

DUNALIELLA SALINA

“L’acqua è la forza che ti tempera,
nell’acqua ti ritrovi e ti rinnovi:
noi ti pensiamo come un’alga (...)

come un’equorea creatura
che la salsedine non intacca
ma torna al lito più pura.”
(Eugenio Montale)

Il termine alga deriva dal vocabolo latino “algă, algae” ed indica un vastissimo insieme di organismi, afferenti al dominio *Eukaryota*, che si organizzano in “talli”, ovvero corpi vegetativi indifferenziati; peculiarità che vale loro la definizione di tallofite. La parete cellulare algale, inoltre, è priva di lignina. Questa caratteristica non costituisce affatto un limite alla loro complessità, sia strutturale che metabolica...infatti le microalghe sono considerate “biofabbriche verdi”: minuscole cellule galleggianti, dalle forme più disparate, protagoniste della sintesi di tantissime molecole, quali idrocarburi, trigliceridi, peptidi, vitamine. Le 50.000 specie, afferenti al loro raggruppamento, vantano una efficienza fotosintetica maggiore di quella delle piante terrestri superiori.

Dunaliella è un genere d'alga verde unicellulare e cosmopolita, appartenente alla famiglia delle *Polyblepharidaceae*, protagonista indiscussa degli ambienti ipersalini. Quest'alga detiene numerosi primati: è considerata l'eucariote fotosintetico più allotollerante [1] ed è genere di punta della ricerca scientifica, grazie alla sua capacità metabolica di sintetizzare β -carotene e altri composti bioattivi [2] che la rendono idonea alla produzione industriale green.

Era il 1838, quando Michel Felix Dunal [3], la osservò per la prima volta, in una salina francese. Ma fu Teodoresco [4] a darle un nome e una prima classificazione tassonomica, nel 1905. Il dibattito tassonomico su D. è ancora oggi aperto, per via delle numerose specie appartenenti (in modo presunto o effettivo) al genere, e per via della complessità del suo ciclo vitale e capacità metabolica molto plastica, estremamente variabili in ambiente. Oggi, le assegnazioni filogenetiche non si basano più solo sull'osservazione morfologica, ma si ricorre alla trascrittomico: in particolare, Gonzalez, Olmos et al., hanno utilizzato l'rRNA e i geni ITS e S18, insieme a vari frammenti di restrizione, per delineare un quadro tassonomico che, a distanza di anni, non è stato ultimato [5] [6]. Attualmente, si contano 28 specie di Dunaliella, di cui, ben

23 sono saline o ipersaline [7] [8].

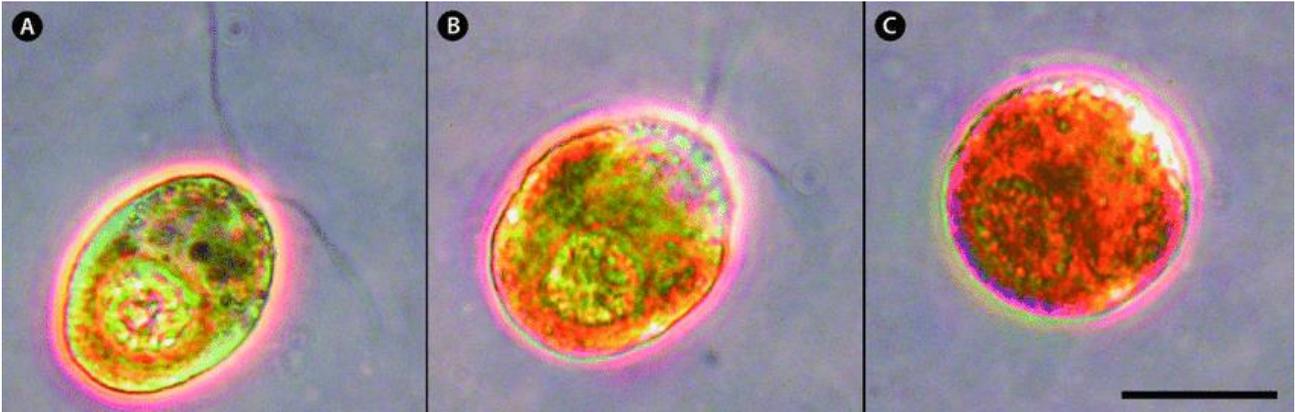


Figura 1 Cellule di *Dunaliella Salina* in diverse condizioni di coltura. (A) Cellula verde non stressata. (B) Cellula stressata che vira verso arancione. (C) Foto presa da: Ramos, Ana A., et al. "The unicellular green alga *Dunaliella salina* Teod. as a model for abiotic stress tolerance: genetic advances and future perspectives." *Algae* 26.1 (2011): 3-20.

Senza, però, perdersi in tecnicismi genetici, vediamo perché quest'alga è così famosa ed oggetto di interesse per molteplici filoni di ricerca.

“L'organisme qui colore en rouge les marais salants et à qui nous pouvons conserver le nom de *Dunaliella salina*” scriveva Labbè, nel 1921 [9]...ebbene, è proprio questo il carattere distintivo dell'alga: la sua capacità di produrre beta carotene e dunque, di far assumere alle acque in cui vive una colorazione rossastra-rosata molto suggestiva, tant'è che nella letteratura più datata, il pigmento veniva chiamato “ematocromo” per la sua somiglianza al sangue. È bene precisare che ciò accade in determinate condizioni fisiologiche di stress, e che non tutte le specie sono in grado di farlo! I ceppi più produttivi di *Dunaliella* riescono ad accumulare il pigmento, oltre il 10% del loro peso secco. Non è difficile immaginare quanto quest'alga sia preziosa, infatti vanta l'esser stata una delle prime, il cui potenziale biotecnologico sia stato compreso e sfruttato. Il primissimo impianto colturale risale al 1966, negli URSS [10], ma oggi ne esistono numerosissimi e di grande importanza commerciale. Le tecniche più utilizzate sono attualmente due: coltivazione intensiva in fotobioreattore, ad alta densità cellulare e in ambiente controllato, e coltivazione estensiva lagunare, a bassa tecnologia, dette “open ponds”.



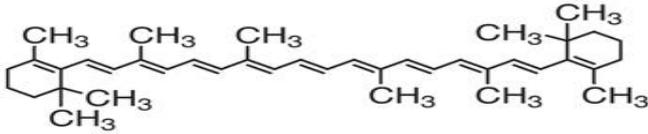
Impianto pilota costiero di *D.*, situato all'interno del sito di produzione della NBT (Ltd) a Eilat, Israele. Piste allineate 150 m di lunghezza x 4 di 5 m di larghezza, acqua salata profonda 20 cm. Ceppo locale, *Dunaliella Bardawil*. Foto presa da: Harvey, Patricia J., and Ami Ben-Amotz.

"Towards a sustainable *Dunaliella salina* microalgal biorefinery for 9-cis β -carotene production." Algal Research 50 (2020): 102002.

Per produrre una quantità economicamente interessante del pigmento, però, *Dunaliella* ha bisogno di condizioni fisiologiche che variano da ceppo a ceppo, ma che hanno in comune la scarsa disponibilità di nutrienti (su tutti: azoto e fosforo, elementi limitanti per la crescita della cellula vegetale) e la necessità di irraggiamento solare intenso. Inoltre, è noto che alte concentrazioni di magnesio e calcio hanno funzione inibente sulla crescita cellulare [11]. Ma come fa questa piccola alga a sopravvivere in salinità che vanno al 2 al 15%, considerando che è anche sprovvista di parete cellulare, e dunque estremamente esposta ai cambiamenti osmotici, e possiede una bassa concentrazione ionica intracellulare? Ebbene, la risposta all'enigma è...il glicerolo! *Dunaliella*, oltre al beta carotene, infatti, produce e aumenta il contenuto di glicerolo, in risposta ad alti livelli di stress da salinità [20], durante i quali, incrementa l'assimilazione fotosintetica di CO₂, e devia quel carbonio per la sintesi del glicerolo [21]. In *D. tertiolecta*, è stata identificata un'isoforma enzimatica che catalizza la sintesi massiva del glicerolo ad un'aumentata salinità [22]. Il glicerolo è estremamente affine alle membrane cellulari, ma non per la nostra alga: la membrana di *Dunaliella* ha una scarsissima affinità per questa molecola, e questo le permette di accumularlo, senza che fuoriesca, nell'ambiente intracellulare, e di sfruttarlo come regolatore osmotico. Anche nella produzione del glicerolo, la piccola alga rossa è eccezionale: sono stati sviluppati numerosi progetti sperimentali che la vedono protagonista della produzione di questa molecola, assieme al carotene, ma nessuno di questi è oggi in fase di applicazione, purtroppo a causa dei costi elevati. [12] [13].

Quali sono gli utilizzi concreti di *Dunaliella*? A cosa può servire una creatura così piccola e peculiare? I suoi utilizzi sono svariati, e spaziano dalla **nutraceutica** (le alghe hanno altissimo potere nutrizionale...l'OMS le ha definite "one of the greatest superfoods on earth"), alla **farmaceutica** e **cosmetica**; **bioenergetica** e come **biorimedio** per acque e suoli, senza dimenticare la loro **capacità di assorbire CO₂** grazie alla fotosintesi.

Attualmente *Dunaliella* è utilizzata per la produzione di **β -carotene**, una provitamina terpenica, commercializzata come integratore alimentare e colorante. I carotenoidi sono isoprenoidi coniugati, sintetizzati da tutti gli organismi fotosintetici per la fotoprotezione: sono fondamentali per la via della **vitamina A** e necessari nella dieta umana per produrre retinoidi [32], a loro volta coinvolti in **differenziazione, crescita cellulare e apoptosi** [33]. Influenzano la vista, proteggono dallo **stress ossidativo** [34], oltre ad agire come filtri per la **fotoprotezione di occhi e pelle**. Secondo alcune stime, il mercato dei carotenoidi naturali, sintetizzati da alghe -su tutte, *Dunaliella*- crescerà fino a 2,0 miliardi di dollari entro il 2026, anche grazie alle innovative tecniche di estrazione [35].



Per quanto concerne la produzione farmaceutica e la ricerca medica, il genere *Dunaliella* rientra nel raggruppamento delle:

- **Microalghe con attività antinfiammatoria** [14]: Lavy et al. 2003 [14], hanno scoperto che la polvere di *D. bardawil* essiccata è efficiente contro l'infiammazione dell'intestino tenue, indotta da acido acetico nei ratti, mentre Caroprese et al. [15] hanno mostrato che una miscela di fitosteroli da *D. tertiolecta* ha ridotto la produzione di citochine (segnali di comunicazione fra le cellule del sistema immunitario e fra queste e diversi organi e tessuti) in cellule di pecora.
- **Microalghe con attività immunomodulatoria e antitumorale per uomo e altre specie testate**: l'integrazione alimentare di preparati disponibili in commercio di *D. salina* nei topi ha migliorato e potenziato la citotossicità delle cellule natural killer NK, aumentato la fagocitosi dei macrofagi, nonché il tasso di sopravvivenza dei topi leucemici, riducendo l'ingrandimento della milza [16].
- **Microalghe in grado di combattere e attenuare patologie croniche**: La steatosi epatica è il tipo più comune di malattia epatica cronica, correlata all'età. I ratti affetti da questa patologia, sono stati trattati con zeaxantina e con la frazione carotenoide: *D. salina* ha ridotto il contenuto lipidico epatico, le citochine infiammatorie e ha mostrato proprietà antiapoptotiche...è stato possibile concludere che i carotenoidi di *D. salina* abbiano effetto benefico sulla patologia. [17]
- **Microalghe in grado di combattere e attenuare patologie acute o cronicizzabili**: L'encefalopatia epatica (HE) è una malattia neuropsichiatrica che si sviluppa come complicanza dell'insufficienza epatica. Nello studio, condotto sui ratti affetti, *D. salina* ha migliorato la funzione epatica e ridotto lo stress ossidativo, migliorando le alterazioni istopatologiche del cervello, esercitando potere terapeutico contro l'HE, attraverso i suoi effetti antiossidanti, antinfiammatori e citoprotettivi. [18]
- **Microalghe in grado di combattere e attenuare patologie cardiache**: la ricerca è stata condotta su ratti con ipertensione, infarto miocardico e disfunzione cardiaca. La zeaxantina eneicosilata, isolata da *D. salina*, ha migliorato la disfunzione cardiaca associata all'età nei ratti, attraverso l'attivazione dei recettori dei retinoidi, dimostrandosi efficace contro l'invecchiamento cardiaco. [19]

Inoltre, *Dunaliella*, può essere utilizzata nella realizzazione di **co-coltivazioni** algali, a più specie, al fine di **produrre biocarburante**, mediante la **conversione termochimica della biomassa**. In un sistema di co-coltivazione, il rapporto tra i diversi microrganismi è sinergico, e la produttività complessiva di biomassa, può migliorare [30], insieme all'aumento del contenuto lipidico totale. Il modello migliore di co-coltivazione coinvolge proprio le microalghe saline, poichè garantisce anche il miglior utilizzo di nutrienti disponibili. La coltivazione dovrebbe iniziare a un livello di salinità pari a quello dell'acqua di mare (specie marine) e continuare fino alla saturazione (allotolleranti e alofile): in questo modo, invece di scartare i terreni di crescita più salini, le specie di microalghe cambierebbero in base ai loro livelli di tolleranza alla salinità [31]. Tuttavia, a causa dell'elevato contenuto di acqua presente nelle cellule, non è possibile effettuare combustione diretta (adoperabile con matrici con umidità inferiore al 50%) ma sono applicabili tre differenti tecniche: gassificazione, liquifazione termochimica e pirolisi. [23]

- La **gassificazione della biomassa** consente la conversione in combustibile gassoso, valido per apparecchiature convenzionali (ad es. caldaie, motori e turbine) o in apparecchiature avanzate (ad es. celle a combustibile) per la generazione di calore ed elettricità. [24] Il syngas generato dalla gassificazione contiene una miscela di CO, H₂, CO₂, N₂ e CH₄ [25];
- La **pirolisi** è un altro processo di conversione termochimica, in grado di produrre composti energetici liquidi (bio-olio), solidi (carbone) e gassosi (syngas) [26]. I bio-oli da microalghe sono qualitativamente più elevati, rispetto a quelli derivati da biomasse ligno-cellulosiche [27], ma la produzione è difficoltosa e costosa, a causa dell'alto contenuto di acqua: è possibile risolvere il problema con un aumento di temperature, ma questo comporta una spesa maggiore;
- La **liquefazione termochimica (HTL)**, attualmente la tecnica più vocata, può convertire la biomassa algale umida in bio-olio [28]. Alcune specie di microalghe, tra cui *Dunaliella*, sono già state trattate con questa tecnica e con eccellenti risultati, ma i reattori hanno ancora costi elevati.

Queste tecnologie, sebbene costose, comportano diversi vantaggi socio-economici: nessuna competizione con altre risorse alimentari; utilizzo virtuoso di aree desertiche o estreme; fonte di guadagno per paesi in via di sviluppo ma significativamente irraggiati dal sole; possibilità di utilizzarle in coordinazione con altri trattamenti (depurazione acque e recupero di terreni contaminati). Le alghe, tra cui anche *Dunaliella*, rispondono molto bene all'ingegnerizzazione genetica, e vi è possibilità di regolare l'espressione genica, modulando le condizioni ambientali e lo stress. Non bisogna trascurare che la disponibilità di acqua dolce va diminuendo! L'uso di acqua salata per coltivare microalghe rappresenta una soluzione ideale per la produzione di biocarburante, sia perché riduce la pressione esercitata sul consumo di acqua dolce, sia perché abbatte anche i costi di produzione; rendendo così il biocarburante economicamente sostenibile. [29] In ottica meno antropocentrica e mirata al guadagno, queste incredibili cellule sono uno strumento di conservazione e valorizzazione di numerosi habitat, uno sprone per la ricerca di strategie che non rendano la pressione

antropica dannosa e asfittica, ma, anzi, che tutelino e coordinino l'impatto umano alle innate capacità di rigenerazione e risanamento dell'ambiente.



Figura 2 Vista aerea delle Saline di Margherita di Savoia. L'immagine è proprietà di margheritadisavoia.com.

Riferimenti

[1]= Richmond, Amos, ed. Manuale di coltura microalgale: biotecnologie e psicologia applicata . Vol. 577. Oxford: Blackwell Science, 2004.

[2]= Avron, M. "BE-AmOTz (1992): Dunaliella: Physiology, biochemistry and biotechnology." Boca Ratón, Florida, EEUU.

[3] = Dunal F: Extrait d'un mémoire sur les algues qui colorent en rouge some eaux des marais salants méditerranéens (1838)

[4]= Teodoresco EC: Organization et développement du Dunaliella , nouveau genre de Volvocacée-Polyblepharidée. Beih z Bot Centralbl (1905)

- [5]= González MA, Coleman AW, Gómez PI, Montoya R: relazione filogenetica tra vari ceppi di *Dunaliella* (Chlorophyceae) basata su sequenze nucleari di ITS rDNA. *J Phycol* (2001)
- [6]= Olmos J, Paniagua J, Contreras R: Identificazione molecolare di *Dunaliella* sp. utilizzando il gene 18S rDNA. *Lett Appl Microbiol* (2000)
- [7]= Oren, Aharon. "Cento anni di ricerca *Dunaliella*: 1905-2005." *Sistemi salini* 1.1 (2005): 1-14.
- [8]= Borowitzka, Michael A. e Christopher J. Siva. "La tassonomia del genere *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) con enfasi sulle specie marine e alofile". *Journal of Applied Phycology* 19.5 (2007): 567-590.
- [9]= Labbé, A. "Sur les modifications adaptives de *Dunaliella* salina Dunal." *CR Acad Sci* 172 (1921): 1074-1076.
- [10]= Massyuk, N. P. "Mass culture of the carotene bearing alga *Dunaliella* salina." *Ukr Bot Zh* 23 (1968): 12-19.
- [11]= Baas-Becking, LGM "Effetti salini su sciame di *Dunaliella viridis* Teod." *Il giornale di fisiologia generale* 14.6 (1931): 765.
- [12]= Chen, Bill J. e CH Chi. "Sviluppo e valutazione del processo per la produzione di glicerolo algale". *Biotechnologie e bioingegneria* 23.6 (1981): 1267-1287.
- [13]= Borowitzka, LJ, TP Moulton e MA Borowitzka. "La coltura di massa di *Dunaliella* salina per la chimica fine: da laboratorio a impianto pilota". *Undicesimo simposio internazionale sulle alghe*. Springer, Dordrecht, 1984.
- [14]= Lavy, A.; Naveh, Y.; Coleman, R.; Mokady, S.; Werman, MJ Dietary *Dunaliella* bardawil, un'alga ricca di beta-carotene, protegge dall'infiammazione dell'intestino tenue indotta dall'acido acetico nei ratti. *Infiammazione Dis. intestinale* 2003 , 9 , 372-379.
- [15]= Caroprese, Mariangela, et al. "A mixture of phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* affects proliferation of peripheral blood mononuclear cells and cytokine production in sheep." *Veterinary immunology and immunopathology* 150.1-2 (2012): 27-35.
- [16]= Chuang, Wen-Chen, et al. "*Dunaliella* salina mostra un'immunità antileucemica in un modello murino di cellule leucemiche WEHI-3". *Giornale di chimica agraria e alimentare* 62,47 (2014): 11479-11487.
- [17]= El-Baz, Farouk K., et al. "Attenuation of age-related hepatic Steatosis by *Dunaliella* salina microalgae in senescence rats through the regulation of redox status, inflammatory indices, and apoptotic biomarkers." *Advances in pharmacological and pharmaceutical sciences* 2020 (2020).
- [18]= El-Baz, Farouk K., Rania Elgohary e Abeer Salama. "Miglioramento dell'encefalopatia epatica utilizzando le microalghe *Dunaliella* salina nei ratti:

modulazione dell'iperammoniemia/TLR4". *BioMed Research International* 2021 (2021).

[19]= El-Baz, Farouk Kamel, et al. "La zeaxantina isolata dalle microalghe *Dunaliella salina* migliora la disfunzione cardiaca associata all'età nei ratti attraverso la stimolazione dei recettori dei retinoidi". *Droghe marine* 17.5 (2019): 290.

[20]= Csonka, LN "Osmoregolazione". *Escherichia coli e Salmonella typhimurium: biologia cellulare e molecolare*. 2 (1992): 1543-1554.

[21]= Katz, Adriana, Yokov Paz e Uri Pick. "Tolleranza alla salinità e meccanismi di resistenza alla deprivazione di ferro rivelati dalle analisi proteomiche in *Dunaliella Salina*". *L'Alga Dunaliella* (2009): 341-358.

[22]= Gee, Robert, et al. "Due isoforme di diidrossiacetone fosfato riduttasi dai cloroplasti di *Dunaliella tertiolecta*". *Fisiologia vegetale* 103.1 (1993): 243-249.

[23]= Tsukahara, Kenichiro e Shigeki Sawayama. "Produzione di combustibile liquido utilizzando microalghe". *Journal of the Japan Petroleum Institute* 48.5 (2005): 251-259.

[24]= 26th European Symposium on Computer Aided Process Engineering, Volume 38 1st Edition

[25]= Demirbaş, Ayhan. "Impianti per le risorse di biomassa e trasformazione della biomassa per combustibili e prodotti chimici". *Conversione e gestione dell'energia* 42.11 (2001): 1357-1378.

[26]= Demirbas, Ayhan. "Le attuali tecnologie per la termo-conversione delle biomasse in combustibili e prodotti chimici". *Fonti energetiche* 26,8 (2004): 715-730.

[27]= Miao, Xiaoling, Qingyu Wu e Changyan Yang. "Pirolisi veloce di microalghe per produrre combustibili rinnovabili". *Giornale di pirolisi analitica e applicata* 71.2 (2004): 855-863.

[28]= Clark, James H. e Fabien Deswarte, eds. *Introduzione ai prodotti chimici da biomasse*. John Wiley & Figli, 2014.

[29]= Brennan, Liam e Philip Owende. "Biocarburanti da microalghe: una rassegna delle tecnologie per la produzione, la lavorazione e l'estrazione di biocarburanti e coprodotti". *Analisi delle energie rinnovabili e sostenibili* 14.2 (2010): 557-577.

[30]= Angell, Scott, et al. "Piocianina isolata da una popolazione microbica marina: produzione sinergica tra due specie batteriche distinte e modalità d'azione". *Chimica e biologia* 13.12 (2006): 1349-1359.

[31]= Ishika, Tasneema, Navid R. Moheimani e Parisa A. Bahri. "Co-coltivazione sostenibile di microalghe saline per la produzione di biocarburanti: una revisione critica". *Revisioni sulle energie rinnovabili e sostenibili* 78 (2017): 356-368.

[32]= Harvey, Patricia J., e Ami Ben-Amotz. "Verso una bioraffineria microalgale *Dunaliella salina* sostenibile per la produzione di 9-cis β -carotene". *Algal Research* 50 (2020): 102002.

[33]= Rodriguez-Concepcion, M., Avalos, J., Bonet, M. L., Boronat, A., Gomez-Gomez, L., Hornero-Mendez, D., ... & Zhu, C. (2018). Una prospettiva globale sui carotenoidi: metabolismo, biotecnologia e benefici per l'alimentazione e la salute. *Progressi nella ricerca lipidica*, 70, 62-93.

[34]= Hartong, Dyonne T., Eliot L. Berson e Thaddeus P. Dryja. "Retinite pigmentosa." *The Lancet* 368.9549 (2006): 1795-1809.

[35]= Novoveská, L., Ross, M. E., Stanley, M. S., Pradelles, R., Wasiolek, V., & Sassi, J. F. (2019). Carotenoidi microalgali: Una revisione della produzione, mercati attuali, regolamenti, e direzione futura. *Droga marina*, 17(11), 640.