dan Li, *Natural deep eutectic solvents in phytonutrient extraction and other applications*, (2022), Frontiers in Plant Science, DOI: 10.3389/fpls.2022.1004332.

Diego de Freitas Coêlho, Louise Lacalendola Tundisi, Keilla Santos Cerqueira, Jacqueline Rego da Silva Rodrigues, Priscila Gava Mazzola, Elias Basile Tambourgi, Roberto Rodrigues de Souza, *Microalgae: Cultivation Aspects and Bioactive Compounds*, (2019), Brazilian Archives of Biology and Technology, DOI: 10.1590/1678-4324-2019180343.

Dos Santos Fernandes De Araujo Rita, *Brief on algae biomass production*, (2019), Publications Office of the European Union, DOI: 10.2760/402819.

Ekaterina D. Obluchinskaya, Olga N. Pozharitskaya, Lyubov V. Zakharova, Anna V. Daurtseva, Elena V. Flisyuk, Alexander N. Shikov, *Efficacy of Natural Deep Eutectic Solvents for Extraction of Hydrophilic and Lipophilic Compounds from Fucus vesiculosus*, (2021), *Molecules*, DOI: 10.3390/molecules26144198.

European Commission's Knowledge Centre for Bioeconomy, *Algae biomass*, 2019, <https://ec.europa.eu/knowledge4policy/bioeconomy>, ultima consultazione: 31/08/2023.

F. Gabriel Acién Fernández, Alberto Reis, René H. Wijffels, Maria Barbosa, Vitor Verdelho, Bernardo Llamas, *The role of microalgae in the bioeconomy*, (2021), *New BIOTECHNOLOGY*, DOI: 10.1016/j.nbt.2020.11.011.

F.G. Acién, E. Molina, A. Reis, G. Torzillo, G.C. Zittelli, C. Sepúlveda, J. Masojídek, *Photobioreactors for the production of microalgae*, (2017), *Environmental Science and Bio/Technology*, DOI: 10.1016/B978-0-08-101023-5.00001-7.

Fabian M. Dayrit, *Properties of Lauric Acid and Their Significance in Coconut Oil*, (2015), *Journal of the American Oil Chemists' Society*, DOI: 10.1007/s11746-014-2562-7.

Fabio Andres Castillo Martinez, Eduardo Marcos Balciunas, José Manuel Salgado, José Manuel Domínguez González, Attilio Converti and Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira, *Lactic acid properties, applications and production: A review*, (2013), *Food Science & Technology*, DOI: 10.1016/j.tifs.2012.11.007

Faiznur Mohd Fuad, Masrina Mohd Nadzir, Azlina Harun Kamaruddin, *Hydrophilic natural deep eutectic solvent: A review on physicochemical properties and extractability of bioactive compounds*, (2021), *Journal of Molecular Liquids*, DOI: 10.1016/j.molliq.2021.116923.

Farid Chemat, Natacha Rombaut, Anne-Gaëlle Sicaire, Alice Meullemiestre, Anne-Sylvie Fabiano Tixier, Maryline Abert-Vian, *Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review*, (2016), *Ultrasonics Sonochemistry*, DOI: 10.1016/j.ultsonch.2016.06.035.

Forbes, *Fossil Fuels Still Supply 84 Percent Of World Energy And Other Eye Openers From BP's Annual Review*, (2020), <https://www.forbes.com/sites/rpapier/2020/06/20/bp-review-new-highs-in-global-energy-consumption-and-carbon-emissions-in-2019/>, ultima consultazione: 15/09/2023.

GAO Baoyan, CHEN Ailing, ZHANG Wenyan, LI Aifen, and ZHANG Chengwu, *Co-Production of Lipids, Eicosapentaenoic Acid, Fucoxanthin, and Chrysolaminarin by Phaeodactylum tricornutum Cultured in a Flat-Plate Photobioreactor Under Varying Nitrogen Conditions*, (2017), *Oceanic and Coastal Sea Research*, DOI: 10.1007/s11802-017-3174-2.

Gatamaneni Loganathan Bhalamurugan, Orsat Valerie, Lefsrud Mark, *Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: A review*, (2017), *Environmental Engineering Research*, DOI: 10.4491/eer.2017.220.

Gaurav Rajauria, Nissreen Abu-Ghannam, *Isolation and Partial Characterization of Bioactive Fucoxanthin from Himanthalia elongata Brown Seaweed: A TLC-Based Approach*, (2013), *International Journal of Analytical Chemistry*, DOI: 10.1155/2013/802573.

Guangfu Zhao, Fang He, Chenlu Wu, Pan Li, Nengzhang Li, Jinping Deng, Guoqiang Zhu, Wenkai Ren and Yuanyi Peng, *Betaine in inflammation: Mechanistic Aspects and Applications*, (2018), *Frontiers in Immunology*, DOI:10.3389/fimmu.2018.01070.

Guy P.P. Kamatou, Ilze Vermaak, Alvaro M. Viljoen, Brian M. Lawrence, *Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties*, (2013), *Phytochemistry*, DOI: 10.1016/j.phytochem.2013.08.005.

Hong-Wei Yen, I-Chen Hu, Chun-Yen Chen, Shih-Hsin Ho, Duu-Jong Lee, Jo-Shu Chang, *Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products*, (2012), *Bioresource Technology*, DOI: 10.1016/j.biortech.2012.10.099.

Hugo Pereira, Marta Sá, Inês Maia, Alexandre Rodrigues, Iago Teles, Rene H. Wijffels, João Navalho, Maria Barbosa, *Fucoxanthin production from *Tisochrysis lutea* and *Phaeodactylum tricornutum* at industrial scale*, (2021), *Algal Research*, DOI: 10.1016/j.algal.2021.102322.

I. Aberna Ebenezer Selvakumari, J. Jayamuthunagai, Kavitha Senthilkumar, Dr. B. Bharathiraja, *Biofuels Production from Diverse Bioresources: Global Scenario and Future Challenges*, (2020), *Biofuels Production – Sustainability and Advances in Microbial Bioresources*, DOI: 10.1007/978-3-030-53933-7-9.

Industrial Plankton, *Nutrients*, (2023), <https://industrialplankton.com/2023/02/14/algae-growth-nutrients/>, ultima consultazione: 31/08/2023.

ISPRA Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, *Cosa sono le Diatomee*, (2014), <https://www.isprambiente.gov.it/it/banche-dati/banche-dati-folder/acque-interne/atlante-delle-diatomee-bentoniche-dei-corsi-dacqua-italiani/informazioni-general-1/cosa-sono-le-diatomee-1>, ultima consultazione: 31/08/2023.

Izabela Michalak, Katarzyna Chojnacka, *Algae as production systems of bioactive Compounds*, (2014), *Engineering in Life Sciences*, DOI: 10.1002/elsc.201400191.

Kamrul Hasan Chowdury, Nurun Nahar, Ujjwal Kumar Deb, *The Growth Factors Involved in Microalgae Cultivation for Biofuel Production: A Review*, (2020), *Computational Water, Energy, and Environmental Engineering*, DOI: 10.4236/cweee.2020.94012.

Kelly Hudek, Lawrence C. Davis, Jwan Ibbini and Larry Erickson, *Commercial Products from Algae*, (2014), *Algal Biorefineries*, DOI: 10.1007/978-94-007-7494-0_11.

Laura Wils, Charlotte Leman-Loubière, Nicolas Bellin, Barbara Clément-Larosière, Michelle Pinault, Stéphan Chevalier, Cécile Enguehard-Gueiffier, Charles Bodet, Leslie Boudesocque-Delaye, *Natural deep eutectic solvent formulations for spirulina: Preparation, intensification, and skin impact*, (2021), *Algal Research*, DOI: 10.1016/j.algal.2021.102317.

Leila Alipanah, Jens Rohloff, Per Winge, Atle M. Bones and Tore Brembu, *Whole-cell response to nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum**, (2015), *Journal of Experimental Botany*, DOI: 10.1093/jxb/erv340.

M. D. Torres, Stefan Kraan, Herminia Domínguez, *Seaweed biorefinery*, (2019), *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, DOI: 10.1007/s11157-019-09496-y.

Maíra Bueno Ariede, Thalita Marcílio Candido, Ana Lucia Morocho Jacome, Maria Valéria Robles Velasco, João Carlos M. de Carvalho, André Rolim Baby, *Cosmetic attributes of algae - A review*, (2017), Algal Research, DOI: 10.1016/j.algal.2017.05.019.

Małgorzata Płaczek, Agnieszka Patyna, Stanisław Witzak, *Technical evaluation of photobioreactors for microalgae cultivation*, (2017), E3S Web of Conferences, DOI: 10.1051/e3sconf/20171902032.

Manjun Mungali, Navneet Sharma, Gauri, *Caprylic/capric triglyceride*, (2021), Naturally Occurring Chemicals Against Alzheimer's Disease, DOI: 10.1016/B978-0-12-819212-2.00011-6.

Munna Bhattacharya, Saswata Goswami, *Microalgae – A green multi - product biorefinery for future industrial prospects*, (2020), Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101580.

National Center for Biotechnology Information, PubChem, (2023), <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, ultima consultazione: 03/09/2023.

Nur Izyan Wan Azelee, Aizi Nor Mazila Ramli, Nor Hasmaliana Abdul Manas, Nurrulhidayah Salamun, Rohaida Che Man, Hesham El Enshasy, *Glycerol In Food, Cosmetics And Pharmaceutical Industries: Basics And New Applications*, (2019), INTERNATIONAL JOURNAL OF SCIENTIFIC & TECHNOLOGY RESEARCH, ISSN 2277-8616.

Oscar Serrano, Jeffrey J. Kelleway, Catherine Lovelock, Paul S. Lavery, *Conservation of Blue Carbon Ecosystems for Climate Change Mitigation and Adaptation*, (2019), Coastal Wetlands Second Edition: An integrated Ecosystem Approach, DOI: 10.1016/B978-0-444-63893-9.00028-9.

Richard G. Maroun, Hiba N. Rajha, Eugene Vorobiev, Nicolas Louka, *Emerging Technologies for the Recovery of Valuable Compounds From Grape Processing By-Products*, (2017), Handbook of Grape Processing By-Products, DOI:10.1016/b978-0-12-809870-7.00007-7.

Rita Araújo, Fatima Vázquez Calderón, Javier Sánchez López, Isabel Costa Azevedo, Annette Bruhn, Silvia Fluch, Manuel Garcia Tasende, Fatemeh Ghaderiardakani, Tanel Ilmjärv, Martial Laurans, Micheal Mac Monagail, Silvio Mangini, César Peteiro, Céline Rebours, Tryggvi Stefansson and Jörg Ullmann, *Current Status of the Algae Production Industry in Europe: An Emerging Sector of the Blue Bioeconomy*, (2021), Frontiers in Marine Science, DOI: 10.3389/fmars.2020.626389.

Runqing Yang, Dong Wei, Jun Xie, *Diatoms as cell factories for high-value products: chrysolaminarin, eicosapentaenoic acid, and fucoxanthin*, (2020), Critical Reviews in Biotechnology, DOI: 10.1080/07388551.2020.1805402.

S.N. Naik, Vaibhav V. Goud, Prasant K. Rout, Ajay K. Dalai, *Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review*, (2010), Renewable and Sustainable Energy Reviews, DOI: 10.1016/j.rser.2009.10.003.

Sanjeet Mehariya, Francesca Fratini, Roberto Lavecchia, Antonio Zuorro, *Green extraction of value-added compounds from microalgae: A short review on natural deep eutectic solvents (NaDES) and related pre-treatments*, (2021), Journal of Environmental Chemical Engineering, DOI: 10.1016/j.jece.2021.105989.

Su Chern Foo, Kuan Shiong Khoo, Chien Wei Ooi, Pau Loke Show, Nicholas M. H. Khong, Fatimah Md. Yusoff, *Meeting Sustainable Development Goals: Alternative Extraction Processes for Fucoxanthin in Algae*, (2021), DOI: 10.3389/fbioe.2020.546067.

Thomas Butler, Rahul Vijay Kapoore, Seetharaman Vaidyanathan, *Phaeodactylum tricornutum: A Diatom Cell Factory*, (2020), Trends in Biotechnology, DOI: 10.1016/j.tibtech.2019.12.023.

UCL-London's Global University, *Diatoms*, <https://www.ucl.ac.uk/GeolSci/micropal/diatom.html>, ultima consultazione: 06/09/2023.

Valeria Villanova, Antonio Emidio Fortunato, Dipali Singh, Davide Dal Bo, Melissa Conte, Toshihiro Obata, Juliette Jouhet, Alisdair R. Fernie, Eric Marechal, Angela Falciatore, Julien Pagliardini, Adeline Le Monnier, Mark Poolman, Gilles Curien, Dimitris Petroustos and Giovanni Finazzi, *Investigating mixotrophic metabolism in the model diatom Phaeodactylum tricornutum*, (2017), Philosophical Transactions of the Royal Society, DOI: 10.1098/rstb.2016.0404.

Vincenzo Michele Sellitto, *Microalghe (e cianobatteri). I microrganismi fotosintetici in agricoltura*, (2021), Edagricole Calderini, ISBN: 978-8850656141.

Wei Ding, Ying Ye, Lihua Yu, Meijing Liu, Jin Liu, *Physiochemical and molecular responses of the diatom Phaeodactylum tricornutum to illumination transitions*, (2023), Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, DOI: 10.1186/s13068-023-02352-w.

Wilbur Johnson Jr, Heldreth, Bart Bergfeld, Wilma F. Bergfeld, Donald V. Belsito, Curtis D. Klaassen, Ronald Hill, Daniel Liebler, James G. Marks, Ronald C. Shanks, Thomas J. Slaga, Paul W. Snyder, F. Alan Andersen, *Final Report of the Cosmetic Ingredient Review Expert Panel on the Safety Assessment of Pelargonic Acid (Nonanoic Acid) and Nonanoate Esters*, (2011), International Journal of Toxicology, DOI: 10.1177/1091581811428980.

