



Università degli Studi di Verona  
Dipartimento di Biotecnologie

---

**RELAZIONE SCIENTIFICA FINALE**

Selezione di ceppi mutanti dell'alga unicellulare *Chlorella vulgaris* con un'aumentata efficienza nell'uso della luce

**AdR1770/11**

<i>Nome e Cognome del Beneficiario</i>	Stefano Cazzaniga
<i>Titolo del Programma di Ricerca</i>	Selezione di ceppi mutanti dell'alga unicellulare <i>Chlorella vulgaris</i> con un'aumentata efficienza nell'uso della luce
<i>Settore Scientifico Disciplinare di riferimento</i>	BIO/04
<i>Nome e Cognome del Responsabile Scientifico</i>	Roberto Bassi
<i>Durata dell'Assegno di Ricerca</i>	Da 01/01/2012 a 31/12/2012
<i>Periodo di riferimento della relazione</i>	Da 01/01/2012 a 31/05/2012
<i>Note</i>	Assegno interrotto al 31/05/2012



## Università degli Studi di Verona Dipartimento di Biotecnologie

### **DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ DI RICERCA** (*presupposti/obiettivi, metodologie applicate, risultati intermedi e conclusivi, discussione*)

Il continuo consumo dei depositi di petrolio e gas naturali e lo sviluppo delle nuove economie emergenti hanno portato in questo ultimo decennio ad un aumento dell'inquinamento a livello globale e ad un costante incremento dei prezzi di energia e carburanti. Questi fattori spingono ad ottimizzare nuove forme di bioenergie rinnovabili. Tra le varie specie vegetali utilizzabili le alghe ed in particolare microalghe unicellulari sono estremamente interessanti perché:

- I carburanti da alghe sono carbonio-neutri; l'anidride carbonica prodotta al momento della combustione è la stessa che è stata precedentemente organicata nella fotosintesi, con un rilascio netto nell'atmosfera uguale a zero.
- Crescono molto velocemente e non sono limitate ad 1-2 raccolti l'anno come le piante terrestri.
- Possono produrre da 10 a 100 volte più massa delle piante terrestri in un anno.
- Producono molti più lipidi, proteine e carboidrati per biomassa delle piante.
- Si adattano a crescere in un ampio gradiente di temperatura pH salinità e intensità luminosa, non richiedono terra pregiata e non competono quindi con le colture alimentari.
- Sono facili da crescere non richiedono fertilizzanti e macchinari.
- Non contengono lignina e sono più facili da trattare.
- Bruciare biodiesel produce meno monossido di carbonio, zolfo e composti aromatici comportando meno problemi per l'ambiente.
- Il biodiesel è meno volatile e quindi più sicuro da maneggiare.
- Ha un numero di cetani più alto dei carburanti da petrolio, ha quindi un tempo più breve tra compressione e ignizione e una combustione in percentuale maggiore.

Tra le possibili specie di microalghe, abbiamo deciso di concentrare il nostro lavoro su *Chlorella vulgaris* e *sorokiniana* perché crescono molto velocemente (tempo di duplicazione di 2,5 ore), hanno un alto contenuto in lipidi per cellula e sono mixotrofe, quindi possono crescere sia sfruttando la fotosintesi sia al buio utilizzando fonti di carbonio ridotto nel mezzo di cultura. Come nutrienti si possono usare matrici disponibili a costo zero, contribuendo così a riciclare scarti agricoli ed industriali, frazione organica degli scarti comunali e residui di fermentazione di biomassa, e al contempo velocizzare l'accumulo di biomassa algale.

Per rendere economicamente vantaggiosa la produzione di biomassa da *Chlorella* è necessario intervenire con un approccio biotecnologico di miglioramento dei ceppi wild-type, al fine di incrementare la resa di conversione dell'energia luminosa in massa secca. Infatti, le alghe si sono evolute adattandosi ad un ambiente di vita dove la luce è perlopiù limitante e la densità cellulare è molto bassa, condizioni molto lontane da quelle della crescita intensiva di un fotobioreattore dove la densità cellulare è alta. La produttività teorica delle microalghe in fotobioreattori è calcolata essere pari a 75 grammi di massa secca / m<sup>2</sup> / giorno, in realtà nelle prove in laboratorio utilizzando ceppi wild-type si



## Università degli Studi di Verona Dipartimento di Biotecnologie

raggiunge una resa massima di circa 20-30 gr / m<sup>2</sup> / giorno. Questo perché le microalghe hanno sviluppato un'elevata taglia di antenna, adatta alla crescita nell'ambiente naturale, dove il fine principale è raccogliere più luce possibile. All'interno di un fotobioreattore, gli strati più esterni della cultura assorbono una elevata quantità di luce, molto più di quella necessaria, che quindi viene dissipata; le microalghe possono arrivare a dissipare fino all'80% dell'energia assorbita, con un indesiderato calo della resa in biomassa della cultura. Di conseguenza, gli strati più interni della coltura ricevono meno luce di quella ottimale per la crescita. Le dinamiche bioenergetiche del processo fotosintetico in *C. sorokiniana* possono essere migliorate, per incrementare la resa in biomassa della coltura. Per questo ci siamo concentrati sulla ricerca di mutanti con ridotta taglia di antenna, che formino una coltura meno otticamente densa del corrispondente wild-type a parità di concentrazione cellulare, quindi assorbano solo la luce necessaria e permettano il passaggio del resto della luce agli strati cellulari più interni della coltura.

Abbiamo quindi generato una libreria di mutanti attraverso un approccio di mutagenesi chimica, trattando le cellule wild-type con etilmetansulfonato (EMS, un alchilante del DNA); più di 10000 mutanti sono stati analizzati mediante lo studio dell'induzione di fluorescenza, al fine di identificare mutanti con valori di fluorescenza massima significativamente diversi dal ceppo wild-type. Entro la popolazione di mutanti, sono state identificate 6 linee interessanti, denominate TAM1-6 (*truncated antennae mutants*). Siamo quindi passati ad analizzare nel dettaglio questi mutanti per determinare se realmente avessero una ridotta taglia di antenna.

Attraverso estrazione dei pigmenti dalle cellule e misura dell'assorbimento dell'estratto, è possibile determinare il rapporto tra clorofille *a* e *b* dei campioni. Il rapporto *a/b* è un indicatore diretto della taglia di antenna, visto che la clorofilla *b* viene legata solamente dalle proteine antenna, mentre la clorofilla *a* si lega anche alle subunità core dei due fotosistemi. L'analisi indica che tutti i sei mutanti hanno un valore del rapporto Chl *a/b* più alto del controllo, in particolare *tam2* e *tam4* hanno un valore del 40% più alto rispetto al ceppo wild-type.

Attraverso una elettroforesi nativa dei complessi fotosintetici, le diverse subunità pigmento-proteina sono state separate in un maglia di acrilamide; i risultati ottenuti mostrano chiaramente che *tam2* e *tam4* hanno una ridotta quantità della banda corrispondente alle antenne fotosintetiche sul totale delle clorofille, dato confermato anche dalla quantificazione del contenuto in proteine antenna eseguita tramite western blot, con anticorpi primari specifici per le subunità antenna o per le subunità dei core.

Analisi di induzione di fluorescenza su cellule in presenza di DCMU (un inibitore del trasferimento elettronico  $Q_A \rightarrow Q_B$  nel Fotosistema II) hanno ulteriormente mostrato che i mutanti *tam2* e *tam4* hanno una ridotta antenna funzionale del Fotosistema II (misurata come velocità di raggiungimento del massimo di fluorescenza).

Infine, misure di evoluzione di ossigeno in funzione dell'intensità dell'irraggiamento, condotte su colture wild-type e mutanti, hanno mostrato che i mutanti *tam2* e *tam4* producono più ossigeno per unità di clorofilla (circa 50% in più del genotipo wild-type) indicando che le linee mutanti sono più efficienti nella conversione dell'energia luminosa in trasporto elettronico fotosintetico, e (potenzialmente) in biomassa.

Nelle prossime fasi del lavoro si procederà testando la velocità di simultanea dei diversi ceppi a diverse intensità di irraggiamento, per quantificare il vantaggio reale dato da un antenna troncata nella resa in biomassa.

### RISULTATI DELLA RICERCA (*pubblicazioni, rapporti, brevetti, etc.*)

Fiore A, Dall'osto L, **Cazzaniga S**, Diretto G, Giuliano G, Bassi R.

A quadruple mutant of *Arabidopsis* reveals a  $\beta$ -carotene hydroxylation activity for LUT1/CYP97C1 and a regulatory role of xanthophylls on determination of the PSI/PSII ratio. *BMC Plant Biol.* 2012 Apr 18;12:50.



Università degli Studi di Verona  
Dipartimento di Biotecnologie

---

*Il Responsabile Scientifico*

(Firma)

*L'Assegnista di Ricerca*

(Firma)