



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



Ministero dell'Università
e della Ricerca



REACT EU



Università di Foggia

Nell'ambito della borsa di dottorato del Programma Operativo Nazionale Ricerca e Innovazione 2014-2020 (CCI 2014IT16M2OP005), risorse FSE REACT-EU, Azione IV.4 "Dottorati e contratti di ricerca su tematiche dell'innovazione" e Azione IV.5 "Dottorati su tematiche Green"

Corso di Dottorato in **Neuroscience and Education – Azione IV.5**
"Dottorati su tematiche Green"
(Ciclo XXXVII)

SSD CHIM-06

Blue Biorefinery for sustainable and green marine blue biomass valorisation

Bioraffineria Blu per la valorizzazione sostenibile
e verde della biomassa marina blu

Tutor: Prof. Matteo Francavilla

Dottoranda: Deborah Maria Racca

Coordinatore del Corso di Dottorato: Prof.ssa Annamaria Petito

Anno Accademico 2023/2024



Sommario

ABSTRACT.....	6
Capitolo 1: INTRODUZIONE.....	8
Prefazione	8
1. QUADRO GENERALE SULLA BLUE ECONOMY	9
2. PRODUZIONE DI MACROALGHE: NEL MONDO E IN EUROPA.....	11
3. SISTEMI DI PRODUZIONE	19
4. ACQUACOLTURA MULTITROFICA INTEGRATA: IMTA CONVENZIONALE	21
5. CASI di STUDIO IMTA.....	24
5.1 Macroalghe Chlorophyta.....	24
5.1.1 Ulva lactuca.....	24
5.1.2 Codium fragile.....	24
5.1.3 Enteromorpha intestinalis (Ulva intestinalis)	25
5.2 Macroalghe Phaeophyta	26
5.2.1 Saccharina latissima.....	26
5.2.2 Sargassum siliculosum.....	26
5.2.3 Ecklonia radiata, Macrocystis pyrifera, Lessonia corrugata e Phyllospora comosa	27
5.3 Macroalghe Rhodophyta	28
5.3.1 Solieria filiformis	28
5.3.2 Pyropia yezoensis	29
5.3.3 Gracilaria vermiculophylla	30
6. IMTA RIGENERATIVA: ACQUACOLTURA A BASSA TROFIA	31
7. BIORAFFINERIA BLU	34
7.1 Polisaccaridi.....	37
7.2 Proteine.....	37
7.3 Lipidi	38
7.4 Vitamine e minerali.....	38
7.5 Metaboliti secondari.....	39
7.6 Applicazioni.....	39
8. OBIETTIVI E ATTIVITÀ DEL PROGETTO DI DOTTORATO	43
9. Bibliografia.....	44
Capitolo 2. SPERIMENTAZIONE DI SISTEMI DI IMTA RIGENERATIVA PER LA PRODUZIONE DI BIOMASSA ALGALE	54
Prefazione	54
1. INTRODUZIONE.....	55



2. MATERIALI E METODI.....	58
2.1 Raccolta e preparazione dell'alga da utilizzare come inoculo negli impianti IMTA.....	58
2.2 Area di studio, preparazione dell'alga per impianti IMTA e siti di campionamento.....	59
2.3 Analisi chimico e fisica dell'acqua di mare.....	61
2.4 Monitoraggio dell'accrescimento della biomassa algale mediante il fattore di crescita specifico SGR (% day ⁻¹).....	62
2.5 Preparazione del campione e caratterizzazione dell'alga <i>Gracilaria gracilis</i>	62
2.6 Analisi di macro (UNI EN 15290) e micro (UNI EN 15297) elementi.....	62
2.7 Analisi dei carboidrati.....	63
2.8 Estrazione e analisi delle ficobiliproteine.....	63
2.9 Contenuto di proteine e determinazione del profilo aminoacidico.....	64
2.10 Estrazione e analisi dei lipidi.....	64
2.11 Saponificazione dei lipidi.....	65
2.12 Analisi degli esteri metilici degli acidi grassi (FAME).....	65
3. DISCUSSIONE E RISULTATI.....	66
3.1 Analisi chimica e fisica dell'acqua di mare.....	66
3.2 Performance di crescita di <i>Gracilaria gracilis</i>	68
3.3 Caratterizzazione dell'alga <i>G. gracilis</i>	69
3.4 Carboidrati totali.....	70
3.5 Ficobiliproteine.....	71
3.6 Contenuto proteico, determinazione e quantificazione del profilo aminoacidico.....	74
3.7 Composizione in macro e micro elementi di <i>G. gracilis</i>	77
3.8 Lipidi e acidi grassi (FAME).....	81
4 Conclusioni.....	85
5. Bibliografia.....	86
Capitolo 3. OTTIMIZZAZIONE DELL'ESTRAZIONE SEQUENZIALE DI FICOBILIPROTEINE E AGAR DA <i>Gracilaria gracilis</i> : APPROCCIO INTEGRATO PER UNA BIORAFFINERIA SOSTENIBILE.....	92
Prefazione.....	92
1.Introduzione.....	93
1.1 Ficobiliproteine.....	94
1.2 Polisaccaridi.....	95
1.3 Lipidi e acidi grassi.....	95
1.4 Polifenoli.....	96
1.5 Aminoacidi simili alle micosporine (MAAs).....	96
1.6 Fitormoni.....	97



2. MATERIALI E METODI.....	98
2.1 Caratterizzazione della biomassa	98
2.2 Solventi di estrazione.....	98
2.3 Procedura di estrazione delle ficobiliproteine.....	99
2.3.1 Macerazione	99
2.3.2 Omogeneizzatore.....	99
2.3.3 Bagno ad ultrasuoni.....	99
2.3.4 Sonda a ultrasuoni	100
2.3.5 Estrazione con sistema acquoso bifasico (ATPS)	100
2.4 Quantificazione delle ficobiliproteine	100
2.5 Estrazione dell'agar mediante estrazione assistite da microonde (MAE)	102
2.6 Analisi statistiche	103
3. DISCUSSIONE E RISULTATI	104
3.1. Analisi termogravimetrica ed analisi elementare di <i>G. gracilis</i>	104
3.2 Confronto tra solventi per l'estrazione di ficoeritrina (R-PE).....	104
3.3 Confronto tra metodi per l'estrazione dell'R-PE.....	105
3.4 Estrazione con sonda ultrasuoni	107
3.5 Estrazione con sistema APTS	111
3.6 Rese estrattive dell'agar mediante l'uso di MAE.....	113
4. Conclusioni.....	116
5. Bibliografia	117
Capitolo 4. IDROLIZZATI PROTEICI, ESTRATTI AMINOACIDICI E FITORMONI DA GRACILARIA GRACILIS: CARATTERIZZAZIONE, PRODUZIONE E IMPIEGO COME BIOSTIMOLANTI IN AGRICOLTURA.	122
Prefazione	122
1. INTRODUZIONE.....	123
1.1 Idrolizzati proteici	124
1.2 Aminoacidi.....	125
1.3 Fitormoni	126
1.4 REGOLAMENTO (CE) 2019/1009, D. Lgs. 75/2010, e NORMATIVE CEN/TS 17700(1-2-3-4-5)	127
1.4.1 Regolamento (UE) 2019/1009	127
1.4.2 DECRETO LEGISLATIVO 29 aprile 2010, n. 75	128
1.4.3. Normative CEN/TS 17700(1-2-3-4-5)	129
2. MATERIALI E METODI.....	131
2.1 Caratterizzazione della biomassa	132



2.2 Idrolisi alcalina con microonde.....	132
2.3 Caratterizzazione idrolizzato alcalino.....	133
2.4 Idrolisi degli aminoacidi.....	134
2.4.1 Idrolisi convenzionale.....	135
2.4.2 Idrolisi con microonde.....	135
2.5. Analisi HPLC/MS degli aminoacidi.....	135
2.6 Estrazione e quantificazione dei fitormoni.....	136
2.6.1 Preparazione standard.....	136
2.6.2 Preparazione campione.....	136
2.6.3. Quantificazione dei fitormoni.....	137
2.7 Analisi statistica.....	137
3. DISCUSSIONE E RISULTATI.....	138
3.1 Caratterizzazione della biomassa.....	138
3.2 Idrolisi alcalina con microonde.....	138
3.2.1. Caratterizzazione idrolizzato alcalino.....	140
3.3 Idrolisi degli aminoacidi.....	143
3.3.1 Idrolisi albumina sierica bovina (BSA).....	143
3.3.2. Idrolisi <i>Gracilaria gracilis</i>	147
3.4 Quantificazione dei fitormoni.....	148
3.5 Conclusioni e prospettive future: può l'estratto di <i>Gracilaria gracilis</i> essere utilizzato come biostimolante?.....	150
4. Bibliografia.....	152



ABSTRACT

Nel quadro della sfida europea delineata dall'European Green Deal, che mira a rendere l'Europa il primo continente a impatto climatico zero entro il 2050, lo sviluppo di una bioeconomia blu rappresenta un contributo chiave al raggiungimento di questo ambizioso obiettivo.

La blue economy, che promuove l'uso sostenibile delle risorse marine per una crescita economica rispettosa dell'ambiente, individua nelle macroalghe una risorsa strategica per affrontare le sfide ambientali e produttive legate alla transizione verso un'economia blu sostenibile.

Le macroalghe, risorsa ancora sottoutilizzata ma ad elevato potenziale produttivo e tecnologico, sono note non solo per svolgere un ruolo ecologico chiave negli ecosistemi costieri, ma attraverso un approccio di coltivazione sostenibile, possono anche avere il potenziale per affrontare sfide globali legate al cambiamento climatico, all'inquinamento degli ambienti marini e alla crescita demografica.

Questa tesi esplora un approccio integrato di coltivazione e valorizzazione di macroalghe, combinando sistemi di acquacoltura multitrofica integrata (IMTA) con processi di bioraffineria.

La macroalga *Gracilaria gracilis* è stata coltivata in un impianto off-shore di mitilicoltura in un'ottica di acquacoltura rigenerativa, con l'obiettivo di sviluppare tecniche di produzione sostenibili, capaci di garantire una produzione continua e di contribuire alla conservazione della biodiversità marina.

Sono stati valutati i tassi di crescita algale e la composizione biochimica della biomassa generata, al fine di valutarne la potenziale integrazione in impianti di acquacoltura esistenti, finalizzata all'innovazione e diversificazione produttiva.

Successivamente la biomassa algale è stata sottoposta a processi di bioraffineria, secondo processi di estrazione sequenziale con tecniche "green", mirati al recupero di ficobiliproteine e agar, composti di interesse per diverse applicazioni biotecnologiche, nel rispetto dei principi della chimica verde.



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



Ministero dell'Università
e della Ricerca



PON
RICERCA
E INNOVAZIONE
2014 - 2020

REACT EU



UNIVERSITÀ
DI FOGGIA

I residui solidi post-estrazione sono stati infine valorizzati per la produzione di biostimolanti ad uso agronomico. I risultati complessivi dimostrano la fattibilità e la sostenibilità dell'approccio adottato, evidenziando il potenziale delle macroalghe nel promuovere modelli produttivi circolari che coniughino innovazione tecnologica, tutela ambientale e sviluppo socioeconomico.

Il lavoro di ricerca ambisce a fornire un contributo concreto alla definizione di strategie operative per la crescita della bioeconomia marina, in linea con gli obiettivi europei di sostenibilità.



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



Ministero dell'Università
e della Ricerca



PON
RICERCA
E INNOVAZIONE
2014 - 2020

REACT EU



UNIVERSITÀ
DI FOGGIA

Capitolo 1: INTRODUZIONE

Prefazione

Il primo capitolo della tesi introduce il contesto generale in cui si inserisce il progetto di ricerca, offrendo una panoramica sullo scenario europeo e globale legato al settore emergente della “blue economy”.

L'attenzione è focalizzata sulla coltivazione delle macroalghe, come settore strategico su cui investire per affrontare le sfide ambientali, alimentari ed energetiche.

Il capitolo analizza il potenziale economico e sociale di queste biomasse, evidenziando le numerose applicazioni in ambiti come la farmacologia, la medicina, la cosmetica, la nutraceutica, l'agricoltura, l'energia e l'ambiente.

Vengono inoltre discussi i principali ostacoli allo sviluppo del settore in Europa, come i costi elevati di produzione e la mancanza di un quadro normativo armonizzato. Infine, viene approfondito il sistema di coltivazione IMTA (acquacoltura multitrofica integrata), presentato come un modello sostenibile per la produzione di macroalghe, capace di rispondere alle esigenze globali di cibo ed energia, promuovendo al contempo il risanamento ambientale e generando valore economico.



1. QUADRO GENERALE SULLA BLUE ECONOMY

Secondo l'ultimo rapporto dell'Unione Europea "The EU blue economy report 2024" [1], con il termine Blue Economy, si fa riferimento a tre differenti macro aree economiche:

- attività legate all'ambiente marino, come quelle svolte nell'oceano, in zone costiere, pesca di cattura, acquacoltura, energia eolica offshore, estrazione di petrolio e gas offshore, energia oceanica, trasporto marittimo, desalinizzazione;
- attività di trasformazione e lavorazione dei prodotti legati alle attività del mare;
- attività che includono parti del settore pubblico con responsabilità dirette costiere e oceaniche, ma anche attività di ricerca e istruzione.

Tra i settori economici legati alla blue economy, sette sono quelli definiti "consolidati" e sono:

- Risorse marine viventi;
- Risorse marine non viventi;
- Energia marina rinnovabile;
- Attività portuali;
- Costruzione e riparazione navale;
- Trasporto marittimo e Turismo costiero.

Ognuno di questi settori è suddiviso in sotto settori economici.

La coltivazione delle macroalghe non è ancora pienamente riconosciuta come un vero e proprio sotto settore economico. Pur potendo rientrare nella categoria delle "risorse marine viventi", la mancanza di dati completi, comparabili e sufficienti impedisce al momento una classificazione statistica adeguata di questo settore, considerato ancora "emergente".

Quando si parla di sfruttamento delle risorse biologiche marine, si fa riferimento sia al settore delle risorse marine viventi, che comprende la produzione primaria, lavorazione e distribuzione principalmente dei prodotti ittici, che al settore delle "biotecnologie blu" che considera i gruppi di microrganismi marini non tradizionalmente sfruttati a livello commerciale e l'applicazione della loro biomassa.



Secondo il *Blue economy Report 2024* dell'Unione Europea, la biotecnologia blu è definita come "l'applicazione della scienza e della tecnologia agli organismi viventi provenienti dalle risorse marine, nonché a parti, prodotti e modelli degli stessi, per alterare materiali viventi o non viventi per la produzione di conoscenza, beni e servizi".

Nonostante la crescita negli ultimi anni di questo settore, fare una quantificazione del suo valore economico è ancora abbastanza complesso in quanto l'attuale classificazione statistica delle attività economiche nell'Unione Europea (NACE) non ha un codice specifico per la biotecnologia blu, il che significa che non ci sono dati ufficiali sul fatturato, sul valore aggiunto e sull'occupazione, ma possiamo affermare, da una serie di report, che in termini di occupazione le piccole imprese e le start up emergenti sono quelle che maggiormente si stanno diffondendo sul territorio europeo, rispetto le grandi aziende che in questo senso impiegano una piccola porzione della forza lavoro complessiva nel settore. Questo evidenzia la nascita di un nuovo settore in espansione, che tuttavia presenta tutte le fragilità tipiche di una fase iniziale, legate soprattutto alla mancanza di stabilità delle aziende che vi operano.

In Europa il mercato in questo settore è dominato da tre maggiori esponenti: Germania, Francia e Italia (figura 1).

Figura 1. Blue biotechnology market value by EU Member State, 2021.

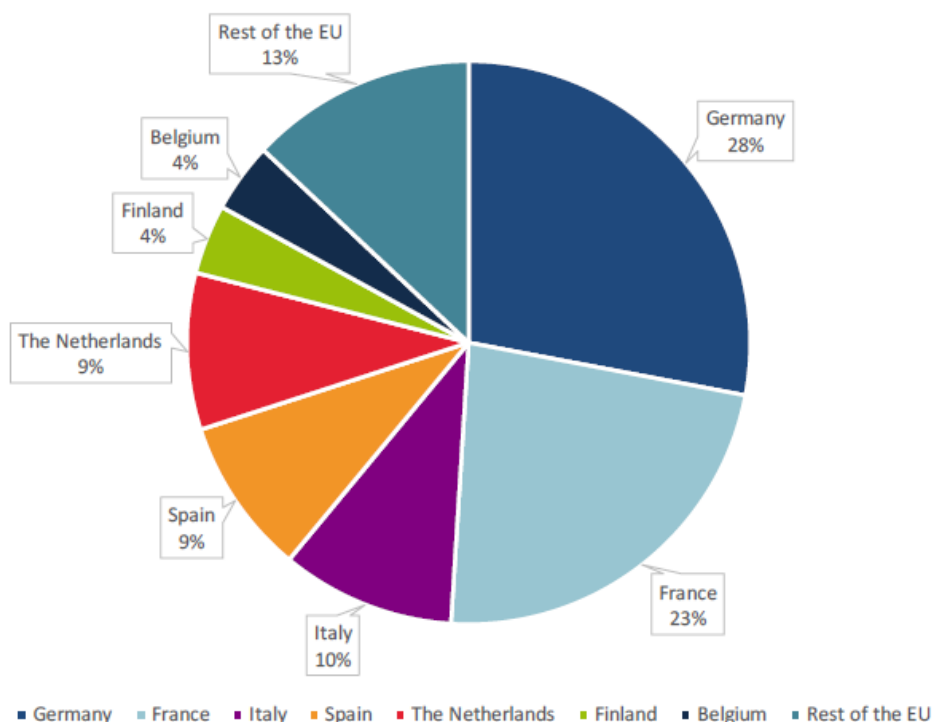


Figura 1. Source: report blue economy 2024



Le biotecnologie blu possono rappresentare un grande potenziale economico e sociale ricoprendo una vasta gamma di applicazioni:

-Farmaceutiche e mediche. L'ambiente marino, altamente eterogeneo, ha dimostrato avere un ottimo potenziale per la produzione di composti bioattivi, derivati da microrganismi e piante per le loro attività anti ossidanti, anti-neuro-infiammatoria, effetti nuoroprotettivi [2] e anti tumorali [3].

-Cosmetica e nutraceutica. Infatti sempre più persone sono interessate alla ricerca di composti naturali per il mantenimento del proprio benessere e della salute che siano però in linea con le sfide ecologiche moderne, prodotti non nocivi e sicuri per l'ambiente. In questo senso il mare offre una vasta gamma di composti bioattivi, alcuni ancora con un potenziale inesplorato, che ben rientrano negli standard moderni [4].

-Agricolo ed energetico. Le macroalghe sono considerate risorse preziose per applicazioni in agricoltura grazie al loro ottimo contenuto in termini di aminoacidi, proteine, polisaccaridi e ormoni regolatori della crescita delle piante [5], come anche microalghe e microrganismi, oltre che ad avere un ottimo potenziale per la produzione di biocarburanti, come biodiesel e bioetanolo [6][7][8].

-Biorisanamento e conservazione della biodiversità. Tra le tecnologie innovative per rimuovere gli inquinanti dall'ambiente marino [9], ampio impiego stanno trovando i microrganismi di origine marina [10]. Inoltre la biotecnologia blu si fa promotore della salvaguardia degli ecosistemi marini promuovendo un uso sostenibile delle risorse e la conservazione della biodiversità.

2. PRODUZIONE DI MACROALGHE: NEL MONDO E IN EUROPA

Quando parliamo di alghe, nella sua accezione più generica, facciamo riferimento ad un gruppo di organismi macroscopici, fotosintetici, simili a piante, che rientrano in tre grandi gruppi in base alla loro pigmentazione: alghe brune (Phaeophyta), rosse (Rhodophyta) e verdi (Chlorophyta) (FAO,2021).

Negli ultimi anni la produzione delle alghe sta destando sempre più interesse, per via dei vasti campi di applicazione che possono coprire.

I principali fattori che stanno guidando la crescita della produzione di macroalghe possono essere sintetizzati in tre elementi chiave:



-Profilo nutrizionale e risposta alle sfide globali di nuove fonti di alimentazione. Le alghe sono state largamente utilizzate in passato dalle comunità più povere e sottosviluppate come fonte di alimentazione per via del loro interessante profilo nutritivo [11]. Infatti è risaputo che le alghe, sulla base della loro specie, presentano diverse composizioni in termini di zuccheri, proteine, omega-3, minerali e vitamine [12], ed inoltre presentano ottime attività funzionali quando aggiunte ad altri alimenti [13] [14]. Negli ultimi anni, inoltre, l'attenzione si è progressivamente spostata verso il consumo dei cosiddetti "Novel food", poiché i consumatori sono sempre più orientati verso alimenti percepiti come più "sani" e provenienti da sistemi di produzione a basso impatto ambientale, in linea con una crescente sensibilità verso la sostenibilità, nonostante comunque l'occidente mostri ancora una certa riluttanza verso questi nuovi prodotti [15].

-Potenziali applicazioni biotecnologiche e eterogeneità dei campi applicativi. Grazie alla qualità e quantità dei composti bioattivi presenti nelle alghe, queste possono essere utilizzate per una varietà di applicazioni [16]. I campi di applicazione più esplorati, con una maggiore quantità di studi a riguardo, includono il campo medico e farmaceutico. Questo è dovuto alla vastità di composti bioattivi presenti nelle alghe derivanti dal loro metabolismo secondario, con riconosciute attività anti infiammatorie, antitumorali, modulatorie dello stress ossidativo, attività antimicrobiche e antivirali [17] [18] [19]. Inoltre negli ultimi decenni, diverse ricerche, hanno dimostrato come la loro applicazione coinvolga diversi settori come biocarburanti, agricoltura, imballaggi biodegradabili, biorisanamento e cosmetica. Il potenziale dell'uso delle macroalghe per la produzione di biocarburanti deriva dalla loro composizione biochimica, principalmente dalla presenza di zuccheri complessi che possono essere convertiti in bioetanolo e biobutanolo [20]. Sempre i polisaccaridi presenti nelle alghe rappresentano un punto di partenza verde e sostenibile per la produzione di bioplastiche [21] e biomateriali funzionalizzati con attività antimicrobiche [22] e antiossidanti [23]. Per il loro contenuto in proteine, aminoacidi, fitormoni e minerali le alghe sin dall'antichità vengono utilizzate per il loro potenziale in applicazioni agricole. Le recenti richieste dell'agricoltura biologica stanno indirizzando la ricerca nello sviluppo di processi per ottenere da questa importante risorsa estratti algali con attività di fertilizzante e di biostimolante [24] [25] [26]. Inoltre, l'interesse dei consumatori verso nuovi "prodotti naturali", sta spingendo le ricerche per l'utilizzo delle alghe e dei prodotti marini in generale verso le ricerche di nuove molecole ed eccipienti da utilizzare in formulazioni cosmetiche [27].

-Sostenibilità ambientale ed economica. I cambiamenti climatici, la necessità di individuare nuove fonti alimentari, l'attenzione verso sistemi di coltivazione eco-compatibili e la ricerca di nuove fonti produttive di sostentamento economico, stanno guidando le piccole comunità costiere, e non solo, nell'investire in questo nuovo tipo di coltivazione. Inoltre la coltivazione macroalgale può aiutare a preservare gli ecosistemi marini mitigando alcuni effetti dei cambiamenti climatici come acidificazione e deossigenazione degli oceani [28].

Dunque, la continua crescita della popolazione mondiale, l'aumento della richiesta di risorse naturali, fonti di cibo, energia e materiali sta spingendo l'economia verso l'attenzione a questo settore.

Come riportano dallo FAO (2021) [29], la produzione mondiale di alghe, tra stock naturali e coltivati, tra il 1950 e il 2019 è aumentata di ben 60 volte, passando da 0,56 milioni a 35,82 milioni di tonnellate (peso umido). Quasi tutta la produzione è oggi dovuta alla coltivazione (Figura 2).

Figura 2. Stato e tendenze della produzione mondiale di alghe (1950–2019).

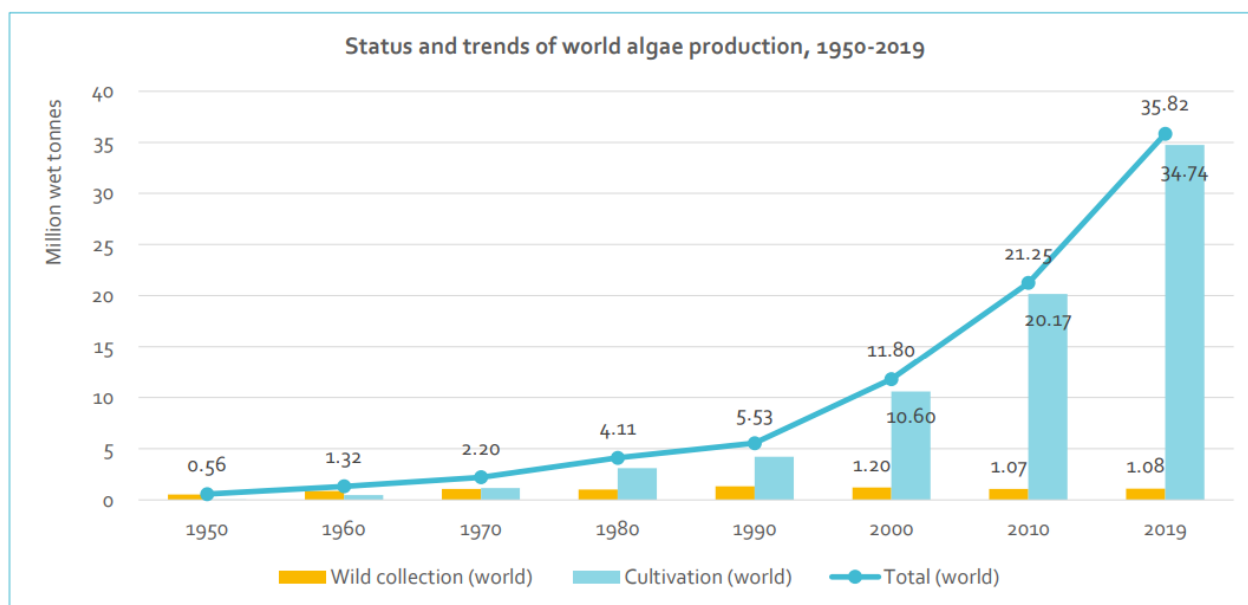


Figura 2. Data source: FAO 2021. FAO Global Fishery and Aquaculture Production Statistics (FishStatJ; March 2021; www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en)

Attualmente la produzione mondiale di alghe è concentrata in Asia: circa il 97% proviene da 7 Paesi asiatici (Cina, Indonesia, Corea del Sud, Filippine, Corea del Nord, Giappone e Malesia). L'Europa invece, con circa lo 0,8% della produzione globale si colloca al terzo posto



tra i continenti produttori. La Cina, con il 56% della produzione mondiale, rappresenta la Nazione trainante del settore. Con i suoi 32.000 Km di coste, tra coste continentali e coste delle più delle 6.000 isole che ne fanno parte, ha la fortuna di poter disporre di habitat eterogenei che contribuiscono allo sviluppo di più di 1.200 specie algali. La coltivazione delle alghe in Cina è aumentata esponenzialmente a partire dal XX secolo per via della crescente domanda alimentare, ed oggi, la Nazione ha fatto di questo settore uno dei suoi punti di forza [30]. I dati FAO (2021) [29] mostrano che la specie più allevata appartiene al genere *Laminaria* (54,4%), seguita da *Gracilaria spp* (17,3%) e *Porphyra* (10,5%).

A livello globale, la raccolta di alghe selvatiche è diminuita negli anni. Mentre la coltivazione di alghe brune e rosse è aumentata, quella di alghe verdi è diminuita. Il mercato mondiale è oggi dominato da cinque specie principali: *Laminaria/Saccharina* (35,4%); *Kappaphycus/Eucheuma* (33,5%); *Gracilaria* (10,5%); *Porphyra/Pyropia* (8,6%) e *Undaria* (7,4%).

Se la produzione di alghe in Asia è basata per il 99,67% sulla coltivazione algale e solo per lo 0,33% sulla raccolta di alghe derivanti da stock naturali, in Europa il trend è inverso. Il 96,12% della produzione deriva dalla raccolta di stock naturali, mentre solo il 3,88% è frutto della coltivazione. Le principali aree produttive europee includono Norvegia, Francia, Irlanda, Russia e Islanda.

La coltivazione algale, propriamente detta, inizia a farsi strada in Europa a partire dagli anni '90. Infatti fino a quel momento la coltivazione non era ancora stata esplorata e le alghe consumate erano quelle che spontaneamente crescevano lungo le coste (Figura 3).

Figura 3. Stato della produzione algale in Europa: confronto tra raccolta selvatica e coltivazione.

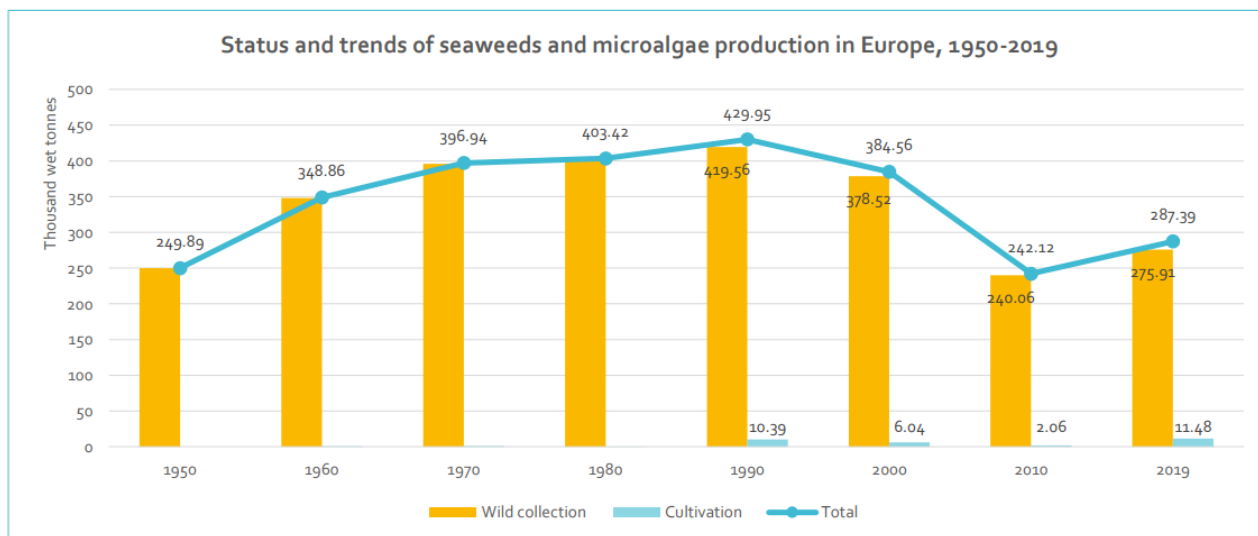


Figura 3. Data source: FAO 2021. FAO Global Fishery and Aquaculture Production Statistics (FishStatJ; March 2021; www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en).

In Europa, la coltivazione riguarda principalmente le alghe brune dei generi *Laminaria/Saccharina* e *Undaria*, oltre alle alghe rosse impiegate per l'estrazione dell'agar.

La distribuzione geografica, abbondanza e dimensione delle alghe tradizionalmente sfruttate hanno favorito lo sviluppo del settore lungo la costa atlantica, mentre le attività nel Mediterraneo restano ancora limitate.

Un allineamento dell'Europa a quelle che sono le tendenze globali della coltivazione delle alghe, potrebbe dare interessanti risposte a quelle che sono le sfide globali, come i cambiamenti climatici, la ricerca di nuove fonti di cibo ed energia. Alla luce di queste considerazioni, la Commissione Europea (CE) sta promuovendo la coltivazione delle alghe sul territorio. “*Towards a Strong and Sustainable EU Algae Sector*” [31] è il documento pubblicato dalla Commissione Europea a novembre 2022, noto anche come iniziativa UE sulle alghe, con cui l'Unione Europea mira ad aumentare la produzione sostenibile, consumo e uso di alghe e derivati. Questa iniziativa si inserisce nel più ampio contesto di politiche europee quali l'*European Green Deal* [32], la *Farm to Fork Strategy* [33] e la *Sustainable Blue Economy Communication* [34], che riconoscono il potenziale della coltivazione delle alghe come fonte di proteine per alimenti e mangimi con una bassa footprint di carbonio.

La coltivazione algale può contribuire al raggiungimento degli obiettivi dell'European Green Deal, in termini di decarbonizzazione, azzeramento delle emissioni di CO₂ e transizione verso un'economia più verde e sostenibile.



L'interesse crescente per la ricerca e l'innovazione ha dato impulso a una vera e propria espansione del settore in Europa, al punto che l'UN Global Compact ha definito questo fenomeno la *"Seaweed Revolution"*, riconoscendo lo slancio imprenditoriale che lo caratterizza.

Infatti si stima che la richiesta del mercato in Europa potrebbe aumentare fino a 8 milioni di tonnellate, e raggiungere un valore di 9 miliardi entro il 2030, creando circa 85.000 nuovi posti di lavoro. Oltre ai benefici ambientali, il settore algale potrebbe quindi rappresentare una risorsa strategica anche sul piano socio-economico.

Ad oggi l'Europa è uno dei maggiori importatori dei prodotti a base di alghe (con un valore di 554 milioni di euro nel 2016) e si stima che la tendenza dei consumatori verso prodotti più "naturali" e sostenibili porterà ad un aumento della domanda.

Il collo di bottiglia nello sviluppo di questo mercato è stato definito nel Forum della Blue Bioeconomy nel 2019, attraverso la *"Roadmap for the Blue Bioeconomy"*, riassumendo i limiti in quattro aree:

- politica, ambiente e regolamentazione;
- finanzia e sviluppo commerciale;
- consumatori e catene di valore;
- scienza, tecnologia e innovazione.

Tra le principali criticità che frenano la crescita del settore nella UE si evidenziano:

-bassi volumi di produzione. Il 99% della produzione UE proviene dalla raccolta di stock naturali, mentre a livello globale il 99% proviene da coltivazioni. Uno dei fattori che limita l'espansione produttiva è l'accesso limitato allo spazio marittimo. Questo problema potrebbe essere affrontato rivedendo i Piani Spaziali Marittimi (MSP) nazionali, attraverso un'analisi approfondita dei rischi e dei benefici legati a questa attività.

-alti costi di produzione. Potrebbero essere superati prevedendo un upscaling dei sistemi produttivi per abbattere i costi di produzione e lo sviluppo di sistemi di bioraffineria per sfruttare ogni frazione della biomassa ed aumentarne così il valore globale.

-limitata conoscenza del mercato, dei consumatori e dei rischi degli impatti di una produzione di alghe ampliata.



I consumatori europei non sono ancora tradizionalmente abituati al consumo di alghe nella propria alimentazione, anche se ad oggi la voglia di alimenti naturali e di alto valore sta spingendo i consumatori verso una scelta più consapevole. Per cui è necessario migliorare la connessione tra consumatori e fornitori, con canali commerciali chiari, oltre che consapevolezza sociale e accettazione della novità.

-quadro di governance frammentato. l'acquacoltura algale, sia in mare che su terraferma, è soggetta a una complessa rete di normative che variano tra gli Stati membri. Queste comprendono requisiti per le licenze, regolamentazioni sullo spazio marino e autorizzazioni sulle specie coltivabili, oltre a normative comunitarie in materia di sicurezza alimentare e standard industriali. La burocrazia lenta e la mancanza di armonizzazione normativa rappresentano ancora un ostacolo concreto per attrarre nuovi investimenti e favorire lo sviluppo del settore.

Per affrontare le criticità sopra elencate, la Commissione Europea ha definito una serie di azioni strategiche con una visione a lungo termine, orientata al prossimo decennio. L'obiettivo è sbloccare il potenziale delle alghe, aumentare la produzione sostenibile e promuovere un uso sicuro e innovativo dei prodotti algali.

Sviluppare linee guida comuni, integrazioni delle alghe nelle leggi nazionali, definizione dell'accesso ai siti di coltivazione e definizione dei limiti di concentrazione sicuri per i composti possono aiutare lo sviluppo del settore, rendendo più semplice l'attività imprenditoriale. In sostanza c'è necessità di un quadro normativo standardizzato e coerente su tutto il territorio dell'UE.

Altro tassello chiave sarà quello di promuovere la collaborazione e scambio di conoscenze tra stakeholders del settore e ricerca per introdurre nuove specie di alghe sul mercato e aiutare i produttori ad ottenere marchi di qualità UE.

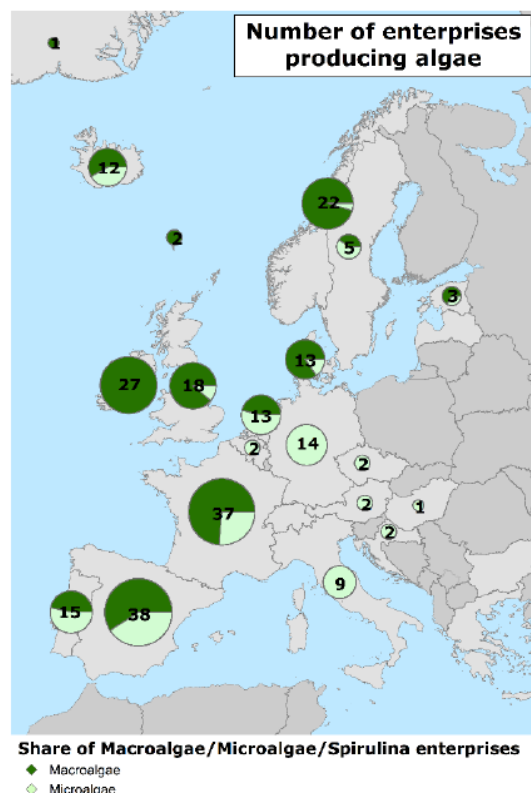
Bisognerà educare il pubblico sui vantaggi della coltivazione e dei prodotti a base di alghe con l'obiettivo di aumentare la domanda e la comprensione della bioeconomia blu.

E infine colmare le lacune in materia di conoscenza, ricerca, tecnologia e innovazione. Ciò include il miglioramento della raccolta di dati sulla produzione di alghe e sul loro impatto socioeconomico, lo sviluppo di attrezzature avanzate per la coltivazione e la lavorazione (ad esempio, sistemi automatizzati, riciclaggio dei nutrienti, bioraffinerie) e la rimozione degli ostacoli all'innovazione e all'accesso al mercato.

Queste misure si inseriscono in una strategia più ampia, che include anche iniziative come il *Green Deal europeo*, la *Strategia per l'economia blu sostenibile* e progetti finanziati da programmi comunitari come *EU4Algae*, *Horizon 2020* e *Horizon Europe*.

Attualmente in Europa operano circa 225 aziende nel settore algale, suddivise tra macroalghe (67%) e microalghe (33%) [35] (Figura 4).

Figura 4. Numero e distribuzione relativa tra le aziende produttrici di macro e microalghe per Paese.



Fonte: Producers, production systems, species, biomass uses, other steps in the value chain and socio-economic data. An overview of the algae industry in Europe. (EU).

Spagna, Francia e Irlanda sono i Paesi in Europa con il maggior numero di aziende di macro e microalghe. Norvegia, Francia e Irlanda producono la maggior parte di biomassa algale in termini di volume. Tradizionalmente in Europa le alghe prima della seconda guerra mondiale venivano utilizzate principalmente per produrre fertilizzanti e in alcuni casi come foraggi per animali. Le alghe destinate al consumo umano erano principalmente alghe rosse. In seguito alla seconda guerra mondiale, l'interruzione delle importazioni, spinse i Paesi europei a rivalutare le risorse marine locali, specialmente per la necessità di agar e alginati [36]. In linea generale le alghe nei Paesi occidentali sono state principalmente associate ad



applicazioni industriali alimentari mentre il consumo come alimento resta ancora un'importante sfida [37].

3. SISTEMI DI PRODUZIONE

Le alghe possono essere raccolte da stock naturali o coltivate in sistemi di acquacoltura. Le produzioni sono classificate in raccolta manuale o meccanica da stock naturali e in sistemi di acquacoltura “land-based” e “sea-based”.

In Europa, come già accennato, la maggior parte delle alghe deriva da stock naturali. La raccolta di questi stock è basata per l'85% su raccolta manuale e per il 15% su raccolta meccanica. Mentre per quanto riguarda l'acquacoltura è per il 24% land-based e il 76% sea-based [31].

La raccolta manuale è fatta solitamente lungo la riva durante le basse maree o anche tramite immersioni. La raccolta meccanica invece viene solitamente fatta con sistemi di imbarcazione o con sistemi costruiti su misura [38]. La raccolta da stock naturali, se non fatta in modo adeguato, può essere tuttavia di grande impatto per gli ecosistemi marini. Gli impatti dipendono dalla posizione geografica, dalla pressione di raccolta e dalla capacità rigenerativa delle alghe. Quindi anche in questo caso vanno studiati dei piani di gestione che permettano all'alga di rigenerarsi nei giusti tempi. Una raccolta scellerata può portare a riduzioni drastiche della biomassa algale, con alterazioni degli equilibri, alterando il mix di popolazioni e aumentando le impurità, come specie algali non desiderate [39] [40]. La sfida resta quella di riuscire a bilanciare la sostenibilità socio-economica con quella ambientale. È risaputo che le alghe sono una fonte di sostentamento per le piccole comunità costiere anche se difficilmente rappresentano il primo reddito occupazionale, ma di solito si accompagna ad attività principali come la pesca. Tuttavia la raccolta manuale delle alghe molte volte non è riconosciuta ed è poco regolamentata [41]. Dal punto di vista ambientale, importante oltre una ponderata raccolta, è anche un monitoraggio scientifico e robusto per poter preservare la risorsa nel lungo periodo.

Per quanto riguarda i sistemi di acquacoltura, invece, la scelta del sito di produzione e della specie algale da coltivare sono fattori determinanti per una buona produzione. È importante conoscere il ciclo vegetativo della specie selezionata per eseguire la semina e produrre piantine di buona qualità.



Quando parliamo di sistemi di coltivazione “**land-based**”, ci riferiamo a sistemi che sfruttano delle vasche, riempite principalmente con acqua di mare e nutrienti in cui vengono inseriti i talli algali per la propagazione vegetativa. Per ottimizzare la crescita i parametri di temperatura e luce (quando artificiale), vengono monitorati.

I frammenti di alga, mantenuti in movimento grazie a sistemi di agitazione, come quelli ad aria o a pale, assorbono nutrienti e luce, crescendo fino al raggiungimento della biomassa desiderata, che viene poi raccolta. La coltivazione di alghe marine in sistemi “land-based” può offrire diversi vantaggi, come controllo di luce, nutrienti, temperatura, pH e salinità, prevenzione di contaminazioni e predazione in quanto questi sistemi riducono il rischio di contaminazione da altre alghe o microrganismi e la facilità di manutenzione e riduzione delle perdite [42] [43]. I sistemi terrestri consentono interventi rapidi di manutenzione e riducono al minimo le perdite di biomassa.

Tra i limiti abbiamo tuttavia costi elevati per investimenti iniziali, gestione e manutenzione, difficile controllo di tutti i parametri di coltivazione e la necessità di posizionare gli impianti vicino al mare per garantire l’approvvigionamento di acqua [44].

A differenza della coltivazione “land-based”, la coltivazione “**sea-based**”, viene svolta direttamente in mare e può essere classificata come costiera, se localizzata in aree vicino alla costa, e off-shore, localizzata in specifiche aree lontane dalla costa. La coltivazione in mare è considerata avere un potenziale maggiore per aumentare i volumi di produzione, anche se bisogna scegliere dei siti di coltivazione adeguati per garantire le condizioni ambientali ottimali per la crescita algale [34]. Tuttavia questo tipo di coltivazione porta con sé problemi associati a rese variabili in termini di volume, minore controllo della qualità della biomassa, rischio di parassiti ed esposizione alla variabilità delle condizioni climatiche [34]. Oltre il sistema di coltivazione scelto e la posizione geografica, sarà importante scegliere anche una cultivar algale che ben si adatti all’ecosistema in cui viene inserita.

I principali metodi di allevamento di acquacoltura utilizzati in Europa sono i filari galleggianti. Questi possono essere linee di coltura orizzontali (long-line), verticali (hanging rope) e di tipo ghirlanda. Le long-line orizzontali vengono posizionate a tra 0 e 5 metri di profondità in modo che tutte le piantine abbiano la stessa esposizione alla radiazione luminosa.



Nei sistemi verticali invece, le macroalghe posizionate lungo la corda, avranno diversa esposizione alla luce. I “sistemi tipo ghirlanda” sono dei sistemi misti in cui le corde sono disposte in diagonale [40].

Sono sempre più diffusi sistemi in cui la coltivazione delle alghe in mare viene associata ad altri organismi. Un esempio è rappresentato dall’acquacoltura multitrofica integrata (IMTA), in cui la coltura di produttori secondari (come pesci), viene associata alla coltivazione di produttori primari (come le alghe) e filtratori (es. mitili) che vengono allevati insieme con lo scopo di creare valore economico aggiunto e contemporaneamente ridurre gli impatti ambientali causati dai rifiuti dell’acquacoltura.

4. ACQUACOLTURA MULTITROFICA INTEGRATA: IMTA CONVENZIONALE

Quello dell’acquacoltura viene definito come un settore chiave per una produzione alimentare sostenibile e sicura. L’ultimo report della FAO “*The state of world fisheries and aquaculture*” (2024) [45], identifica il settore della produzione di animali acquatici come un settore in crescita, registrando un aumento del 4% rispetto al 2020. L’attività di acquacoltura ha prodotto il 51% della produzione mondiale totale, superando per la prima volta anche la pesca di cattura (49%). Lo sviluppo dell’acquacoltura tuttavia non può prescindere dalla sostenibilità economica, sociale e ambientale.

Il settore della pesca e dell’acquacoltura generano un’occupazione di circa 62 milioni di persone l’anno, e sono fondamentali in molte comunità costiere. Tuttavia, bisogna tener conto anche degli impatti negativi che lo sviluppo di un settore di questa portata può generare. Sono già molti i danni irreversibili che le attività di acquacoltura hanno causato.

Distruzione degli ecosistemi naturali, salinizzazione e acidificazione dei suoli, eutrofizzazione degli oceani, contaminazione biologica e riduzione della biodiversità sono solo alcuni degli impatti negativi associati all’acquacoltura [46]. A livello globale, negli ultimi due decenni si è vista la scomparsa di più di un terzo di foreste di mangrovie per la conversione in stagni per la produzione di gamberetti [47]. Questa conversione comporta la perdita di servizi ecosistemici importanti come la protezione costiera. Infatti le mangrovie proteggono dall’erosione, dalle mareggiate e dagli tsunami, così la loro rimozione aumenta la vulnerabilità delle coste. Inoltre, le mangrovie che svolgono un’azione di fitodepurazione dell’acqua dolce, sono importanti per la qualità dell’acqua oltre che rappresentare un habitat



naturale per numerose specie. La loro rimozione contribuisce alla riduzione della biodiversità e alla riduzione di specie locali. L'acquacoltura intensiva causa spesso alterazioni del suolo, come ipersalinità dovuta ad un accumulo di sale soprattutto in zone dove c'è scarsa disponibilità di acqua dolce e acidità per utilizzo di sostanze chimiche per, ad esempio, il controllo di malattie dei pesci [42]. Il fenomeno di eutrofizzazione, ovvero l'arricchimento organico e di nutrienti delle acque, è causato principalmente da un eccesso di mangimi non consumati dagli organismi allevati, lisciviazione dei nutrienti e decomposizione di organismi morti [42]. Inoltre, l'acquacoltura può favorire l'introduzione di specie aliene negli ecosistemi naturali, alterando gli equilibri ecologici attraverso la competizione con le specie autoctone per spazio e risorse alimentari, e contribuendo alla loro possibile esclusione.

È quindi necessario adottare pratiche di gestione sostenibili per ridurre l'impatto ambientale e proteggere gli ecosistemi acquatici. Ciò ha portato alla crescita d'interesse verso l'acquacoltura multitrofica integrata.

A differenza della monocoltura, che prevede l'allevamento di una sola specie, e della policoltura, che prevede l'allevamento di più specie dello stesso livello trofico, l'acquacoltura multitrofica integrata prevede la coltura di organismi di diversi livelli trofici che vengono scelti in base alle funzioni che essi svolgono nell'ecosistema e al loro valore economico o potenziale [48].

Diversi sono i fattori da tenere in considerazione per selezionare le specie da utilizzare in sistemi IMTA [49].

Selezionare specie che siano in grado di utilizzare come fonte energetica e nutrizionale i cataboliti o prodotti di scarto delle altre, affinché le specie integrate si accrescano in modo efficiente migliorando la qualità dell'ambiente. Ne consegue che non tutte le specie possono essere coltivate insieme. È preferibile scegliere specie autoctone per prevenire il rischio che specie invasive causino danni all'ambiente locale. Nella selezione del sito bisogna tener conto della qualità e quantità dei mangimi, della presenza dei nutrienti inorganici per garantire le condizioni di coltivazione e di crescita più appropriate. Per una biomitigazione efficace e continua è importante scegliere specie che si accrescano in modo da produrre una quantità di biomassa significativa o, se crescono in quantità minori, si devono impiegare specie ad elevato valore economico o ecologico.



Prima di scegliere una determinata specie da coltivare è importante verificare che ci sia un mercato idoneo alla vendita, in modo da non investire senza poi un ritorno economico. Questa scelta deve essere guidata dalla consapevolezza di un mercato solido e consolidato, che abbia una compatibilità socio-ecologica e politica.

In genere i sistemi IMTA sono configurati in modo che sia presente almeno una specie “alimentata” ed una “estrattiva”. Possiamo quindi trovare pesci, molluschi, alghe, policheti, echinodermi e crostacei [50].

Tra le specie alimentate, i pesci pinnati rappresentano la specie più presente nei sistemi IMTA, nonché l'unica fonte alimentata dall'uomo. La loro presenza è cruciale perché forniscono, tramite le loro secrezioni, nutrienti disciolti e particellari fondamentali per la crescita degli altri organismi. Oltre questi benefici, i pesci rappresentano anche un'importante risorsa economica per l'industria dell'acquacoltura [47].

Accanto alle gabbie per pesci, spesse volte vengono allevate le specie estrattive organiche, come i bivalvi filtratori. La loro funzione biologica è quella di rimuovere i nutrienti di scarto derivanti dall'allevamento di pesci, evitando la loro dispersione nell'ambiente, oltre che ovviamente utilizzarli per il loro proprio accrescimento. Nella scelta di queste specie vanno preferite sempre specie autoctone locali, senza dimenticare anche la fattibilità economica dell'allevamento [51].

Al più basso livello trofico, vengono invece di solito collocate le macroalghe. Queste fungono da biofiltri, in quanto assimilando i nutrienti in eccesso, come carbonio, azoto e fosforo e con l'energia solare, fotosintetizzano e si accrescono. Inoltre, tramite il processo di fotosintesi, sono in grado di produrre ossigeno e ridurre i livelli di CO₂, e allo stesso tempo si produce biomassa algale ad elevato potenziale economico in quanto ricca di composti ad elevato valore aggiunto [48].

Nell'ambito dei sistemi IMTA, si distinguono due principali approcci in base al grado di interazione con l'ambiente esterno:

- sistemi basati su gabbie, che hanno costi inferiori, sfruttano le risorse naturali ed adatti all'allevamento di diverse specie;
- sistemi di acquacoltura a ricircolo (semichiusi), che permettono di monitorare meglio i parametri ambientali ma che richiedono tecnologie ed investimenti maggiori.



5. CASI di STUDIO IMTA

Di seguito, vengono presentati alcuni casi studio che evidenziano la versatilità e il potenziale delle diverse tecniche di coltivazione delle macroalghe, con particolare attenzione alle specie utilizzate.

5.1 Macroalghe Chlorophyta

5.1.1 *Ulva lactuca* [52]

Questo studio ha valutato l'efficacia di un sistema IMTA che integra la coltivazione dell'alga verde *Ulva lactuca*, con mitili e pesci, con l'obiettivo di mitigare l'impatto ambientale. La ricerca ha valutato la capacità dell'alga di assorbire nutrienti in eccesso derivanti dagli effluenti di pesci e mitili. I risultati evidenziano che *Ulva lactuca* è una specie adatta ai sistemi IMTA, con tasso di crescita elevato, assorbimento di nutrienti, come azoto e fosforo e produzione di ossigeno.

Le alghe utilizzate nello studio sono state raccolte sulle spiagge di Perequê-Mirim e Santa Rita, a Ubatuba (Brasile), e coltivate in vasche di plastica da 200 litri con acqua marina a flusso continuo, aerazione costante e condizioni ambientali naturali. L'esperimento è stato condotto con tre configurazioni: alghe coltivate da sole, alghe coltivate con pesci e alghe coltivate con effluenti di pesci e mitili.

Lo studio ha anche individuato alcune criticità, tra cui: interazioni tra specie, disponibilità limitata di azoto disciolto (fondamentale per la crescita di *Ulva*, specie nitrofila), scarso assorbimento di nitriti e nitrati in presenza di elevate concentrazioni di ammonio, e variazioni di parametri abiotici che influenzano il tasso di crescita.

5.1.2 *Codium fragile* [53]

Lo studio ha analizzato il potenziale dell'alga *Codium fragile* come elemento di biorimediazione all'interno di sistemi IMTA, con particolare attenzione alla sua capacità di assorbire l'ammonio. A differenza di altre specie algali coltivate in Corea, come *Porphyra*, *Laminaria* e *Undaria*, che crescono prevalentemente tra l'autunno e la primavera, *Codium* si sviluppa soprattutto in estate. Questo ne fa una specie particolarmente interessante per i sistemi IMTA, poiché coincide con il periodo di maggiore crescita dei pesci.



I talli di *Codium fragile* sono stati raccolti a Zagalchi a Busan, Corea, portati in laboratorio e fatti crescere in acqua di mare in condizioni di concentrazioni di ammonio, radianza e temperatura controllati.

I risultati hanno mostrato che l'alga è efficace nell'assorbire l'ammonio, con prestazioni ottimali in condizioni di temperatura elevata e alta radianza. Tuttavia, lo studio sottolinea anche alcune limitazioni: un'eccessiva esposizione alla luce intensa può causare danni fisiologici all'alga, oltre che il suo bisogno costante di nutrienti, specialmente in estate.

5.1.3 Enteromorpha intestinalis (Ulva intestinalis) [54]

È stato esplorato il potenziale dell'alga verde *Enteromorpha intestinalis* come alga da utilizzare in sistemi IMTA, sfruttando la sua capacità di biorisanare l'ambiente e migliorare la crescita delle specie allevate.

I risultati indicano che *E. intestinalis* può essere un'ottima specie algale per sistemi IMTA grazie alla sua capacità di ridurre composti azotati e fosforici, migliorando la crescita di pesci e crostacei (gamberi).

Enteromorpha intestinalis è stata raccolta da stagni di acqua salmastra nelle vicinanze dell'ICAR-Central Institute of Brackishwater Aquaculture (CIBA), Kakdwip Research Centre (KRC) (India), trasferita poi in vasche da 1.000 L contenenti acqua salmastra condizionata con urea (10 mg N L^{-1}) e perfosfato (3 mg P L^{-1}). L'alga è stata poi introdotta nelle vasche a diverse densità di biomassa.

I risultati hanno evidenziato che *E. intestinalis* è un'efficace specie estrattiva di nutrienti inorganici per sistemi IMTA, con una densità ottimale di stoccaggio compresa tra 1,0 e 1,5 kg ww/m³. Il sistema IMTA ha prodotto risultati superiori rispetto alla policoltura convenzionale in termini di peso finale degli animali allevati, miglioramento dei parametri ematologici, riduzione dello stress, resa economica e qualità dell'acqua.

Tuttavia, per una coltivazione efficiente, è fondamentale monitorare parametri ambientali come salinità, temperatura e luce, che possono influenzare sia la crescita dell'alga che l'assorbimento dei nutrienti. Inoltre, occorre considerare la competizione con altre specie algali e l'ottimizzazione della densità della biomassa per evitare effetti negativi sulle prestazioni dell'alga stessa.



5.2 Macroalghe Phaeophyta

5.2.1 *Saccharina latissima* [55]

Il ceppo di *S. latissima* utilizzato nello studio è stato ottenuto da sporofiti raccolti vicino all'area di coltivazione che vengono indotte a maturare e poi seminate su una stringa di 1,4 mm. Successivamente, dopo aver individuato il sito più adatto per la coltivazione, nella Spagna nord-occidentale (Galizia), le plantule di *Saccharina* sono state inserite in un sistema di coltivazione verticale con corde sospese a intervalli regolari e integrate con zattere di mitili come fonte di azoto, così da migliorare la qualità dell'acqua e aumentare allo stesso tempo il contenuto proteico delle alghe.

Le condizioni oceanografiche nella Spagna nord-occidentale fanno sì che *S. latissima* si comporti come una specie invernale-primaverile in coltura, con un periodo di crescita di soli 5-6 mesi. I valori di produzione negli esperimenti eguagliano o superano quelli registrati nelle aree settentrionali dell'Atlantico, dove il periodo produttivo è quasi il doppio. In particolare, lo studio ha riportato una resa media di $20,67 \pm 3,19$ kg umidi per metro dopo 140 giorni di coltura. Questo supera le rese ottenute in precedenti esperimenti con sistemi di coltivazione orizzontali a long-line nella stessa area.

Un risultato significativo riguarda il contenuto proteico dell'alga, che risulta quasi raddoppiato nei sistemi integrati rispetto agli stock naturali. Questo rende la biomassa più interessante dal punto di vista commerciale, sia per uso alimentare che zootecnico.

L'alga si è dimostrata in grado di utilizzare l'ammonio prodotto dai mitili come fonte di azoto, contribuendo a migliorare la qualità dell'acqua. Inoltre la tipologia di coltivazione verticale proposto nello studio è più sicuro, versatile e ha costi di manutenzione inferiori rispetto ai tradizionali sistemi orizzontali a long-line. Le limitazioni del sistema riguardano il limitato periodo di coltivazione. Al di fuori dell'intervallo aprile-novembre, gli effetti sinergici di ridotto fotoperiodo, bassa intensità luminosa e ridotta temperatura dell'acqua diventano condizioni proibitive per l'accrescimento dell'alga.

5.2.2 *Sargassum siliquosum* [56]

Sargassum siliquosum è un'alga tropicale conosciuta per il suo rapido tasso di crescita e per il potenziale utilizzo come biofiltro, grazie alla sua elevata capacità di organizzare l'azoto. Lo studio ha valutato l'efficacia dell'alga nell'assorbire ammonio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-) d'urea



all'interno di un sistema di acquacoltura a ricircolo (RAS) utilizzato per l'allevamento di aragoste.

L'alga, già testata per applicazioni in acquacoltura in paesi come Corea e Stati Uniti, è stata raccolta da una barriera corallina nei pressi di Magnetic Island (Townsville, Australia) e successivamente trasferita presso le strutture di ricerca a Taroona, in Tasmania. Dopo un periodo di acclimatazione, è stata introdotta nel sistema RAS per iniziare la sperimentazione.

I risultati hanno evidenziato che *S. siliquosum* è in grado di assorbire azoto inorganico in modo efficiente. Tuttavia, l'assorbimento di urea ha mostrato una risposta meno prevedibile, con tassi variabili che talvolta indicavano anche rilascio di urea da parte dell'alga. Ciò suggerisce che l'urea non rappresenti una fonte di azoto preferenziale per questa specie.

L'integrazione di *S. siliquosum* nei sistemi RAS potrebbe dunque contribuire significativamente al miglioramento della qualità dell'acqua e, al contempo, fornire "nicchie ecologiche" ed habitat per gli organismi allevati, aumentando così la funzionalità ecologica del sistema.

5.2.3 Ecklonia radiata, Macrocytis pyrifera, Lessonia corrugata e Phyllospora comosa [57]

È stata valutata l'idoneità per l'uso in IMTA di quattro macroalghe brune. La ricerca si concentra sulle variazioni stagionali nell'assorbimento di ammonio (NH_4^+) da parte di queste alghe, analizzando parametri come la cinetica di assorbimento, il rapporto carbonio/azoto (C:N), il contenuto di pigmenti e l'azoto tissutale solubile.

Le alghe sono state raccolte in due siti nella Tasmania meridionale: Flowerpot Point e Tessellated Pavements. I risultati hanno mostrato che *E. radiata*, *M. pyrifera* e *L. corrugata* seguono una cinetica di assorbimento saturabile dell'ammonio, in cui l'assorbimento aumenta con la concentrazione fino a un plateau. Invece, *P. comosa* ha presentato un comportamento bifasico in tre dei quattro mesi di campionamento, mostrando una fase saturabile a basse concentrazioni di NH_4^+ e una fase lineare a concentrazioni più elevate. *Macrocytis pyrifera* ha mostrato i valori di V_{max} (velocità massima di assorbimento) più alti in ottobre e gennaio, suggerendo una maggiore capacità di assorbimento di ammonio in questi periodi.



Le analisi ambientali hanno rilevato basse concentrazioni di nutrienti nei siti di raccolta, con valori massimi di ammonio intorno a 3,32 μM . Questo indica che, in condizioni naturali, le alghe potrebbero trovarsi in carenza di nutrienti, mentre l'apporto di nutrienti tramite effluenti da acquacoltura potrebbe stimolarne la crescita. Il rapporto C:N, indicatore dello stato nutrizionale delle alghe, ha mostrato un aumento stagionale in *E. radiata* e *P. comosa*, suggerendo una progressiva limitazione di azoto dalla primavera all'autunno.

In sintesi, lo studio ha rivelato che le quattro specie di macroalghe utilizzano diverse strategie di assorbimento dei nutrienti e che la loro fisiologia dell'azoto varia stagionalmente. *Macrocystis pyrifera* e *Phyllospora comosa* sembrano essere le specie più adatte per l'uso in sistemi IMTA in Tasmania, grazie alla loro elevata capacità di assorbimento di ammonio e alla loro capacità di adattarsi a diverse concentrazioni di nutrienti.

5.3 Macroalghe Rhodophyta

5.3.1 *Solieria filiformis* [58]

Il caso studio esplora l'integrazione di organismi alimentati e estrattivi, come pesci, alghe e cetrioli di mare, per migliorare l'assorbimento e l'assimilazione dei nutrienti in sistemi di acquacoltura. Viene valutata l'efficacia dell'alga tropicale *Solieria filiformis* nell'assorbire ammonio e fosfato in condizioni di luce e buio, e le implicazioni biochimiche di questi processi. L'alga *S. filiformis* è stata coltivata presso la stazione marina di Cinvestav situata a Telchac Puerto, nello Yucatan, in Messico. Gli esperimenti sono stati condotti in condizioni di laboratorio che imitavano le condizioni di nutrienti trovate in un allevamento commerciale di *red drum* (*Sciaenops ocellatus*) situato a Seybaplaya, Campeche, nel Golfo del Messico.

Durante lo studio sono stati condotti quattro esperimenti.

- 1) Valutazione dell'assorbimento rapido dei nutrienti (ammonio e ortofosfato). *S. filiformis* ha mostrato alti tassi di assorbimento di ammonio e ortofosfato sia in fase di luce che di buio. L'assorbimento di ammonio è stato maggiore durante il giorno rispetto alla notte, mentre i tassi di assorbimento del fosfato sono rimasti più stabili.
- 2) Valutazione dell'effetto di aggiunte continue di nutrienti con impulsi diurni e notturni sull'assorbimento di ammonio e ortofosfato.



È stato osservato che la percentuale di rimozione di ammoniaca è aumentata durante la notte, mentre il fosfato è rimasto invariato. Ciò suggerisce che l'ammonio è il principale nutriente limitante.

3) Valutazione dell'effetto di impulsi di nutrienti somministrati in diversi momenti (luce, buio, mix) sulla crescita e sulla composizione biochimica di *S. filiformis*. La crescita è diminuita nel tempo in tutti i trattamenti. I controlli senza nutrienti hanno mostrato una diminuzione significativa dei livelli di clorofilla a, confermando la necessità di un apporto nutritivo per mantenere la produttività algale.

4) Valutazione dell'integrazione di *S. filiformis* con pesci (*Sciaenops ocellatus*) e cetrioli di mare (*Isostichopus badionotus*) in un sistema IMTA. L'integrazione con pesci e cetrioli di mare ha migliorato la crescita e la composizione biochimica di *S. filiformis*, portando a ramificazioni dei talli più abbondanti, maggiore flessibilità e colori più intensi.

In sintesi, lo studio dimostra che *S. filiformis* può essere considerata un candidato ideale per integrazioni complesse in ambienti tropicali grazie alla sua capacità di biofiltrazione, crescita e adattabilità morfologica.

5.3.2 Pyropia yezoensis [59]

Questo studio ha indagato il potenziale utilizzo di *Pyropia yezoensis* nei sistemi IMTA come biofiltro naturale, valutandone la capacità di rimuovere l'ammoniaca dagli effluenti ittici. Grazie al suo elevato rapporto superficie/volume, *P. yezoensis* è in grado di assorbire rapidamente i nutrienti presenti in eccesso, rendendola un'alga ideale per migliorare la qualità dell'acqua nei sistemi di acquacoltura.

L'alga *Pyropia yezoensis* è stata raccolta in un sito di produzione di alghe situato a Gamak Bay, nel mare occidentale in Corea. Gli esperimenti si sono svolti in due ambienti distinti:

-in laboratorio, dove sono stati testati gli effetti di diverse concentrazioni di ammonio, densità algale e temperatura.

-in mesocosmo, dove i talli di *P. yezoensis* sono stati precoltivati per 3–4 giorni in vasche da 600 litri con flusso continuo di acqua marina, all'interno di un sistema chiuso per la coltura integrata pesci–alghe, all'aperto. È stato inoltre allestito un sistema di controllo con monocultura algale in acqua di mare filtrata priva di nutrienti aggiuntivi.



I risultati ottenuti dalla sperimentazione in laboratorio e in mesocosmo sono stati differenti. L'efficienza di assorbimento di nutrienti (NUE) nel sistema in laboratorio era molto più alta (86-99%) rispetto la sperimentazione in mesocosmo (40-50%).

Le condizioni ambientali variabili sono risultate determinanti per questa differenza, con la luce come principale fattore limitante. Probabilmente l'irradiazione luminosa ridotta a causa dell'auto-ombreggiamento nel mesocosmo può portare ad un assorbimento di nutrienti ridotto. Inoltre, anche la nitrificazione batterica può portare alla produzione di nitrito tossico, che inibisce ulteriormente l'efficienza di biofiltrazione delle alghe.

Nonostante queste differenze, *P. yezoensis*, rappresenta una specie promettente per l'integrazione nei sistemi IMTA, grazie alla sua capacità di assorbire nutrienti, al suo valore commerciale e alla sua tolleranza allo stress. Tuttavia, per ottimizzarne l'uso, è fondamentale gestire attentamente parametri ambientali come densità, luce e qualità dell'acqua, per massimizzare i benefici della biofiltrazione.

5.3.3 *Gracilaria vermiculophylla* [60]

Per rendere i sistemi IMTA economicamente sostenibili, è fondamentale selezionare specie estrattive che abbiano anche un valore commerciale. *Gracilaria vermiculophylla* rappresenta una scelta strategica in questo senso: è ampiamente utilizzata nell'industria dei ficocolloidi e trova applicazione anche nei mangimi per pesci come parziale sostituto delle proteine animali. Oltre al suo valore economico, *G. vermiculophylla* ha mostrato un'elevata efficacia come biofiltro in un sistema terrestre pilota. L'obiettivo dello studio era valutare la capacità dell'alga di rimuovere nutrienti provenienti dagli scarichi dell'allevamento ittico.

L'alga è stata raccolta nella laguna portoghese di Ria de Aveiro e coltivata in serbatoi da 1.200 litri installati direttamente presso l'impianto di acquacoltura. I fattori testati includevano densità di stoccaggio, tasso di ricambio idrico e stagione. Sono stati monitorati temperatura, ore di luce e irradianza, salinità, pH, tassi di crescita e produttività.

I risultati hanno evidenziato che una densità di stoccaggio più bassa (3 kg m^{-2}) favorisce una maggiore produzione di biomassa e una più efficiente rimozione dei nutrienti. Questo suggerisce che, almeno nelle condizioni sperimentali, una minore competizione per le risorse (luce, nutrienti) favorisce la crescita dell'alga. La performance dell'alga è risultata influenzata dalle condizioni stagionali:



i mesi da aprile ad agosto hanno mostrato i tassi di rimozione più elevati rispetto al periodo invernale (novembre–febbraio), confermando il ruolo chiave di luce e temperatura nella crescita algale. *Gracilaria vermiculophylla* si conferma quindi un'ottima candidata per sistemi IMTA grazie alla sua efficace capacità di rimozione dei nutrienti e al suo potenziale economico, a condizione di ottimizzare le condizioni di coltura.

Dall'analisi comparativa dei casi studio emerge con chiarezza il ruolo chiave delle macroalghe come componenti biofiltranti nei sistemi IMTA. Esse sono in grado di assimilare i nutrienti disciolti, come ammonio, fosfato e carbonio, provenienti dagli effluenti/cataboliti delle specie allevate, convertendoli in biomassa potenzialmente di valore commerciale. Grazie alla loro azione sono in grado di migliorare la qualità dell'acqua, riducendo il rischio di fenomeni di eutrofizzazione e producendo ossigeno.

L'IMTA convenzionale, quindi, rappresenta una pratica efficace e sostenibile in acquacoltura. Tuttavia, sta guadagnando sempre più attenzione un nuovo modello di IMTA, l'IMTA rigenerativa, che non si limita all'incremento della sostenibilità dell'attività di acquacoltura, ma punta al ripristino degli ecosistemi, combinando produzione con rigenerazione ambientale.

6. IMTA RIGENERATIVA: ACQUACOLTURA A BASSA TROFIA

L'acquacoltura rigenerativa è un particolare approccio all'acquacoltura che mira ad avere effetti diretti positivi sull'ambiente, concentrandosi sulla responsabilità sociale, economica ed ecologica, cercando di impattare il meno possibile sull'ambiente. È definita in The Nature Conservancy Annual Report (2021) come: *“quando l'acquacoltura commerciale o di sussistenza fornisce benefici ecologici diretti all'ambiente, con il potenziale di generare risultati ambientali netti positivi”*.

Sono stati individuati sei principi globali per l'acquacoltura rigenerativa, applicabili sia alle nuove attività aziendali che all'implementazione di quelle già esistenti [61].

Principio 1: aziende agricole posizionate in zone in cui è possibile generare benefici ambientali. Le attività di acquacoltura andrebbero collocate in aree dove è possibile massimizzare i contributi positivi all'ambiente. Quindi bisognerà scegliere habitat in cui sarà possibile massimizzare i servizi ecosistemici, che risentono di stress antropici o aree eutrofizzate. Ovviamente gli impianti non devono generare impatti negativi sugli ecosistemi naturali.



Principio 2: coltivare specie che forniscano benefici ambientali diretti. Questa significa che bisognerebbe scegliere delle specie in grado di dare il massimo vantaggio per l'ambiente. Bivalvi e alghe potrebbero essere le specie più idonee per l'acquacoltura rigenerativa. Specie autoctone sono da preferire a specie non autoctone, che, se venissero scelte, dovrebbero già essere presenti nel corpo idrico.

Principio 3: scegliere attrezzature che massimizzano i benefici ambientali. Quindi bisognerebbe evitare di utilizzare attrezzature che possano rilasciare inquinanti nell'ambiente o che possano rappresentare un rischio per la fauna locale. Al contrario le attrezzature scelte per l'acquacoltura dovrebbero essere un supporto per la ricerca di cibo, la riproduzione e creare un habitat di rifugio per le varie specie.

Principio 4: scegliere pratiche di gestione che possano apportare effetti positivi all'ambiente. È necessario oltre la scelta delle specie e delle attrezzature, scegliere anche delle corrette pratiche di gestione degli impianti. È importante monitorare gli impianti scegliendo giuste epoche di semina e raccolta ed evitare pratiche che vadano a rilasciare sostanze chimiche dannose nel corpo idrico.

Principio 5: coltivare con un'intensità e una scala che tengono conto delle esigenze dell'ambiente. Questo principio sottolinea l'importanza di coltivare una quantità di microrganismi in modo bilanciato con le capacità di carico del corpo idrico per evitare impatti negativi derivanti da un sovra sfruttamento dell'habitat in cui sono inseriti.

Principio 6: riconoscere e valorizzare economicamente e socialmente gli effetti dell'acquacoltura rigenerativa. Questo tipo di sistema può generare valore anche per la comunità e l'economia. Per questo bisogna saper riconoscere i benefici che ne derivano ed essere in grado di valorizzarli in modo opportuno sia tramite incentivi economici che azioni politiche a supporto di una sua implementazione.

Tuttavia, quando parliamo di acquacoltura rigenerativa, non bisogna trascurare i limiti ad essa associati. La necessità di avere dati più precisi, la sfida nella quantificazione dei risultati, le percezioni locali e le difficoltà di comunicazione possono rappresentare fattori limitanti.

Sono necessari ancora ulteriori dati scientifici accompagnati da una attività di monitoraggio sostanziale in tutte le fasi dell'acquacoltura affinché i dati vengano utilizzati per attestarne l'efficacia. La mancanza di dati armonizzati rende difficile avere un quadro complessivo su quelli che possono essere i benefici reali derivanti dai sistemi di acquacoltura rigenerativa.



Inoltre, i piccoli operatori potrebbero non avere gli strumenti e le capacità adeguate per eseguire una rendicontazione adeguata. A tal proposito le azioni politiche dovrebbero essere volte a fornire delle linee guida appropriate [62].

Devono essere valutati anche aspetti di carattere socio-economico per valutare il livello di accettazione sociale allo sviluppo di questi modelli, riconoscendo effetti diretti o indiretti sul benessere sociale e sullo sviluppo economico [61].

Il concetto di acquacoltura rigenerativa è strettamente connesso al concetto di “acquacoltura a basso livello trofico” (LTA). L'acquacoltura a basso livello trofico si riferisce alla coltivazione di organismi acquatici che occupano i livelli trofici inferiori della catena alimentare, come produttori primari (ad esempio, alghe) e consumatori primari (ad esempio, bivalvi). Questi organismi richiedono solo luce solare e nutrienti minerali (nel caso delle alghe) o si nutrono principalmente di fitoplancton e particolato (nel caso dei bivalvi).

L'acquacoltura a basso livello trofico può offrire delle alternative per ridurre l'impatto di emissioni di gas serra. Spostare l'attenzione da alimenti di origine animale a alimenti di origine vegetale marina può dare importanti guadagni nella decarbonizzazione, in quanto le specie LTA possono essere coltivate senza apporto di mangimi e fertilizzanti. Tuttavia, è necessario lavorare per aumentare la consapevolezza sociale nei confronti del “cibo blu”.

Lo sviluppo di questo tipo di acquacoltura incontra diversi ostacoli, non solo legati alla scarsa accettazione sociale, ma anche a fattori territoriali, tecnici, economici e normativi. [63].

Non tutte le aree costiere sono adatte: spesso mancano siti protetti dalle correnti marine che permettano una produzione efficiente e sostenibile. Inoltre, la presenza di molteplici attività concorrenti nello stesso spazio, la qualità variabile dell'acqua e la complessità del quadro normativo rappresentano ulteriori limitazioni.

A questi fattori si aggiungono gli elevati investimenti iniziali necessari per l'installazione e lo sviluppo degli impianti, che rendono questa forma di acquacoltura ancora un'attività di nicchia, con una diffusione limitata.

Uno studio condotto lungo la costa occidentale della Svezia ha analizzato gli effetti della co-coltivazione tra *Saccharina latissima* e mitili (*Mytilus edulis*), posizionando le coltivazioni



algali a valle rispetto agli allevamenti di mitili, seguendo la direzione delle correnti marine [64].

L'obiettivo era valutare come vari fattori – come la profondità di coltivazione, la quantità di luce, la presenza di epifiti, la composizione elementare dell'alga e la concentrazione di pigmenti fotosintetici – influenzassero la crescita e la qualità del *kelp* in co-coltura rispetto alla monocoltura.

I risultati ottenuti dimostrano che la co-coltivazione dell'alga con gli allevamenti di *Mytilus edulis* ha portato ad una crescita maggiore del 22% - 34% alle profondità di 1 e 3 metri, rispetto ai trattamenti di monocoltura.

Anche la percentuale di epifiti è risultata notevolmente ridotta negli allevamenti in co-coltura.

Sebbene lo studio abbia rilevato che la co-coltivazione con i mitili aumenta la crescita e la qualità del *kelp*, non è stata osservata una differenza significativa nel contenuto di azoto nei tessuti tra il *kelp* coltivato in co-coltura e quello in monocoltura, probabilmente perché il sistema di coltura si trovava in acque costiere ricche di azoto, dove l'azoto potrebbe non essere il fattore limitante per la crescita del *kelp*. Al contrario, l'incremento della penetrazione della luce – favorito dall'azione filtrante dei mitili – è risultato il principale responsabile del miglioramento nella crescita. In sintesi, lo studio dimostra che la co-coltivazione di *kelp* e mitili non solo favorisce una maggiore produttività algale, ma contribuisce anche a ridurre il biofouling e a migliorare la qualità del prodotto.

Questo, con i casi studio riportati in precedenza, evidenzia come le alghe possano offrire una risposta concreta alla crescente domanda globale di nuove fonti alimentari e proteiche. Oltre al loro valore nutrizionale, le alghe svolgono un ruolo positivo nell'ecosistema marino grazie alla loro capacità di agire come biorisanatori. Inoltre, rappresentano una risorsa dal grande potenziale economico, che può essere ulteriormente valorizzato attraverso lo sviluppo di processi di bioraffineria.

7. BIORAFFINERIA BLU

La bioraffineria viene definita dall'IEA Bioenergy Task 42 come la: “trasformazione sostenibile della biomassa in uno spettro di prodotti ed energia commerciabili” [65].



Per biomassa si intende: *“qualsiasi materia organica disponibile su base rinnovabile o ricorrente (escluso il legname di vecchia crescita), comprese le colture energetiche e le colture dedicate, i residui/sottoprodotti di colture agricole per alimenti e mangimi, le piante acquatiche, il legno e i residui di legno, i rifiuti animali e altri materiali di scarto”*.

Il concetto di bioraffineria nasce alla fine degli anni '90 come risultato della crescente domanda di energia, l'attenzione sempre maggiore per i cambiamenti climatici, la necessità di ridurre la dipendenza dai combustibili fossili in via di esaurimento, e l'aumento della popolazione. Questi fattori stanno spingendo la ricerca verso l'esplorazione di fonti di energia alternative e rinnovabili per una sua produzione più sostenibile [66] [67] [68].

Analogamente al concetto di raffineria in cui il petrolio greggio viene lavorato per essere convertito in energia ed altri prodotti [69], allo stesso modo i processi di bioraffineria integrano diversi processi di conversione della biomassa per produrre combustibili, energia e sostanze chimiche.

L'IEA (International Energy Agency) Bioenergy Task 42 classifica le bioraffinerie secondo quattro categorie principali.

1. **Piattaforme:** sono intermedi chiave generati durante la conversione della biomassa (come biochar, bio-crude, syngas), che possono essere trasformati in una vasta gamma di prodotti finali.
2. **Prodotti:** secondo il progetto *Biorefinery Outlook*, i prodotti ottenibili sono suddivisi in cinque categorie principali: prodotti chimici, materiali, alimenti, mangimi, energia.
3. **Materie prime:** sono suddivise in due gruppi. Primarie: comprendono biomassa acquatica, biomassa lignocellulosica da colture e prati, legno da silvicoltura, colture oleaginose, amidacee e zuccherine. Secondarie: includono residui e scarti organici di varia origine.
4. **Processi di conversione:** sono le tecnologie impiegate per trasformare le materie prime in prodotti finali. Si distinguono in: processi biochimici, processi termochimici, processi chimici, processi meccanici.

Il concetto di bioraffineria comprende quindi una serie di percorsi di conversione della biomassa finalizzati allo sviluppo di tecnologie che siano “sostenibili”.



Dovrebbero quindi non produrre contaminanti, avere una bassa impronta energetica e avere un impatto ambientale che sia possibilmente pari a zero [70].

Chimica verde (green chemistry) e bioraffineria sono due facce della stessa medaglia. La chimica verde, con i suoi 12 principi, presentati da Anastas e Warner, fornisce un quadro di riferimento per sviluppare processi chimici più rispettosi dell'ambiente. Prevenzione, solventi sicuri, efficienza e uso di materie rinnovabili potrebbero essere riassunti come punti chiave di questo approccio [71].

Questi principi possono ben essere applicati anche alle biomasse marine, una risorsa ancora in gran parte inesplorata. Considerando che circa il 70% della superficie terrestre è coperta da oceani, l'ambiente marino rappresenta una fonte ricchissima di risorse rinnovabili.

In questo contesto si inserisce il concetto di "bioraffineria blu", che si riferisce alla produzione di prodotti rinnovabili utilizzando come materie prime risorse marine come macro e microalghe, pesci, molluschi e crostacei.

Le bioraffinerie marine, rispetto a quelle terrestri posseggono un enorme potenziale da non sottovalutare.

L'uso di sottoprodotti/scarti della pesca e altre biomasse marine evitano conflitti etici dovuti all'uso di biomasse terrestri potenzialmente destinate al consumo umano, non hanno bisogno di aree coltivabili terrestri per la loro crescita, richiedono meno infrastrutture, crescono rapidamente, sono ricche di composti bioattivi, sono versatili rispetto diverse tipologie di biomassa e ben si inseriscono in un modello di economia circolare, in cui quelli che vengono considerati "rifiuti" vengono riutilizzati e trasformati in sostanze preziose [72].

Tra tutte le biomasse marine, le macroalghe emergono come una risorsa particolarmente promettente.

I vantaggi dell'utilizzo delle alghe risiedono principalmente nella sua struttura. Infatti, a differenza delle biomasse lignocellulosiche, non sono dotate di una struttura recalcitrante e ciò rende molto più semplice, ed energeticamente meno dispendiosa, la loro conversione in altri prodotti [73]. Le alghe contengono una grande varietà di composti, tra cui polisaccaridi, proteine, lipidi, vitamine e minerali e la loro composizione varia in base alla stagione e alle condizioni abiotiche nel sito di produzione o coltivazione. [74].



Queste caratteristiche rendono le alghe una materia prima estremamente interessante per la produzione sostenibile di energia e bioprodotto.

7.1 Polisaccaridi

Le alghe marine contengono una quantità di polisaccaridi variabili tra il 4 e il 76% del peso secco. I polisaccaridi della parete cellulare sono costituiti principalmente da cellulosa, emicellulosa e polisaccaridi neutri, sono specie specifici [75] e si differenziano in modo sostanziale tra alghe verdi, brune e rosse.

I polisaccaridi delle alghe verdi sono complessi e variamente solfati. Gli ulvani sono tra i polisaccaridi di alghe verdi più studiati, isolati da *Ulva lactuca*. Sono polisaccaridi ramificati, composti da unità disaccaridiche ripetute, in cui l'acido D -glucuronico (GlcA) è legato β -1,4 o l'acido L-iduronico (IdoA) è legato α -1,4 al L-ramnosio 3-solfato (Rha₃S), che è legato α -1,4 all'interno della catena principale. Alcuni degli acidi uronici possono essere sostituiti da D- xilosio (Xyl) legato β -1,4, che può essere solfato in posizione 2 (Xyl₂S) [76].

Le alghe brune hanno invece pareti cellulari composte da microfibrille di cellulosa circondate da una matrice di polisaccaridi acidi e proteine. I polisaccaridi acidi sono principalmente fucoidani (fucani solfati), polisaccaridi solfati con composizione variabile (fucosio, solfato, acidi uronici, altri zuccheri), e acido alginico, glucuronato non ramificato composto da acido β -D-mannuronico e acido α -L-guluronico [77].

Agar e carraginanani, polisaccaridi solfati, noti come ficocolloidi, sono i carboidrati più abbondanti nelle alghe rosse, seguiti da altri presenti in quantità minori come xilani e galattani solfati [78]. Carraginanani e agar sono due polimeri con una struttura molto simile, costituiti sulla base di una catena lineare costituita da unità alternate (1 \rightarrow 3)- β -Galattosio e (1 \rightarrow 4)- α -Galattosio. L'unità β -Galattosio (unità A) appartiene sempre alla serie D, mentre l'unità α -Galattosio (unità B) è di configurazione D nei carraginanani e L negli agarocolloidi. Le unità α -Galattosio legate (1 \rightarrow 4) possono esistere nella forma 3,6-anidrogallattosio (unità 3,6- α -AnGal, DA), mediante l'eliminazione dell'estere solfato in C-6 dell'unità α -Gal legata (1 \rightarrow 4) in presenza di galattosio-6-solforilasi durante la biosintesi [79].

7.2 Proteine

Il contenuto proteico nelle alghe può raggiungere fino al 47% di peso secco. Varia notevolmente in base alla specie, stagione e condizioni climatiche.



Generalmente il contenuto proteico varia molto tra alghe brune (3-15% peso secco), alghe verdi (9-26% peso secco) e alghe rosse (fino al 47% di peso secco) [76] [80]. Dal punto di vista nutrizionale, le alghe sono ricche in aminoacidi essenziali e ciò le rende altamente competitive nei confronti delle fonti proteiche “tradizionali”, in quanto risultano essere anche più digeribili e più facili da assorbire per l’organismo [81].

7.3 Lipidi

Nonostante la quantità di lipidi nelle alghe marine si mantenga su percentuali molto basse, 0,1-11,5% 0,4-12% e 0,2-15% di peso secco, rispettivamente per alghe brune, rosse e verdi [82], sono comunque considerati una ricca fonte di composti biologicamente attivi per via dell’elevata percentuale in termini di acidi grassi insaturi. Anche la loro composizione varia al variare della specie, della stagione, del sito di raccolta e delle condizioni ambientali. Le alghe rosse risultano essere le alghe più ricche in acidi grassi saturi ($46,90 \pm 15,73\%$), mentre le alghe brune hanno un più alto contenuto in PUFA ($34,59 \pm 15,58\%$). L'acido palmitico e l'acido oleico sono gli acidi grassi più comuni nelle alghe. Le alghe sono inoltre una fonte importante di PUFA essenziali come l'acido alfa-linolenico e l'acido linoleico. Le macroalghe possono anche sintetizzare PUFA a catena lunga come l'acido eicosapentaenoico (EPA) e l'acido docosaesaenoico (DHA), particolarmente importanti in quanto la loro produzione endogena negli esseri umani è limitata [83].

7.4 Vitamine e minerali

Oltre ai macronutrienti principali, le alghe contengono anche nutrienti che si trovano in concentrazioni minori, ma che possono trovare molteplici applicazioni. Le alghe risultano essere una buona fonte di vitamine idrosolubili, complesso della vitamina B e vitamina C e idrosolubili come vitamina A, D, E e K [80]. Tra i micronutrienti inorganici le alghe sono in grado di accumulare una grande quantità di minerali presenti naturalmente in mare. Anche in questo caso la composizione risulta essere notevolmente variabile in base alla specie.

Le alghe verdi presentano buone concentrazioni di potassio (K), calcio (Ca) e magnesio (Mg) e, in particolare, mostrano un contenuto variabile di ferro (Fe), che può oscillare tra 0,025 e 9,43 mg/g di peso secco. [84]. Le alghe rosse si caratterizzano per l’alto contenuto di Na, K, Ca e Mg, con valori compresi tra 0,4 e 4 g per 100 g. Inoltre, contengono anche oligoelementi come ferro (Fe), zinco (Zn), manganese (Mn) e rame (Cu), presenti fino a 10 mg per 100 g di peso secco. [76].



Le alghe brune risultano particolarmente ricche in potassio, con concentrazioni che vanno da 4,80 a 118 mg/g di peso secco. I livelli più elevati si trovano in *Macrocystis pyrifera*, seguita da *Laminaria digitata* (115,7 mg/g) e *Saccharina japonica* (96,3 mg/g). Anche il calcio è abbondante nelle alghe brune, con *Macrocystis pyrifera* che raggiunge concentrazioni tra 8,99 e 37,9 mg/g, seguita da *Sargassum fusiforme* (18,6 mg/g di peso secco) [82].

7.5 Metaboliti secondari

Oltre i composti che derivano dal metabolismo primario, le alghe sono in grado di sintetizzare una vasta gamma di prodotti come risultato del loro metabolismo secondario. Peptidi, terpeni, fenoli, flavonoidi, pigmenti sono solo alcuni dei composti che sono stati isolati dalle alghe e che oggi trovano vaste applicazioni. In particolare le alghe rosse sono ricche in acidi fenolici come acido p-cumarico, acido caffeico, acido salicilico, acido ipogallico e acido clorogenico e flavonoidi come rutina, catechina e quercitina. Tra i terpenoidi principalmente presenti nelle alghe rosse troviamo invece i carotenoidi come α - e β -carotene, luteina e zeaxantina [76]. Le alghe brune contengono una vasta gamma di composti bioattivi con varie attività biologiche come antimicrobici, antitumorali, antiossidanti, antinfiammatorie, antidiabetici e antiparassitari. Di particolare interesse risultano essere fluorotannini e fucoxantina [85]. Anche le alghe verdi sono fonte di metaboliti secondari bioattivi come alcaloidi, terpeni, steroidi, glicerolipidi, che possono essere impiegati in diverse applicazioni farmaceutiche e nutraceutiche. Composti di particolare interesse sono stati isolati dalla specie *Caulerpa*: caulerpina e racemosina, entrambi alcaloidi bisindolici, con notevoli attività bioattive come attività antibatteriche, antitumorali e neuroprotettive [86].

7.6 Applicazioni

Le alghe marine, grazie alla loro composizione, hanno un elevato potenziale applicativo e possono essere impiegate in una vasta gamma di settori. L'impiego di processi di bioraffineria consente di massimizzarne l'utilizzo: si estraggono innanzitutto composti ad alto valore aggiunto, mentre i residui vengono destinati alla produzione di carburanti o composti di piattaforma, minimizzando la produzione di rifiuti.

Secondo la FAO, circa l'87% della biomassa algale viene attualmente destinato al consumo umano, sia come alimento diretto sia come ingrediente alimentare.



L'uso alimentare delle alghe ha origini antichissime. In Cina, ad esempio, si fa ampio uso di macroalghe da oltre 2000 anni, e oggi si consumano circa 74 specie diverse, in forma fresca, essiccata, in zuppe o come condimenti [87]. Se in Cina, e nei Paesi asiatici in generale la tradizione dell'utilizzo algale è molto radicata, in Europa le macroalghe hanno ancora un potenziale poco esplorato, anche se l'interesse generale per le alghe sta crescendo notevolmente. Problemi come sicurezza alimentare, scetticismo dei consumatori e standard di qualità di produzione sono tra gli ostacoli maggiori da dover superare affinché entrino a pieno titolo anche nei mercati europei [88]. Grazie alla loro composizione le alghe sono diventate una promettente fonte di ingredienti funzionali che possono essere utilizzati per lo sviluppo di alimenti funzionali e nutraceutici [89] [90]. La ricchezza di nutrienti e metaboliti delle alghe, le rende un'ottima fonte di additivi e integratori naturali anche per l'alimentazione animale. Soprattutto grazie al loro elevato contenuto proteico possono rappresentare un valido sostituto rispetto ai cereali o alla farina di soia [91] [92]. Sebbene oggi le alghe siano utilizzate per diverse applicazioni, inizialmente erano largamente utilizzate come ammendanti per i terreni per migliorare la produttività del suolo. Gli agricoltori delle zone costiere erano soliti raccogliere le alghe e utilizzarle tal quali o fare dei semplici trattamenti per migliorarne l'utilizzo [93]. Oggi, la necessità di ridurre l'uso di fertilizzanti e pesticidi chimici, spesso tossici e ad alto impatto ambientale, ha rinnovato l'interesse verso prodotti agricoli sostenibili. I fertilizzanti organici a base di alghe rappresentano una soluzione promettente: migliorano la resa delle colture, la tolleranza agli stress climatici, la struttura del suolo e la capacità di ritenzione idrica [94] [95]. Inoltre, le alghe contengono una serie di composti estraibili in ambiente acquoso neutro o in condizioni acide e alcaline, come fitormoni, vitamine, aminoacidi, micro e macronutrienti, che possono avere effetti di biostimolazione e bioregolazione.

Grazie alla varietà di composti bioattivi in esse contenuti, le alghe stanno destando sempre maggiore attenzione anche per la sostituzione di composti sintetici nell'industria cosmetica e farmaceutica. Composti come fucoidani, fucoxantina, polifenoli, polisaccaridi solfati, terpenoidi, sono noti per le loro attività antiossidanti, antidiabetiche, antinfiammatorie, antitumorali, antibatteriche e antivirali [17] [96] [97] [98].

Un altro ambito di applicazione in forte espansione è quello delle bioplastiche. I polisaccaridi algali, grazie alla presenza di gruppi funzionali (solfato, carbossile, idrossile), si legano facilmente ad altre molecole biologiche.



Le bioplastiche derivate dalle alghe sono biodegradabili, ecocompatibili, dotate di proprietà antimicrobiche (grazie ai composti fenolici) [99], sono atossiche, hanno buone proprietà di barriera al vapore di ossigeno, sono impermeabili a grassi e oli, hanno una natura idrofila che gli permette di interagire con i tessuti biologici, capacità adsorbenti, e se miscelati con altri polimeri se ne possono migliorare le caratteristiche. Tutto ciò le rende degli ottimi alleati quindi anche per applicazioni in campo alimentare e farmaceutico [100].

Per offrire una visione chiara delle principali applicazioni delle alghe, la Tabella 1 presenta le specie algali maggiormente utilizzate dalle aziende a livello globale, accompagnate dai relativi settori di impiego.

Tabella 1. Specie algali più utilizzate a livello globale e relative applicazioni.

Algal species	Number of companies	Class	Industry (Application)
<i>Saccharina latissima</i>	82	Phaeophyta	Food-Personal care-Plant&soil nutrition-Bioplastic-Biomaterial-Nutraceuticals-Feed-Pharmaceuticals-
<i>Ascophyllum nodosum</i>	69	Phaeophyta	Plant&soil nutrition- Feed-Food- Nutraceuticals-Personal care- Pharmaceuticals-Hydrocolloids-Bioremediation/wastewater treatment
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	60	Rhodophyta	Plant&soil nutrition--Food- Hydrocolloids-Bioplastic/Biomaterial
<i>Ulva sp.</i>	57	Chlorophyta	Plant&soil nutrition- Feed-Food- -Personal care-Bioremediation/wastewater treatment-Chemicals-Carbon sequestration-Energy-HABs
<i>Sargassum sp.</i>	56	Phaeophyta	Plant&soil nutrition-Food-Feed-Pharmaceuticals-Hydrocolloids-Bioplastic/Biomaterial-Chemicals-Carbon sequestration-Energy-HABs-Paper cardboard-Construction-Textiles
<i>Palmaria palmata</i>	48	Rhodophyta	Plant&soil nutrition-Food-Feed-Pharmaceuticals-Nutraceuticals-Personal care
<i>Gracilaria sp.</i>	42	Rhodophyta	Plant&soil nutrition-Food-Feed-Pharmaceuticals-Nutraceuticals-Personal care-Hydrocolloids-Bioremediation/Wastewater treatment-Carbon sequestration-Energy- HABs
<i>Laminaria digitata</i>	30	Phaeophyta	Plant&soil nutrition-Food-Feed-Nutraceuticals-Personal care-Hydrocolloids
<i>Eucheuma denticulatum</i>	29	Rhodophyta	Plant&soil nutrition- Food- Feed-Nutraceuticals-Personal care- Hydrocolloids
<i>Porphyra sp.</i>	29	Rhodophyta	Plant&soil nutrition-Food-Feed-Personal care-Hydrocolloids
<i>Alaria esculenta</i>	28	Phaeophyta	Plant&soil nutrition-Feed-Personal Care
<i>Undaria sp.</i>	24	Phaeophyta	Plant&soil nutrition-Food-Feed-Personal care-Hydrocolloids



<i>Chondrus crispus</i>	21	Rhodophyta	Plant&soil nutrition-Nutraceuticals-Personal care-Food-Hydrocolloids
<i>Himantalia elongata</i>	21	Phaeophyta	Nutraceuticals-Personal care-Pharmaceuticals
<i>Porphyra yezoensis</i>	18	Rhodophyta	Food-Personal care-Plant soil nutrition-Bioplastic-Biomaterial-Nutraceuticals-Feed-Pharmaceuticals-
<i>Ulva lactuca</i>	18	Chlorophyta	Plant&soil nutrition- Feed-Nutraceuticals-Personal Care-Food-Pharmaceutical- Carbon sequestration-Energy-HABs
<i>Asparagopsis sp.</i>	17	Rhodophyta	Feed- Pigments/Inks/Dyes/Coating
<i>Fucus vesiculosus</i>	17	Phaeophyta	Plant&soil nutrition-Feed-Food-Nutraceuticals-Personal Care-Pharmaceuticals
<i>Undaria Pinnatifida</i>	16	Phaeophyta	Plant&soil nutrition-Nutraceuticals-Food-Pharmaceuticals-Hydrocolloids
<i>Laminaria sp</i>	15	Phaeophyta	Plant&soil nutrition-Feed-Food-Nutraceuticals-Hydrocolloids-HABs-Bioplastic/Biomaterial
<i>Macrocystis pyrifera</i>	14	Phaeophyta	Plant&soil nutrition- Hydrocolloids-Feed-Food
<i>Palmaria sp.</i>	13	Rhodophyta	Plant&soil nutrition-Food-Feed-Nutraceuticals-Personal care-Hydrocolloids
<i>Fucus serratus</i>	11	Phaeophyta	Personal care-Food-Pharmaceuticals-Nutraceuticals-
<i>Durvillaea antarctica</i>	10	Phaeophyta	Food-Bioplastic/Biomaterial-Feed-Plant&soil nutrition

Fonte: <https://phyconomy.net/database>



8. OBIETTIVI E ATTIVITÀ DEL PROGETTO DI DOTTORATO

Il progetto di dottorato si articola in 3 macro-obiettivi, ciascuno approfondito nei capitoli 2, 3 e 4 della presente tesi.

Capitolo 2 – Obiettivo 1: Valutare e ottimizzare sistemi di acquacoltura multitrofica integrata (IMTA) rigenerativa per la produzione sostenibile di biomassa algale. L'obiettivo è valutare la performance produttiva e la composizione biochimica della macroalga *Gracilaria gracilis*, e verificare la fattibilità dell'integrazione di tale coltivazione in impianti di acquacoltura esistenti per promuovere modelli di produzione sostenibili e generare benefici economici e ambientali.

Capitolo 3 – Obiettivo 2: Sviluppare e applicare processi di bioraffineria blu per valorizzare la biomassa algale *Gracilaria gracilis*. Il focus è sul frazionamento sostenibile della biomassa per l'ottenimento di componenti ad alto valore aggiunto (ficobiliproteine e agar), seguendo i principi della chimica verde e dell'economia circolare.

Capitolo 4 – Obiettivo 3: Valutare il potenziale della macroalga *Gracilaria gracilis* come fonte di biostimolanti per l'agricoltura, con un focus particolare sulla valorizzazione del residuo solido derivante dai processi di bioraffineria algale.



9. Bibliografia:

1. European Commission, Directorate General for Maritime Affairs and Fisheries & Joint Research Centre (2024). *The EU Blue Economy Report 2024*. Publications Office
2. Karthikeyan, A., Joseph, A., & Nair, B. G. (2022). Promising bioactive compounds from the marine environment and their potential effects on various diseases. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20(1), 14.
3. El-Seedi, H. R., Refaey, M. S., Elias, N., El-Mallah, M. F., Albaqami, F. M. K., Dergaa, I., Du, M., Salem, M. F., Tahir, H. E., Dagliaa, M., Yosri, N., Zhang, H., El-Seedi, A. H., Guo, Z., & Khalifa, S. a. M. (2025). Marine natural products as a source of novel anticancer drugs: an updated review (2019–2023). *Natural Products and Bioprospecting*, 15(1).
4. Rotter, A., Varamogianni-Mamatsi, D., Pobirk, A. Z., Matjaž, M. G., Cueto, M., Díaz-Marrero, A. R., Jónsdóttir, R., Sveinsdóttir, K., Catalá, T. S., Romano, G., Guler, B. A., Atak, E., Zrimec, M. B., Bosch, D., Deniz, I., Gaudêncio, S. P., Grigalionyte-Bembič, E., Klun, K., Zidar, L., . . . Mandalakis, M. (2024). Marine cosmetics and the blue bioeconomy: from sourcing to success stories. *iScience*, 27(12).
5. Hamed, S. M., Abd El-Rhman, A. A., Abdel-Raouf, N., & Ibraheem, I. B. (2018). Role of marine macroalgae in plant protection & improvement for sustainable agriculture technology. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(1), 104-110.
6. Bayu, A., & Handayani, T. (2018, December). High-value chemicals from marine macroalgae: opportunities and challenges for marine-based bioenergy development. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 209, No. 1, p. 012046). IOP Publishing.
7. Singh, S. P., & Sinha, R. P. (2020). Marine photosynthetic microorganisms: valuable compound production and bioenergy applications. In *Encyclopedia of Marine Biotechnology*, 4, 2229-2245.
8. Narayanan, M. (2024). Marine algae biomass: A viable and renewable resource for biofuel production: a review. *Algal Research*, 103687.
9. Aliko, V., Multisanti, C. R., Turani, B., & Faggio, C. (2022). Get rid of marine pollution: bioremediation an innovative, attractive, and successful cleaning strategy. *Sustainability*, 14(18), 11784.



10. Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J., Kumari, S., & Das, S. (2013). Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(2), 561-571.
11. Knorr, D., & Augustin, M. A. (2025). Expanding our food supply: underutilized resources and resilient processing technologies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 105(2), 735-746.
12. Peñalver, R., Lorenzo, J. M., Ros, G., Amarowicz, R., Pateiro, M., & Nieto, G. (2020). Seaweeds as a functional ingredient for a healthy diet. *Marine drugs*, 18(6), 301.
13. Lee, Z. J., Xie, C., Ng, K., & Suleria, H. A. (2025). Unraveling the bioactive interplay: Seaweed polysaccharide, polyphenol and their gut modulation effect. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 65(2), 382-405.
14. Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(4), 600-609.
15. Maksan, M. T., Matulić, D., Mesić, Ž., & Memery, J. (2025). Segmenting and profiling seaweed consumers: A cross-cultural comparison of Australia, the United Kingdom and Croatia. *Food quality and preference*, 122, 105305.
16. Sewuster, J., Bhatta, N., & McLeod, C. (2025). Seaweed Solutions for Sustainable Aquaculture: Market Evaluation Report.
17. Lomartire, S., & Gonçalves, A. M. (2022). An overview of potential seaweed-derived bioactive compounds for pharmaceutical applications. *Marine Drugs*, 20(2), 141.
18. Catarino, M. D., Amarante, S. J., Mateus, N., Silva, A. M., & Cardoso, S. M. (2021). Brown algae phlorotannins: A marine alternative to break the oxidative stress, inflammation and cancer network. *Foods*, 10(7), 1478.
19. El-Beltagi, H. S., Mohamed, A. A., Mohamed, H. I., Ramadan, K. M., Barqawi, A. A., & Mansour, A. T. (2022). Phytochemical and potential properties of seaweeds and their recent applications: A review. *Marine drugs*, 20(6), 342.
20. Hemavathy, R. V., Ragini, Y. P., Shruthi, S., Ranjani, S., Subhashini, S., & Thamarai, P. (2025). Biofuel production from marine macroalgae: Pathways, technologies, and sustainable energy solutions. *Industrial Crops and Products*, 224, 120282.



21. Lim, C., Yusoff, S., Ng, C. G., Lim, P. E., & Ching, Y. C. (2021). Bioplastic made from seaweed polysaccharides with green production methods. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5), 105895.
22. Santinon, C., Ochi, D., Beppu, M. M., & Vieira, M. G. A. (2022). Chemical modifications in the structure of seaweed polysaccharides as a viable antimicrobial application: A current overview and future perspectives. *Algal Research*, 66, 102796.
23. Pedro, A. C., Paniz, O. G., Fernandes, I. D. A. A., Bortolini, D. G., Rubio, F. T. V., Haminiuk, C. W. I., ... & Magalhães, W. L. E. (2022). The importance of antioxidant biomaterials in human health and technological innovation: a review. *Antioxidants*, 11(9), 1644.
24. Villa e Vila, V., Rezende, R., Marques, P. A. A., Saraiva, B. R., Wenneck, G. S., & Matumoto-Pintro, P. T. (2025). Potential application of seaweed extract in tomato to improve bioactive compounds during postharvest storage. *Journal of Food Science and Technology*, 1-11.
25. Nabti, E., Jha, B., & Hartmann, A. (2017). Impact of seaweeds on agricultural crop production as biofertilizer. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14, 1119-1134.
26. Bint Tariq, T., & Umer, M. (2025). The potential of seaweed-derived polysaccharides as sustainable biostimulants in agriculture. *International Journal of Biological Macromolecules*, 140009.
27. López-Hortas, L., Flórez-Fernández, N., Torres, M. D., Ferreira-Anta, T., Casas, M. P., Balboa, E. M., Falqué, E., & Domínguez, H. (2021). Applying seaweed compounds in cosmetics, cosmeceuticals and nutricosmetics. *Marine Drugs*, 19(10), 552.
28. Jagtap, A. S., & Meena, S. N. (2022). Seaweed farming: a perspective of sustainable agriculture and socio-economic development. *Natural resources conservation and advances for sustainability*, 493-501.
29. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Global seaweeds and microalgae production. (2021). <http://www.fao.org/3/cb4579en/cb4579en.pdf>.
30. Wang, Q., Sun, X., Lin, S., Dong, Y., Shen, H., He, Z., Luo, H., Zou, L., Chung, I. K., & Yang, Y. (2024). Large-scale seaweed cultivation as a nature solution for carbon-negative economy and restorative environmental stewardship: Lessons from China. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 207, 114954.



31. European Commission. (2022). Towards a Strong and Sustainable EU Algae Sector. {SWD (2022) 361}.
32. European Commission. (2019). The European Green Deal (COM (2019) 640 final).
33. European Commission. (2020). A Farm to Fork Strategy for a fair, healthy and environmentally-friendly food system (COM (2020) 381 final).
34. European Commission. (2021). Communication from the Commission on a new approach for a sustainable blue economy in the EU (COM (2021) 240 final).
35. Araújo, R., Calderón, F. V., López, J. S., Azevedo, I. C., Bruhn, A., Fluch, S., Tasende, M. G., Ghaderiardakani, F., Ilmjärv, T., Laurans, M., Mac Monagail, M., Mangini, S., Peteiro, C., Rebours, C., Stefansson, T., & Ullmann, J. (2021). Current status of the algae production industry in Europe: an emerging sector of the blue bioeconomy. *Frontiers in Marine Science*, 7, 626389.
36. Kain, J. M., & Dawes, C. P. (1987). Useful European seaweeds: past hopes and present cultivation. *In Twelfth International Seaweed Symposium: Proceedings of the Twelfth International Seaweed Symposium held in Sao Paulo, Brazil, July 27–August 1, 1986* (pp. 173-181). Springer Netherlands.
37. Mendes, M., Navalho, S., Ferreira, A., Paulino, C., Figueiredo, D., Silva, D., Gao, F., Gama, F., Bombo, G., Jacinto, R., Aveiro, S., Schulze, P., Gonçalves, A. T., Pereira, H., Gouveia, L., Patarra, R., Abreu, M. H., Silva, J., Navalho, J., . . . Speranza, L. (2022). Algae as food in Europe: An overview of species diversity and their application. *Foods*, 11(13), 1871.
38. European Commission, Joint Research Centre. (2022). *Producers, system, species, biomass uses, other steps in the value chain and socio-economic data: an overview of the algae industry in Europe*. European Union. 2022.
39. Francavilla, M., Franchi, M., Monteleone, M., & Caroppo, C. (2013). The red seaweed *Gracilaria gracilis* as a multi products source. *Marine drugs*, 11(10), 3754-3776.
40. Buschmann, A. H., Correa, J. A., Westermeier, R., del Carmen Hernandez-Gonzalez, M., & Norambuena, R. (2001). Red algal farming in Chile: a review. *Aquaculture*, 194(3-4), 203-220.
41. Mac Monagail, M., Cornish, L., Morrison, L., Araújo, R., & Critchley, A. T. (2017). Sustainable harvesting of wild seaweed resources. *European Journal of Phycology*, 52(4), 371-390.



42. Dinesh Kumar, S., Satish, L., Dhanya, N., Malar Vizhi, J., Nadukkattu Nayagi, N., Gopala Krishnan, S., & Ganesan, M. (2024). Tank cultivation of edible seaweeds: an overview of the Indian perspective for opportunities and challenges. *Biomass Conversion and Biorefinery*, *14*(11), 11757-11767.
43. Hafting, J. T., Critchley, A. T., Cornish, M. L., Hubley, S. A., & Archibald, A. F. (2012). On-land cultivation of functional seaweed products for human usage. *Journal of Applied Phycology*, *24*, 385-392.
44. CEVA. (2024). Report of the current algae industry in Europe. CIRCALGAE Project.
45. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2024). The State of World Fisheries and Aquaculture 2024: Blue transformation in action. FAO.
46. Martinez-Porchas, M., & Martinez-Cordova, L. R. (2012). World aquaculture: environmental impacts and troubleshooting alternatives. *The Scientific World Journal*, *2012*(1), 389623.
47. Primavera, J. H. (2006). Overcoming the impacts of aquaculture on the coastal zone. *Ocean & Coastal Management*, *49*(9-10), 531-545.
48. Rusco, G., Roncarati, A., Di Iorio, M., Cariglia, M., Longo, C., & Iaffaldano, N. (2024). Can IMTA System improve the productivity and quality traits of aquatic organisms produced at different trophic levels? The benefits of IMTA—Not only for the ecosystem. *Biology*, *13*(11), 946.
49. Sukhdhane, K. S., Kripa, V., Divu, D., Vase, V. K., & Mojjada, S. K. (2018). Integrated multi-trophic aquaculture systems: a solution for sustainability. *CMFRI Bulletin*, *78*, 58–64
50. Nissar, S., Bakhtiyar, Y., Arafat, M. Y., Andrabi, S., Mir, Z. A., Khan, N. A., & Langer, S. (2023). The evolution of integrated multi-trophic aquaculture in context of its design and components paving way to valorization via optimization and diversification. *Aquaculture*, *565*, 739074.
51. Sasikumar, G., & Viji, C. S. (2015). Integrated multi-trophic aquaculture systems (imta). *CMFRI Special Publication*, *118*, 1–8.
52. Nardelli, A. E., Chiozzini, V. G., Braga, E. S., & Chow, F. (2019). Integrated multi-trophic farming system between the green seaweed *Ulva lactuca*, mussel, and fish: a production and bioremediation solution. *Journal of Applied Phycology*, *31*, 847-856.



53. Kang, Y. H., Shin, J. A., Kim, M. S., & Chung, I. K. (2008). A preliminary study of the bioremediation potential of *Codium fragile* applied to seaweed integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) during the summer. *Journal of applied phycology*, *20*(2), 183-190.
54. Naskar, S., Biswas, G., Kumar, P., De, D., Das, S., Sawant, P. B., Chadha, N. K., & Behera, P. (2023). The green seaweed, *Enteromorpha intestinalis*: An efficient inorganic extractive species for environmental remediation and improved performances of fed species in brackishwater integrated multi-trophic aquaculture (BIMTA) system. *Aquaculture*, *569*, 739359.
55. Freitas, J. R., Salinas Morrondo, J. M., & Cremades Ugarte, J. (2016). *Saccharina latissima* (Laminariales, Ochrophyta) farming in an industrial IMTA system in Galicia (Spain). *Journal of applied phycology*, *28*, 377-385.
56. Edwards, G., Visch, W., Hurd, C. L., Smith, G., & Fitzgibbon, Q. (2024). Nitrogen excretion by the lobsters *Panulirus ornatus* and *Thenus australiensis* and uptake by the brown algae *Sargassum siliculosum*: Implications for integrated recirculated aquaculture systems. *Aquaculture*, *581*, 740486.
57. Smart, J. N., Schmid, M., Paine, E. R., Britton, D., Revill, A., & Hurd, C. L. (2022). Seasonal ammonium uptake kinetics of four brown macroalgae: Implications for use in integrated multi-trophic aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, *34*(3), 1693-1708.
58. Felaco, L., Olvera-Novoa, M. A., & Robledo, D. (2020). Multitrophic integration of the tropical red seaweed *Solieria filiformis* with sea cucumbers and fish. *Aquaculture*, *527*, 735475.
59. Kang, Y. H., Kim, S., Lee, J. B., Chung, I. K., & Park, S. R. (2014). Nitrogen biofiltration capacities and photosynthetic activity of *Pyropia yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta): groundwork to validate its potential in integrated multi-trophic aquaculture (IMTA). *Journal of applied phycology*, *26*, 947-955.
60. Abreu, M. H., Pereira, R., Yarish, C., Buschmann, A. H., & Sousa-Pinto, I. (2011). IMTA with *Gracilaria vermiculophylla*: productivity and nutrient removal performance of the seaweed in a land-based pilot scale system. *Aquaculture*, *312*(1-4), 77-87.



61. Alleway, H. K., Waters, T. J., Brummett, R., Cai, J., Cao, L., Cayten, M. R., Costa-Pierce, B. A., Dong, Y., Hansen, S. C. B., Liu, S., Liu, Q., Shelley, C., Theuerkauf, S. J., Tucker, L., Wang, Y., & Jones, R. C. (2023). Global principles for restorative aquaculture to foster aquaculture practices that benefit the environment. *Conservation Science and Practice*, 5(8).
62. Mizuta, D. D., Froehlich, H. E., & Wilson, J. R. (2023). The changing role and definitions of aquaculture for environmental purposes. *Reviews in Aquaculture*, 15(1), 130-141.
63. Krause, G., Vay, L. L., Buck, B. H., Costa-Pierce, B. A., Dewhurst, T., Heasman, K. G., Nevejan, N., Nielsen, P., Nielsen, K. N., Park, K., Schupp, M. F., Thomas, J., Troell, M., Webb, J., Wrangle, A. L., Ziegler, F., & Strand, Å. (2022). Prospects of low trophic marine aquaculture contributing to food security in a net Zero-Carbon world. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6.
64. Hargrave, M. S., Nylund, G. M., Enge, S., & Pavia, H. (2022). Co-cultivation with blue mussels increases yield and biomass quality of kelp. *Aquaculture*, 550, 737832.
65. Annevelink, B., Jong, E. de, Ree, R. van, & Wagemann, K. (2022). Global Biorefinery Status Report 2022. *IEA Bioenergy Task 42*.
66. Maity, S. K. (2015). Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery: Part I. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 43, 1427-1445.
67. Attard, T. M., Clark, J. H., & McElroy, C. R. (2020). Recent developments in key biorefinery areas. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 21, 64-74.
68. Ragini, Y. P., Karishma, S., Kamalesh, R., Saravanan, A., Tajsabreen, B., & Eswaar, D. K. (2025). Sustainable biorefinery approaches in the valorization of agro-food industrial residues for biofuel production: Economic and future perspectives. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 75, 104239.
69. Kaiser, M. J. (2017). A review of refinery complexity applications. *Petroleum Science*, 14, 167-194.
70. Morais, A. R., & Bogel-Lukasik, R. (2013). Green chemistry and the biorefinery concept. *Sustainable chemical processes*, 1, 1-3.
71. Mikkola, J., Sklavounos, E., King, A. W. T., & Virtanen, P. (2015). CHAPTER 1. The Biorefinery and Green Chemistry. In *RSC green chemistry series* (pp. 1–37).



72. Sequeira, R. A., Mondal, D., & Prasad, K. (2021). Neoteric solvent-based blue biorefinery: for chemicals, functional materials and fuels from oceanic biomass. *Green Chemistry*, 23(22), 8821-8847.
73. Filote, C., Santos, S. C., Popa, V. I., Botelho, C. M., & Volf, I. (2021). Biorefinery of marine macroalgae into high-tech bioproducts: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19, 969-1000.
74. Torres, M. D., Kraan, S., & Domínguez, H. (2019). Seaweed biorefinery. *Reviews in environmental science and bio/technology*, 18, 335-388.
75. Holdt, S. L., & Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of applied phycology*, 23, 543-597.
76. Laurens, L. M., Lane, M., & Nelson, R. S. (2020). Sustainable seaweed biotechnology solutions for carbon capture, composition, and deconstruction. *Trends in Biotechnology*, 38(11), 1232-1244.
77. García-Ríos, V., Ríos-Leal, E., Robledo, D., & Freile-Pelegrin, Y. (2012). Polysaccharides composition from tropical brown seaweeds. *Phycological Research*, 60(4), 305-315.
78. Carpena, M., Garcia-Perez, P., Garcia-Oliveira, P., Chamorro, F., Otero, P., Lourenço-Lopes, C., Cao, H., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2022). Biological properties and potential of compounds extracted from red seaweeds. *Phytochemistry Reviews*, 22(6), 1509-1540.
79. Hentati, F., Tounsi, L., Djomdi, D., Pierre, G., Delattre, C., Ursu, A. V., Fendri, I., Abdelkafi, S., & Michaud, P. (2020). Bioactive Polysaccharides from Seaweeds. *Molecules*, 25(14), 3152.
80. Fleurence, J. (2004). Seaweed proteins. *Proteins in food processing*, 197, 211.
81. Pereira, L., Cotas, J., & Gonçalves, A. M. (2024). Seaweed proteins: A step towards sustainability. *Nutrients*, 16(8), 1123.
82. Xie, C., Lee, Z. J., Ye, S., Barrow, C. J., Dunshea, F. R., & Suleria, H. A. (2024). A review on seaweeds and seaweed-derived polysaccharides: Nutrition, chemistry, bioactivities, and applications. *Food Reviews International*, 40(5), 1312-1347.
83. Jaworowska, A., & Murtaza, A. (2022). Seaweed derived lipids are a potential anti-inflammatory agent: a review. *International journal of environmental research and public health*, 20(1), 730.



84. Lozano Muñoz, I., & Díaz, N. F. (2020). Minerals in edible seaweed: Health benefits and food safety issues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(6), 1592-1607.
85. Remya, R. R., Samrot, A. V., Kumar, S. S., Mohanavel, V., Karthick, A., Chinnaiyan, V. K., ... & Muhibbullah, M. (2022). Bioactive potential of brown algae. *Adsorption Science & Technology*, 2022, 9104835.
86. Shah, S. a. A., Hassan, S. S. U., Bungau, S., Si, Y., Xu, H., Rahman, M. H., Behl, T., Gitea, D., Pavel, F., Aron, R. a. C., Pasca, B., & Nemeth, S. (2020). Chemically Diverse and Biologically Active Secondary Metabolites from Marine Phylum chlorophyta. *Marine Drugs*, 18(10), 493.
87. Bangmei, X., & Abbott, I. A. (1987). Edible seaweeds of China and their place in the Chinese diet. *Economic botany*, 41(3), 341-353.
88. Blikra, M. J., Altintzoglou, T., Løvdal, T., Rognså, G., Skipnes, D., Skåra, T., Sivertsvik, M., & Fernández, E. N. (2021). Seaweed products for the future: Using current tools to develop a sustainable food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 118, 765-776.
89. Shannon, E., & Abu-Ghannam, N. (2019). Seaweeds as nutraceuticals for health and nutrition. *Phycologia*, 58(5), 563-577.
90. Matos, J., Cardoso, C., Serralheiro, M. L., Bandarra, N. M., & Afonso, C. (2024). Seaweed bioactives potential as nutraceuticals and functional ingredients: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 106453.
91. Morais, T., Inácio, A., Coutinho, T., Ministro, M., Cotas, J., Pereira, L., & Bahcevandziev, K. (2020). Seaweed potential in the animal feed: A review. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(8), 559.
92. Makkar, H. P., Tran, G., Heuzé, V., Giger-Reverdin, S., Lessire, M., Lebas, F., & Ankers, P. (2016). Seaweeds for livestock diets: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 212, 1-17.
93. Illera-Vives, M., Labandeira, S. S., Fernández-Labrada, M., & López-Mosquera, M. E. (2020). Agricultural uses of seaweed. In *Sustainable seaweed technologies* (pp. 591-612). Elsevier.
94. Arioli, T., Mattner, S. W., & Winberg, P. C. (2015). Applications of seaweed extracts in Australian agriculture: past, present and future. *Journal of applied phycology*, 27, 2007-2015.



95. El Chami, D., & Galli, F. (2020). An assessment of seaweed extracts: Innovation for sustainable agriculture. *Agronomy*, 10(9), 1433.
96. Venkatesan, J., Lowe, B., Anil, S., Manivasagan, P., Kheraif, A. A. A., Kang, K. H., & Kim, S. K. (2015). Seaweed polysaccharides and their potential biomedical applications. *Starch-Stärke*, 67(5-6), 381-390.
97. Lomartire, S., Cotas, J., Pacheco, D., Marques, J. C., Pereira, L., & Gonçalves, A. M. (2021). Environmental impact on seaweed phenolic production and activity: An important step for compound exploitation. *Marine Drugs*, 19(5), 245.
98. Ferdous, U. T., & Yusof, Z. N. B. (2021). Algal Terpenoids: A Potential. *Terpenes and Terpenoids: Recent Advances*, (pp. 63-82). Springer.
99. Krishnan, L., Ravi, N., Mondal, A. K., Akter, F., Kumar, M., Ralph, P., & Kuzhiumparambil, U. (2024). Seaweed-based polysaccharides—review of extraction, characterization, and bioplastic application. *Green Chemistry*, 26(10), 5790-5823.
100. Khalil, H. A., Saurabh, C. K., Tye, Y., Lai, T., Easa, A., Rosamah, E., Fazita, M., Syakir, M., Adnan, A., Fizree, H., Aprilia, N., & Banerjee, A. (2017). Seaweed based sustainable films and composites for food and pharmaceutical applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 77, 353–362.



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



Ministero dell'Università
e della Ricerca



PON
RICERCA
E INNOVAZIONE
2014 - 2020

REACT EU



UNIVERSITÀ
DI FOGGIA

Capitolo 2. SPERIMENTAZIONE DI SISTEMI DI IMTA RIGENERATIVA PER LA PRODUZIONE DI BIOMASSA ALGALE

Prefazione

Negli ultimi anni l'interesse verso lo sviluppo sostenibile dell'acquacoltura ha favorito lo sviluppo di sistemi in grado di coniugare produttività e tutela dell'ambiente. In questo contesto si inserisce questo lavoro dedicato alla valutazione del potenziale della macroalga rossa *Gracilaria gracilis* coltivata in sistemi di acquacoltura multitrofica integrata (IMTA) off-shore. Lo studio si è concentrato sulla valutazione delle performance di crescita dell'alga in diversi sistemi di allevamento e sulla variazione della composizione biochimica in relazione ai parametri ambientali.

I risultati ottenuti evidenziano il potenziale dell'alga come risorsa a elevato valore aggiunto per applicazioni in diversi ambiti industriali e come possibile fonte di reddito per gli operatori di imprese di acquacoltura nelle piccole comunità costiere.

Il lavoro intende fornire un contributo alla promozione di modelli produttivi circolari e innovativi, in linea con le strategie europee per la transizione ecologica e blu.



1. INTRODUZIONE

La coltivazione delle alghe in Europa sta suscitando un crescente interesse e sviluppo. L'European Green Deal (EDG) promossa dalla Commissione europea, comprende una serie di iniziative, strategie e atti legislativi che, insieme, mirano a consentire una trasformazione giusta, sostenibile e inclusiva della società e dell'economia europea. Un settore delle alghe più forte a livello europeo sosterrrebbe gli obiettivi del EDG e del “Farm to Fork strategy” come esplicitato nel documento intitolato “Towards a Strong and Sustainable EU Algae Sector” [1].

Gli orientamenti strategici per un'acquacoltura dell'UE più sostenibile e competitiva per il periodo 2021-2030 (orientamenti strategici per l'acquacoltura dell'UE [2]) sottolineano la necessità di promuovere “l'alghicoltura”, sia di macroalghe (marine) che di microalghe, come strategia per contribuire al raggiungimento di diversi obiettivi del Green Deal europeo. L'alghicoltura può contribuire al raggiungimento degli obiettivi dell'UE riguardanti la decarbonizzazione, la riduzione dell'inquinamento, la circolarità, la conservazione e il ripristino della biodiversità, la protezione degli ecosistemi e lo sviluppo di servizi ambientali. Le alghe possono costituire una valida alternativa ai prodotti di origine fossile e fungere da materia prima per i biostimolanti vegetali, i prodotti chimici, biocarburanti e altri materiali di origine biologica (COM/2022/592).

La produzione di alghe è sempre più associata all'acquacoltura, in particolare ai sistemi di produzione in IMTA (acquacoltura multitrofica integrata). L'acquacoltura svolge un ruolo cruciale nel soddisfare la crescente domanda globale di prodotti acquatici e nel fornire una fonte alimentare sostenibile [3]. Oggi, anche il settore dell'acquacoltura deve rispondere ai principi dell'economia circolare per cercare di ridurre al minimo gli effetti negativi derivanti da un intenso abuso degli ecosistemi marini [4], promuovendo un uso più efficiente delle risorse, per raggiungere gli obiettivi di neutralità climatica e zero inquinamento, ridurre gli impatti delle attività umane sul mare e per conservare e proteggere la biodiversità marina [5].

A questo proposito, i sistemi di acquacoltura multitrofica integrata tradizionale nascono per mitigare gli effetti negativi dell'acquacoltura [6], integrando la coltura di specie di diversi livelli trofici, dove le specie di basso livello assimilano i residui metabolici organici prodotti dal livello trofico superiore [7].



Quasi tutti questi sistemi riguardano l'allevamento di specie come pesci, alghe e bivalvi [8] permettendo di ridurre significativamente il rilascio di sostanze nutritive inquinanti e di ottimizzare l'utilizzo delle risorse. A differenza dei sistemi di acquacoltura convenzionali, l'IMTA offre un approccio più sostenibile e diversificato e può contribuire a migliorare l'accettazione sociale dell'acquacoltura, grazie ai suoi benefici ambientali e alla produzione di alimenti di elevato valore commerciale [9].

Tuttavia, nonostante i sopracitati benefici effetti dell'IMTA, l'inserimento di specie alimentate nel sistema potrebbe non essere la scelta più efficace per ridurre l'impatto ambientale. L'utilizzo di mangimi comporta infatti il rilascio in acqua di sostanze non assimilate e residui chimici, che possono contribuire alla contaminazione dell'ambiente marino. Inoltre, la produzione e il trasporto dei mangimi generano elevate emissioni di gas serra [10]. In contesti aperti, come gli impianti off-shore, la dispersione rapida di questi residui riduce ulteriormente la possibilità per le specie filtranti o vegetali di assorbirli, rendendo meno efficace l'intero sistema policulturale.

Per questo motivo, per sistemi di allevamento off-shore avrebbe più senso concentrarsi solo sull'allevamento di specie di basso livello trofico, come macroalghe e molluschi bivalvi, in quanto non sarebbe possibile controllare il flusso idrico dei contaminanti derivanti da specie di livello trofico superiore e pertanto specie di basso livello trofico andrebbero comunque a mitigare la presenza di effluenti presenti in acqua provenienti da una qualsiasi fonte antropica [6] [9].

Nelle coltivazioni poli-colturali di sole specie di basso livello trofico, le macroalghe possono giocare un ruolo importante grazie alla loro capacità di sequestrare nutrienti nell'acqua e ridurre i livelli eccessivi [10], utilizzandoli per accrescersi. Essendo organismi fotoautotrofi, necessitano di luce, carbonio inorganico (CO₂, carbonati) e nutrienti, la cui disponibilità in mare varia stagionalmente e geograficamente. È quindi fondamentale disporre di dati ambientali di base per individuare i periodi dell'anno in cui la disponibilità di specifici nutrienti potrebbe limitare la crescita algale [11]. Puntare sull'accrescimento di specie estrattive in sistemi integrati può anche rappresentare un'opportunità di reddito per le comunità costiere.



Le alghe sono generalmente classificate in tre gruppi tassonomici: alghe brune (circa 2.000 specie di Phaeophyceae), alghe rosse (oltre 7.200 specie di Rhodophyta) e alghe verdi (oltre 1.800 specie di macroalghe di Chlorophyta) [1].

Grazie al grande numero di metaboliti prodotti, le alghe presentano un elevato potenziale per diverse applicazioni, nel campo alimentare, come additivi per mangimi, produzione di bioplastiche, biofertilizzanti, antinfiammatori, antitumorali e cosmetici [12] [13].

Tra queste, le alghe rosse, stanno destando particolare interesse per l'industria alimentare e farmaceutica, per il loro particolare contenuto in polisaccaridi (amido della floridea e galattani solfati, come carragenine o agar), proteine e peptidi derivati (ficobiliproteine, ficolectine e amminoacidi simili alle micosporine), minerali e altri composti come polifenoli e lipidi [14] [15].

Per la presenza di questi composti, questa tipologia di alghe risulta particolarmente adatta allo sviluppo di processi di bioraffineria per estrarre tutti i costituenti di valore commerciale in un processo, definito a cascata, che sia economicamente sostenibile e che porti ad una gestione efficiente della risorsa algale [16].

Gracilaria gracilis è una specie algale di grande interesse biotecnologico, grazie alla sua capacità di biosintetizzare una vasta gamma di metaboliti secondari con potenziali applicazioni in diversi settori, dalla farmaceutica all'alimentare [17]. La crescente domanda di agar e di altri composti bioattivi estratti da questa specie ha stimolato l'interesse per la sua coltivazione su larga scala. Tuttavia, le pratiche di raccolta non controllate avvenute in passato hanno messo a rischio la disponibilità di stock naturali [18].

Un esempio emblematico è quanto si è verificato nella laguna di Lesina (FG) dove, tra gli anni '70 e '80, si è assistito a un intenso sfruttamento commerciale della specie naturalmente presente, con gravi conseguenze sull'ecosistema locale. Studi successivi hanno però dimostrato la possibilità di ripristinarne le popolazioni, evidenziando anche il potenziale di *G. gracilis* per migliorare la qualità delle acque [19].

Pertanto, lo sviluppo di tecniche di coltura sostenibili si presenta come una necessità impellente per garantire la continuità della produzione e la conservazione della biodiversità marina.



Alla luce di tali considerazioni, l'obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare il potenziale di crescita e coltivazione di *Gracilaria gracilis* in sistemi di acquacoltura multitrofica integrata off-shore con mitili (*Mytilus galloprovincialis*) e ostriche. A tal fine, la biomassa algale è stata monitorata in relazione alla variazione dei parametri ambientali e successivamente analizzata per determinarne la composizione biochimica, finalizzata ad un uso commerciale della biomassa prodotta.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Raccolta e preparazione dell'alga da utilizzare come inoculo negli impianti IMTA

Gracilaria gracilis è stata raccolta nella laguna di Lesina, situata sul lato Nord del promontorio del Gargano, nel Mar Adriatico meridionale (41°88' N, 15°45' E), nel mese di ottobre 2022 (Figura 1- 2). Grazie al supporto dei pescatori locali, la *Gracilaria* è stata raccolta e sottoposta ad un primo trasporto in contenitori con acqua lagunare. Successivamente, è stata trasferita in tre vasche di acclimatazione di dimensioni $\varnothing=195$ cm, $h=56$ cm, alimentate con acqua di mare mantenuta in ricircolo ed allocate a terra, presso il canale di Capoiale (Figura 3). Dopo due settimane di condizionamento, la *Gracilaria* è stata preparata per essere installata tra i filari di molluschi.

Figura 1. Sito di studio. Laguna di Lesina: sito in cui è stata raccolta l'alga. Impianto "La Fenice": sito per la sperimentazione IMTA.

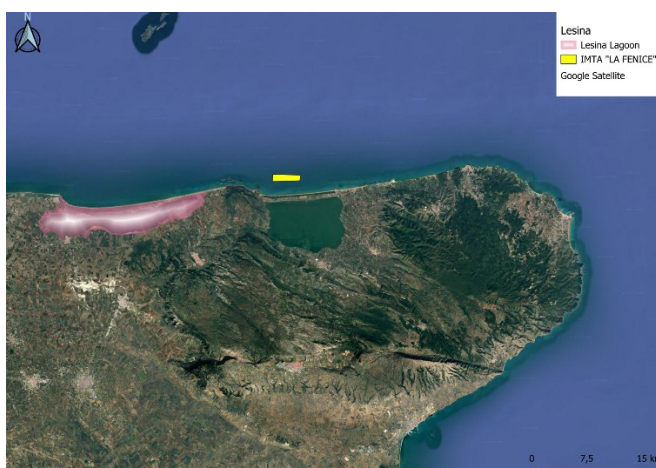




Figura 2: raccolta G. gracilis.



Figura 3. Fase di acclimatamento in vasche.



2.2 Area di studio, preparazione dell'alga per impianti IMTA e siti di campionamento

Per la sperimentazione in mare aperto, negli impianti off-shore, è stato scelto un impianto intensivo di produzione di mitili, caratterizzato da 50 filari orizzontali lunghi 2 km e posizionati a circa 5 m di profondità su una batimetria del fondale di circa 11 m. I filari erano posti a 30 m di distanza gli uni dagli altri e su di essi erano innestate, ad intervalli di 70 cm, le reste verticali di mitili, lunghe 3 m. All'interno di una sezione dell'impianto dedicata alla



sperimentazione del sistema IMTA, sono state installate 3 diverse tipologie di tecnologie per la produzione di macroalghe: long-line verticali, lanterne in rete e ceste rigide in plastica.

Sono state utilizzate long-line in corda di polimero biodegradabile a triplice elica, sulle quali sono stati innestati talli dell'alga *G. gracilis*. Le long-line verticali, che raggiungevano una profondità di 8 m, sono state installate nell'interspazio tra due reste di mitili, a una distanza di circa 35 cm (Figura 4a).

Le lanterne utilizzate per la coltivazione dell'alga, lunghe 1,5 m, in rete di nylon e a cinque ripiani, sono state posizionate nello spazio in concessione per la sperimentazione. L'alga, prima di essere inserita all'interno delle lanterne, su tre dei cinque ripiani, era stata pesata. Queste sono state poi alternate alle reste dei mitili. Le lanterne testate avevano due diverse magliature della rete, rispettivamente di 2,5 e 9 mm (Figura 4b).

Per l'ostricoltura, all'interno della stessa concessione, la *Gracilaria*, pesata, è stata inserita in ceste in plastica rigida per ostriche, alternando all'interno di un sistema a castelletto a cinque livelli, due cestelli di macroalga a tre cestelli di ostriche (Figura 4c). Tutte le fasi di impianto sono state realizzate con la preziosa collaborazione di giovani molluschicoltori.

Figura 4a: posizionamento delle long-line nell'impianto.





Figura 4b: posizionamento delle lanterne nell'impianto.



Figura 4c: posizionamento delle ceste nell'impianto.



Le attività di monitoraggio sono state svolte per l'intera campagna produttiva da novembre 2022 a luglio 2023. Nel corso dei sopralluoghi e dei campionamenti, sono stati valutati: fenomeni di predazione di *G. gracilis*, accrescimento ponderale e rilevamento dei parametri chimico-fisici delle acque.

2.3 Analisi chimico e fisica dell'acqua di mare

I parametri chimicofisici dell'acqua di mare sono stati monitorati nel sito di sperimentazione durante l'intera durata del test. Temperatura (°C), salinità (psu), ossigeno disciolto (DO, % saturazione) e pH sono stati valutati direttamente sul campo, utilizzando una sonda multiparametrica (sistema multisonda Aquaprobe AP-5000 e GPS Aquameter, forniti da



AQUAREAD Ltd., Broadstairs, Regno Unito). Inoltre, campioni di acqua sono stati prelevati con bottiglia Niskin nei siti IMTA, stoccate in bottiglie di plastica e trasferiti in laboratorio per l'analisi chimica per la quantificazione dei nutrienti disciolti. L'azoto inorganico disciolto (DIN) composto da nitrati (NO_3^-), nitriti (NO_2^-) e ammonio (NH_4^+), è stato determinato tramite analisi con cromatografia ionica.

2.4 Monitoraggio dell'accrescimento della biomassa algale mediante il fattore di crescita specifico SGR (% day⁻¹)

Ad ogni campionamento effettuato, la biomassa algale è stata rimossa dai sistemi di coltivazione ed adagiata in reti di nylon. Prima di essere pesata questa veniva lasciata per un tempo sufficiente a drenare tutta l'acqua superficiale in eccesso e pesata poi con un dinamometro digitale. Dopo essere stata pesata, l'alga veniva reinserita nel sistema di coltivazione per essere ripesata al campionamento successivo. Il tasso di crescita specifico (SGR) è stato calcolato mediante l'equazione (1):

$$\text{SGR (\% day}^{-1}\text{)} = \frac{\ln(\text{FW}) - \ln(\text{IW})}{T} * 100$$

Dove: FW = Peso fresco finale, IW = Peso fresco iniziale e T = Giorni di coltura.

2.5 Preparazione del campione e caratterizzazione dell'alga *Gracilaria gracilis*

La macroalga campionata in modo cadenzale nel periodo da maggio 2023 a settembre 2023 è stata trasferita fresca in laboratorio mediante un box refrigerato. Dopo essere stata lavata con acqua dolce e aver proceduto alla rimozione manuale di epifiti, è stata sottoposta a processo di liofilizzazione e successiva macinazione, fino ad ottenere una polvere. La biomassa è stata caratterizzata mediante proximate analysis mediante l'analizzatore termogravimetrico TGA 701 (LECO), con il metodo ASTM D7582. L'analisi elementare dei campioni finalizzata alla determinazione del contenuto di C, H, N e S è stata effettuata seguendo il metodo LECO-ASTM-D 5291 con un analizzatore elementare CHNS-LECO 628. Il contenuto di O è stato calcolato indirettamente come complemento a 100 rispetto alla somma del contenuto di C, H, N, S e ceneri.

2.6 Analisi di macro (UNI EN 15290) e micro (UNI EN 15297) elementi

Campioni di alga liofilizzata sono stati mineralizzati con una miscela di H_2O_2 , HNO_3 e HF in un digestore a microonde a vaso chiuso (CEM-Mars6) secondo quanto riportato delle metodiche UNI EN 15290 e 15297, per la determinazione di macro e micro elementi.



La soluzione è stata poi analizzata per i metalli mediante spettrometria al plasma indotto accoppiata alla spettroscopia di emissione ottica (ICP-OES Agilent 700).

2.7 Analisi dei carboidrati

Il contenuto totale di carboidrati è stato quantificato mediante il metodo NREL (2018) per la determinazione del contenuto totale di carboidrati nella biomassa algale. Questa procedura analitica di laboratorio (LAP) utilizza un'idrolisi con mediante acido forte, acido solforico, in due fasi, a 30 °C e a 121 °C, per idrolizzare le forme polimeriche dei carboidrati nella biomassa algale in subunità monomeriche.

Il contenuto di monomeri di carboidrati della biomassa algale è stato determinato utilizzando un HPLC Agilent Infinity 12560 (Agilent, USA) dotato di un rivelatore a indice di rifrazione (RID_Agilent, USA) e una colonna cromatografica Hi-Plex H 8,8 µm (Agilent, USA), che è stata termostata a 60 °C. Il volume di iniezione è stato impostato a 20 µL e la fase mobile utilizzata è stata H₂O con H₂SO₄ 0,005 M flussato isocraticamente a 0,7 mL min⁻¹. La quantità di ciascun analita è stata determinata utilizzando curve di calibrazione generate utilizzando da soluzioni standard a diversa concentrazione. I monosaccaridi standard di grado analitico, quali acido D-glucuronico, acido D-galatturonico, D-glucosio, D-galattosio, D-arabinosio, acido levulinico, idrossimetilfurfurale (HMF) e furfurale sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich Co.

2.8 Estrazione e analisi delle ficobiliproteine

Il campione di alghe (0,5 g di peso secco) dopo essere stato macinato fino a dimensioni inferiore a 1 mm, è stato sospeso in 10 mL di H₂O milliQ pestellando in un mortaio per circa 1 minuto. La sospensione solido/liquida è stata trasferita in una provetta di plastica per centrifuga, centrifugata a 5 °C, 5.000 rpm per 10 min. Il surnatante è stato raccolto e il pellet è stato estratto di nuovo con H₂O milliQ, come descritto, per tre volte. I surnatanti sono stati combinati. Il contenuto di ficobiliproteine (identificate come R-ficoeritrina R-PE, ficocianina PC e alloficocianina APC) sono state quantificate mediante spettrofotometria secondo quanto riportato da Kursar et al. (1983) [20].



2.9 Contenuto di proteine e determinazione del profilo aminoacidico

Il contenuto totale delle proteine è stato calcolato mediante analisi elementare dei campioni con il metodo LECO ASDM-D 5291. Questo metodo è stato realizzato con un analizzatore elementare CHNS-LECO 680. Per ottenere il contenuto proteico percentuale, il contenuto di azoto (N) viene moltiplicato per un fattore di conversione da azoto a proteine (NP) di 5,1 in accordo a quanto definito da Alex R. Angell et al., 2015 [21]. È stato preferito questo valore al fattore tradizionale di 6,25 in quanto non tutto l'azoto presente nelle alghe è proteico. Infatti, le alghe, come altre materie vegetali, contengono una quantità significativa di materiale azotato non proteico, come clorofilla, acidi nucleici, amminoacidi liberi e azoto inorganico (nitrati, nitriti e ammoniaca).

Per la determinazione degli aminoacidi è stato utilizzata una metodica che prevede due fasi di processo: idrolisi del substrato e separazione cromatografica con identificazione e quantificazione dei residui aminoacidici. L'idrolisi è stata eseguita applicando il metodo convenzionale come descritto da Hempel et al., 2012 [22] leggermente modificato. In particolare, 50 mg di ciascun campione di biomassa liofilizzata sono stati sospesi in 10 mL di HCl 6 N in provette di vetro per idrolisi, con fenolo all' 1% (p/v). Le provette sono state saturate con azoto ed autoclavate per 24 ore a 110 °C. Dopo l'idrolisi la soluzione è stata centrifugata, l'estratto è stato filtrato utilizzando un filtro per siringa in nylon da 0,22 µm, e trasferito in vial prima dell'iniezione.

Gli amminoacidi sono stati quantificati utilizzando il sistema HPLC-MS 6120 (Agilent) mediante cromatografia a interazione idrofila con colonna zwitterionica (HILIC). (Per i parametri operativi utilizzati fare riferimento alla Tabella 3 del capitolo 4).

2.10 Estrazione e analisi dei lipidi

I lipidi totali contenuti nella macroalga sono stati estratti secondo il metodo descritto da Bligh e Dyer [23].

Come di seguito, 0,5 g di biomassa liofilizzata, sono stati miscelati con una soluzione di metanolo:cloroformio (2:1 v/v 15mL) ed omogeneizzati mediante un omogeneizzatore T 18 digital ULTRA-TURRAX® a 17.000 rpm per 1 minuto. L'omogeneizzato è stato centrifugato, il surnatante separato mentre il pellet solido è stato risospeso in solvente fresco e nuovamente omogeneizzato per estrazione. La procedura è stata ripetuta per tre volte. Successivamente i surnatanti sono stati combinati e addizionati di acqua saturata con NaCl



per permettere una adeguata separazione di fase. È stata poi recuperata la fase in cloroformio utilizzando un imbuto separatore, ripetendo diversi cicli di estrazione con acqua satura fino a quando il solvente organico non è diventato incolore. La fase di cloroformio è stata addizionata con solfato di sodio per eliminare eventuali tracce d'acqua. Infine il solvente è stato evaporato tramite evaporatore rotante (Buchi Rotavapor R-210) e i lipidi, così purificati, sono stati quantificati per via gravimetrica.

2.11 Saponificazione dei lipidi

Una frazione dei lipidi totali (0,5 mL), concentrati con N₂, sono stati trattati con 20 mL di soluzione saponificante idroalcolica di MeOH/H₂O (4:1) con il 5% di KOH. La frazione lipidica ridisciolta nella soluzione saponificante è stata trattata al microonde (CEM) a 100°C per 30 minuti sotto agitazione. La frazione non saponificata nella soluzione è stata estratta 4 volte con 20 mL di esano. Le frazioni esaniche, sono state combinate, disidratate con solfato di sodio, filtrate ed evaporate. Il contenuto della frazione insaponificabile è stata poi quantificata per via gravimetrica.

2.12 Analisi degli esteri metilici degli acidi grassi (FAME)

La frazione idroalcolica residua derivante dal processo di estrazione della frazione non saponificabile, è stata acidificata fino a pH 1 con HCl concentrato ($\geq 37\%$) ed estratta per 3 volte con 25 mL di esano. Le frazioni esaniche, sono state combinate, essiccate con solfato di sodio, filtrate ed evaporate. Il liquido viscoso ottenuto (acidi grassi) è stata trattato con 5 mL di una soluzione metilante preparata fresca di MeOH con il 5% di HCl, in una provetta in vetro per microonde con tappo a vite in pyrex. La miscela ottenuta è stata irradiata in microonde (CEM) per 20 minuti a 80°C. Dopo il raffreddamento la miscela è stata estratta 4 volte con 20 mL di esano. Le fasi esaniche sono state quindi combinate, essiccate con solfato di sodio anidro, filtrate ed evaporate. Il processo ha prodotto un liquido viscoso giallastro (esteri metilici degli acidi grassi) che è stato pesato e conservato a -20 °C fino all'analisi GC-MS. È stata utilizzata una trappola ionica Agilent 240 Ion Trap, combinato con gascromatografo Agilent GC 7890B, la colonna utilizzata era una VF-5ms e come gas di trasporto è stato utilizzato l'elio a una portata costante di 1,0 mL min⁻¹.



3. DISCUSSIONE E RISULTATI

3.1 Analisi chimica e fisica dell'acqua di mare

Nei grafici seguenti sono indicati i parametri delle analisi chimico-fisiche delle acque di mare provenienti dall'impianto IMTA (Grafico 1-2-3).

Grafico 1. Valori misurati della temperatura (°C) dell'acqua nell'impianto IMTA registrati nell'intero periodo di sperimentazione.

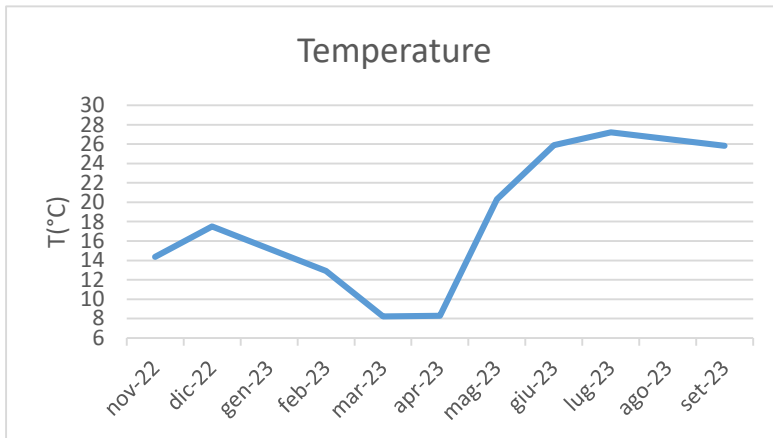


Grafico 2. Valori misurati del pH dell'acqua nell'impianto IMTA registrati nell'intero periodo di sperimentazione.

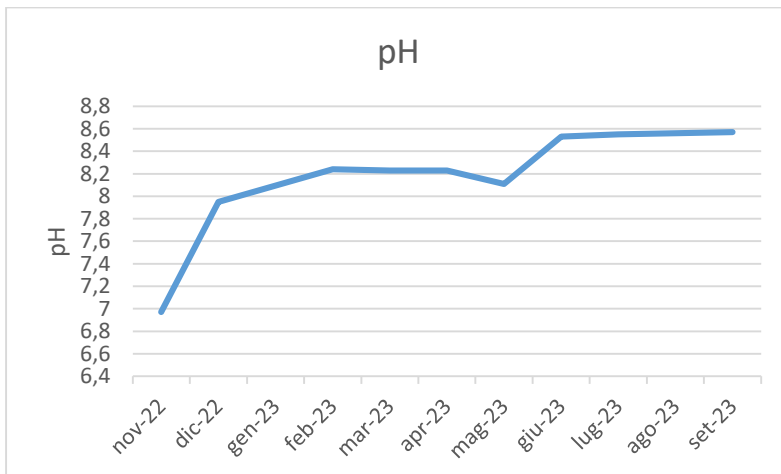
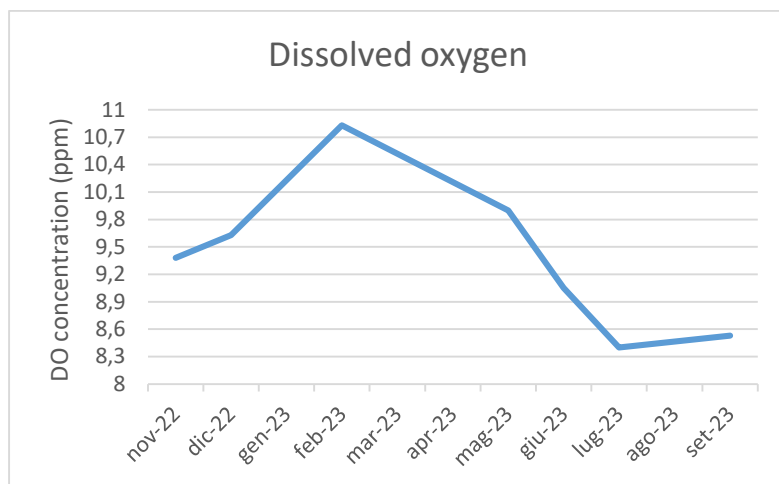




Grafico 3. Valori misurati di ossigeno disciolto (ppm) dell'acqua nell'impianto IMTA registrati nell'intero periodo di sperimentazione.



I valori della temperatura dell'acqua (T), hanno mostrato un chiaro andamento stagionale, variando da un minimo di 8,2°C a marzo 2023, fino a 27,2°C a luglio 2023 (grafico 1). I valori di pH registrati nello spazio di acqua all'interno degli impianti IMTA sono variati da un minimo di 6,97 a novembre 2022, ad un massimo di 8,57 a settembre 2023 (grafico 2). Per quanto riguarda invece i valori registrati di ossigeno disciolto (DO), variavano tra un minimo di 8,4 ppm a luglio 2023 ed un massimo di 10,83 ppm a febbraio 2023 (grafico 3).

Mentre per l'andamento del pH non è possibile osservare variazioni stagionali importanti, il contenuto di ossigeno disciolto (DO) risulta essere maggiore per temperature dell'anno più basse. Ciò è coerente con quanto ci si aspettava in quanto la solubilità dei gas in acqua è inversamente proporzionale alla temperatura.

Per quanto riguarda il contenuto di DIN (azoto inorganico disciolto), raggiungeva valori massimi nel periodo estivo a luglio (82,53 μM) e valori minimi ad aprile (14,36 μM) (grafico 4).



Grafico 4. Concentrazione di azoto inorganico disciolto (DIN) espressa in μM (micromolare) nel periodo febbraio-settembre 2023.



È noto che i bivalvi, inclusi i mitili (*Mytilus edulis*), influenzano i cicli dei nutrienti negli ecosistemi acquatici, modificando la composizione della colonna d'acqua. Il metabolismo dei mitili presenta una marcata stagionalità, con un tasso di crescita significativamente maggiore in estate rispetto all'inverno. Questo aumento del metabolismo estivo comporta un incremento del rilascio di azoto attraverso le escrezioni disciolte e un maggiore consumo di ossigeno, correlato all'aumento della biomassa e dell'attività metabolica. La temperatura si conferma quindi un fattore ambientale chiave che regola i tassi metabolici dei mitili [24].

I risultati da noi ottenuti sono coerenti con queste dinamiche. In estate, l'aumento della temperatura, e conseguentemente dell'attività metabolica dei mitili, è associato a una maggiore concentrazione di azoto inorganico disciolto (DIN) rispetto all'inverno.

3.2 Performance di crescita di *Gracilaria gracilis*

G. gracilis ha mostrato una notevole variazione nel tasso di crescita, in funzione del sistema di coltivazione impiegato all'interno del sistema IMTA (tabella 1).

Tabella 1. Tasso di crescita specifico (SGR: $\%d^{-1} \pm SD$) di *G. gracilis* in IMTA allevata utilizzando diversi sistemi di coltivazione: long-lines, ceste e lanterne con due diverse dimensioni di maglia (9 mm e 2,5 mm).



Sistema di coltivazione IMTA	SGR (% d ⁻¹) ± SD
long-lines	<0% d ⁻¹
ceste	0.62 ± 0.10 % d ⁻¹
lanterne maglia 9 mm	1.73 ± 0.12 % d ⁻¹
lanterne maglia 2,5 mm	2.36 ± 0.09 % d ⁻¹

Con il sistema basato sull'utilizzo delle longlines si osserva una crescita negativa <0%. L'utilizzo di ceste ha prodotto una crescita moderata con un SGR di 0,62 ± 0,10% d⁻¹. Un incremento significativo del tasso di crescita è stato riscontrato nelle lanterne, con valori di 1,73 ± 0,12% d⁻¹ per le lanterne a maglia da 9 mm e 2,36 ± 0,09% d⁻¹ per le lanterne con una maglia da 2,5 mm.

La notevole differenza nel tasso di crescita suggerisce che la struttura di ciascun sistema di coltivazione è determinante per la crescita dell'alga. A causa della rapida perdita di biomassa algale nelle longlines, il protocollo sperimentale è stato modificato per includere la coltivazione in lanterne. Osservazioni preliminari, effettuate circa un mese dopo l'installazione, hanno rivelato la quasi totale scomparsa dell'alga dalle longlines. Fattori biotici e abiotici, come l'azione di pascolo da parte di organismi marini, particolari condizioni idrodinamiche e ambientali, potrebbero aver compromesso la permanenza dell'alga sulle corde verticali (longlines).

Per questi motivi i sistemi di longlines, sono stati successivamente sostituiti da coltivazione della *G. gracilis* in lanterne. Anche in questo caso è stato possibile fare delle importanti osservazioni. Rispetto ai sistemi di coltivazione in ceste e in lanterne a maglia grande, la coltivazione in lanterne a maglia piccola ha dato i risultati migliori. La coltivazione in lanterna a maglia piccola ha permesso di preservare l'alga dai piccoli pascolatori marini e ha ridotto le perdite dei piccoli frammenti di alga attraverso le maglie. Inoltre, probabilmente l'uso di una maglia più stretta ha avuto l'effetto di ridurre lo stress delle condizioni idrodinamiche sulle alghe.

3.3 Caratterizzazione dell'alga *G. gracilis*

I risultati dell'analisi termogravimetrica e dell'analisi elementare condotte sui campioni di *Gracilaria gracilis*, campionati mensilmente da maggio a settembre nel sistema IMTA, sono riassunti nella Tabella 2.



Tabella 2. Analisi termogravimetrica ed elementare di *G. gracilis* campionata negli impianti IMTA nei mesi di maggio, giugno, luglio e settembre. I risultati delle analisi sono stati espressi come % di peso secco (%dw). Tutti i valori sono presentati come media (n=3) ± SD.

<i>G. gracilis</i>	Ash (%dw)	Carbon (%dw)	Hydrogen (%dw)	Nitrogen (%dw)	Sulfur (%dw)	Oxygen (%dw)
mag-23	29,4±1,27	30,09±0,04	3,9±0,50	2,9±0,002	1,79±0,16	31,92±1,37
giu-23	28,34±1,11	27,34±1,20	4,52±0,14	2,87±0,15	1,78±0,41	35,15±1,70
lug-23	29±0,96	27,42±0,50	4,38±0,03	4,59±0,08	1,68±0,34	32,98±1,14
set-23	21,22±1,61	34,87±0,16	6,29±0,12	3,81±0,02	1,75±0,18	32,06±1,63

Durante il periodo di studio, il contenuto di azoto (% peso secco) in *G. gracilis* ha mostrato una fluttuazione stagionale, variando da un minimo del 2,9% registrato a maggio a un picco del 4,59% osservato a fine luglio. Questa tendenza rivela una maggiore concentrazione di azoto nell'alga durante i mesi più caldi dell'anno.

Contrariamente a quanto riportato in letteratura per *G. gracilis* [25] cresciuta spontaneamente in laguna, dove si evidenziava un accumulo di azoto prevalente in autunno, la nostra analisi sull'alga coltivata in ambiente marino all'interno di un sistema IMTA indica una tendenza opposta, con livelli di azoto più elevati in corrispondenza dei periodi di campionamento caratterizzati da temperature maggiori. Tale incremento di azoto potrebbe essere direttamente correlato all'aumento della disponibilità di azoto inorganico disciolto (DIN) osservato nel periodo estivo, come discusso precedentemente.

3.4 Carboidrati totali

La Tabella 3 riporta il contenuto di carboidrati totali dei campioni di *Gracilaria gracilis*, campionati mensilmente da maggio a settembre nel sistema IMTA, espresso come percentuale del peso secco.



Tabella 3. Contenuto di carboidrati totali in *G. gracilis*, espresso come percentuale del peso secco. I risultati sono presentati come media (n=3) \pm deviazione standard.

<i>Gracilaria gracilis</i>	Total carbohydrates % (%dw)
mag-23	31,92 \pm 2,27
giu-23	31,35 \pm 1,75
lug-23	44,94 \pm 3,12
set-23	43,31 \pm 1.97

Il contenuto di carboidrati totali misurato durante il periodo di campionamento primaverile-estivo è risultato elevato, con le concentrazioni maggiori osservate nel mese di luglio, in concomitanza con le temperature più alte. Questi risultati sono coerenti con le osservazioni di altri studi che hanno dimostrato un maggiore accumulo di carboidrati in *Gracilaria gracilis* durante la stagione estiva.

Ad esempio, Francavilla et al. [25] hanno riportato un contenuto di carboidrati del 34,1% nel mese di aprile e del 27,5% a luglio. E. Marinho-Soriano et al. [26] hanno riscontrato una resa massima di agar da *G. gracilis* coltivata nella laguna di Thau (Mediterraneo) in primavera (30%) e minima in autunno (19%), mentre per *G. bursa-pastoris* della stessa località, la resa di agar più elevata si è osservata in estate (36%) e la più bassa in inverno (23%). Risultati simili sono stati ottenuti per *G. gracilis* della costa patagonica argentina [27] dove la resa di agar più alta si è verificata in estate (41%), seguita dalla primavera (30%) e con una diminuzione in autunno (19%) e inverno (15%). Questa tendenza supporta l'ipotesi che un maggiore contenuto di carboidrati nel periodo primaverile-estivo sia correlato a una maggiore fissazione del carbonio fotosintetico in condizioni di maggiore irradiazione e fotoperiodo più lungo.

3.5 Ficobiliproteine

La tabella 4 mostra il contenuto di ficobiliproteine dei campioni di *Gracilaria gracilis*, campionati mensilmente da maggio a settembre nel sistema IMTA.



Tabella 4. Contenuto di ficobiliproteine (alloficocianina (APC), ficocianina (PC), ficoeritrina (R-PE)) in *G. gracilis*, espresso in (mg/g dw). I risultati sono presentati come media (n=3) \pm deviazione standard.

<i>Gracilaria gracilis</i>	APC (mg/g dw)	PC (mg/g dw)	R-PE (mg/g dw)
mag-23	1,86 \pm 0,13	1,7 \pm 0,1	7,27 \pm 0,11
giu-23	2,18 \pm 0,45	1,62 \pm 0,39	7,65 \pm 0,32
lug-23	2,66 \pm 0,31	2,07 \pm 0,44	10,8 \pm 0,59
set-23	4,13 \pm 0,02	2,88 \pm 0,21	14,82 \pm 0,94

L'analisi del contenuto di ficobiliproteine in *Gracilaria gracilis* coltivata in sistema IMTA, presentata nella Tabella 4, ha rivelato una chiara tendenza all'aumento delle concentrazioni di tutte le frazioni (APC, PC, R-PE) nel corso del periodo di campionamento da maggio a settembre. In particolare, la ficoeritrina (R-PE), la ficobiliproteina più abbondante in questa specie, ha mostrato un incremento significativo, raggiungendo i valori massimi a settembre (14,82 \pm 0,94 mg/g peso secco) rispetto ai minimi registrati a maggio (7,27 \pm 0,11 mg/g peso secco).

Diverse condizioni ambientali di temperatura, intensità luminosa e disponibilità di nutrienti influenzano il contenuto di ficobiliproteine nelle alghe.

Infatti Francavilla et al. [25], avevano rilevato maggiori concentrazioni di ficobiliproteine in *G. gracilis* selvatica durante l'inverno rispetto all'estate, attribuendo tale andamento a condizioni di radiazione luminosa e disponibilità di nutrienti più favorevoli nell'ambiente lagunare invernale.

Similmente, Mona M. Ismai et al. [28] hanno osservato le variazioni stagionali dei pigmenti fotosintetici di cinque diverse alghe rosse, correlate con cambiamenti dei parametri ambientali come temperatura, salinità e nutrienti. I dati presentati indicano che i fattori ambientali, in particolare i nutrienti, hanno una correlazione positiva sul contenuto dei pigmenti, con livelli massimi raggiunti in inverno quando i nutrienti erano più abbondanti.

Vanesa Sanz et al. [29] hanno riportato concentrazioni massime di ficobiliproteine in *Mastocarpus stellatus* in ottobre/novembre, suggerendo che durante l'estate le alghe diminuiscono la produzione di pigmenti per via dell'elevata disponibilità di luce solare. Al contrario, in inverno, con meno luce disponibile, le alghe aumentano la produzione di pigmenti per massimizzare l'assorbimento della luce e garantire la loro sopravvivenza.



Fethi Mensi et al. [30] hanno testato la crescita di *Grcilaria gracilis* a due diverse profondità in due siti distinti: la laguna e la baia di Bizerte in Tunisia. Oltre alla crescita, la ricerca ha quantificato le concentrazioni di R-PE (ficoeritrina) nelle alghe coltivate. Contrariamente alla generale tendenza di una correlazione inversa tra il contenuto di R-PE e l'intensità luminosa, questo studio ha rilevato livelli più elevati di R-PE nelle alghe della baia di Bizerte. La baia presentava una maggiore trasparenza dell'acqua, il che implicava una maggiore quantità di luce incidente. Questo risultato suggerisce che, oltre all'intensità luminosa, altri fattori ambientali giocano un ruolo cruciale nella produzione di R-PE. Tasso di crescita algale, concentrazione di nutrienti, salinità sono tutti fattori che a prescindere dall'effetto della luce, incidono sulla produzione di R-PE.

Le ficobiliproteine, presenti nelle alghe rosse, assorbono la radiazione solare che viene trasmessa alle clorofille durante i processi di fotosintesi. In condizioni di luce limitante le macroalghe tendono ad aumentare il loro contenuto totale di pigmenti per ottimizzare le prestazioni fotosintetiche. Tuttavia l'azoto è un componente essenziale delle ficobiliproteine. Pertanto, anche in presenza di elevata radiazione luminosa, una maggiore disponibilità di azoto in estate può stimolare un aumento della produzione di R-PE.

Nel nostro sistema IMTA, le misurazioni della torbidità hanno indicato livelli trascurabili, suggerendo che la penetrazione della luce non è stata significativamente limitata. Pertanto, l'aumento osservato nelle concentrazioni di R-PE durante i mesi estivi non può essere primariamente attribuito a una risposta all'ombra o alla scarsità di luce.

Piuttosto, i nostri risultati suggeriscono un ruolo predominante della maggiore disponibilità di azoto durante il periodo estivo nello stimolare la produzione di R-PE in *G. gracilis* coltivata in IMTA. Questa osservazione concorda con studi precedenti [30] che sottolineano l'importanza dei nutrienti, in particolare l'azoto, come fattori chiave nella biosintesi delle ficobiliproteine nelle alghe rosse. La maggiore disponibilità di azoto, precedentemente discussa in relazione ai livelli di DIN, potrebbe aver favorito un aumento della sintesi proteica, inclusa quella delle ficobiliproteine, anche in condizioni di elevata radiazione luminosa.



3.6 Contenuto proteico, determinazione e quantificazione del profilo aminoacidico

Nel grafico e nella tabella 5 sono indicati il contenuto proteico e la composizione aminoacidica della *G. gracilis* proveniente dai sistemi di allevamento IMTA campionata nei mesi di maggio, giugno, luglio e settembre.

Grafico 5. Variazione del contenuto proteico (% peso secco) in *Gracilaria gracilis* coltivata in sistema IMTA durante i mesi di maggio, giugno, luglio e settembre 2023. I risultati sono rappresentati da barre come medie ($n=3$) \pm SD.

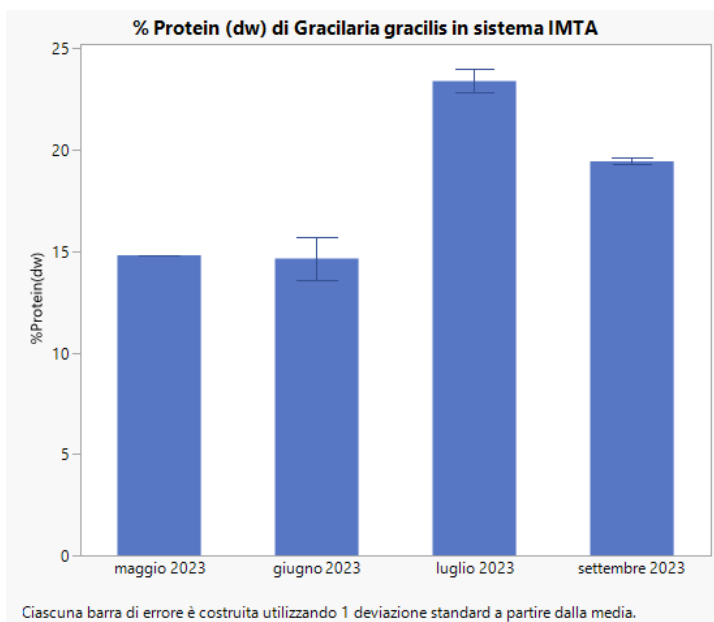




Tabella 5. Composizione aminoacidica di *G. gracilis* (espressa in mg/g di peso secco) proveniente da sistemi di allevamento IMTA, campionata nei mesi di maggio, giugno, luglio e settembre 2023. I valori sono presentati come media \pm deviazione standard (n=3). Sono inclusi il contenuto totale di aminoacidi (tot AA), il contenuto totale di aminoacidi essenziali (EAA), il contenuto totale di aminoacidi non essenziali (NEAA) e il rapporto tra aminoacidi essenziali e aminoacidi totali (EAA/tot AA %).

Aminoacid composition G.gracilis (mg/g dw)	mag-23	giu-23	lug-23	set-23
Phenilalanine	7,44 \pm 0,086	5,42 \pm 0,051	11,53 \pm 0,039	5,46 \pm 0,041
Leucine	6,27 \pm 0,023	5,51 \pm 0,024	9,09 \pm 0,062	4,98 \pm 0,002
Isoleucine	7,20 \pm 0,063	5,35 \pm 0,033	10,27 \pm 0,033	5,36 \pm 0,005
Methionine	2,43 \pm 0,017	1,61 \pm 0,020	3,18 \pm 0,010	1,59 \pm 0,013
Tyrosine	1,49 \pm 0,014	1,08 \pm 0,014	1,55 \pm 0,002	1,16 \pm 0,027
Valine	11,53 \pm 0,119	8,58 \pm 0,14	14,35 \pm 0,007	8,6 \pm 0,055
Proline	1,60 \pm 0,029	4,46 \pm 0,025	5,46 \pm 0,005	4,24 \pm 0,017
Alanine	4,4 \pm 0,002	5,49 \pm 0,051	8,72 \pm 0,089	5,77 \pm 0,048
Threonine	1,89 \pm 0,061	1,82 \pm 0,053	2,90 \pm 0,061	1,63 \pm 0,061
Glycine	3,35 \pm 0,062	1,11 \pm 0,061	5,74 \pm 0,022	2,28 \pm 0,046
Serine	5,08 \pm 0,023	4,60 \pm 0,089	7,86 \pm 0,018	5,69 \pm 0,019
Glutamic acid	2,72 \pm 0,081	7,20 \pm 0,034	5,55 \pm 0,029	7,33 \pm 0,001
Aspartic acid	2,66 \pm 0,003	12,66 \pm 0,011	9,07 \pm 0,009	12,48 \pm 0,005
Histidine	0,22 \pm 0,003	0,11 \pm 0,01	0,22 \pm 0,004	0,09 \pm 0,007
Arginine	4,71 \pm 0,006	5,41 \pm 0,023	7,13 \pm 0,059	5,76 \pm 0,004
Lysine	0,92 \pm 0,087	0,91 \pm 0,016	1,53 \pm 0,007	0,91 \pm 0,033
Cystine	3,88 \pm 0,014	3,45 \pm 0,022	4,82 \pm 0,091	4,11 \pm 0,006
tot AA	67,79 \pm 0,215	74,80 \pm 0,185	109,00 \pm 0,174	77,44 \pm 0,118
EAA	37,90 \pm 0,184	29,32 \pm 0,166	53,09 \pm 0,097	28,62 \pm 0,093
NEAA	29,89 \pm 0,140	45,48 \pm 0,083	55,91 \pm 0,151	48,81 \pm 0,090
EAA/tot AA (%)	55,90 \pm 0,32	39,20 \pm 0,24	48,70 \pm 0,13	36,96 \pm 0,18

L'analisi del contenuto proteico e della composizione aminoacidica di *G. gracilis* coltivata in sistema IMTA durante il periodo maggio-settembre ha rivelato una certa variabilità stagionale.

Il contenuto proteico (%peso secco) (grafico 5), ha mostrato un andamento con valori minimi di circa il 14% nei mesi di maggio e giugno, un aumento sostanziale a luglio (23,4%) e una successiva diminuzione a settembre (19,4%). Di conseguenza, in linea con le fluttuazioni dei livelli di azoto, il contenuto proteico ha evidenziato valori più elevati durante i mesi più caldi. Questo incremento è attribuibile alla maggiore disponibilità di azoto



inorganico disciolto, una fonte nutritiva facilmente assimilabile dalle alghe. Ricordiamo, che in questo studio, il contenuto proteico delle alghe è stato determinato moltiplicando il contenuto di azoto, ottenuto dall'analisi elementare, per il fattore di conversione da azoto a proteine di 5,1.

La composizione aminoacidica di *G. gracilis* (tabella 5) è stata influenzata dalla stagione. Tutti i campioni analizzati contenevano gli aminoacidi essenziali (ad eccezione del triptofano che viene degradato durante l'idrolisi acida). La maggior parte degli aminoacidi essenziali presenta un picco di concentrazione nel mese di luglio.

Questo picco stagionale potrebbe rendere l'alga particolarmente interessante dal punto di vista nutrizionale in quel periodo. La lisina, treonina e istidina mostrano andamenti meno pronunciati rispetto agli altri aminoacidi essenziali. Il rapporto EAA/aminoacidi totali suggerisce che nei mesi di giugno e settembre si avevano le % più basse, rispetto a maggio e luglio che mostrava i rapporti più alti. Nonostante la massima concentrazione totale di EAA a luglio, il rapporto EAA/tot AA più elevato è stato osservato a maggio, suggerendo un bilanciamento degli aminoacidi essenziali potenzialmente più favorevole in quel periodo.

Il confronto del profilo aminoacidico di *G. gracilis* (maggio-settembre) con i dati di letteratura per *G. corticata* e *G. edulis* [31] ha rivelato alcune osservazioni preliminari. Il contenuto totale di aminoacidi si è mantenuto in un intervallo comparabile tra le tre specie, sebbene *G. gracilis* abbia mostrato una notevole variabilità stagionale.

Il contenuto di EAA in *G. gracilis* a luglio è risultato considerevolmente superiore rispetto alle altre due specie, suggerendo un maggiore valore nutrizionale durante questo periodo. Tuttavia, il rapporto EAA/AA totali ha mostrato una variabilità stagionale in *G. gracilis*, con il valore più alto a maggio (0,56), simile a quello di *G. edulis* (0,54). *G. corticata* ha mostrato il rapporto più basso (0,29). L'analisi dei singoli EAA ha rivelato pattern specifici per ciascuna specie. Ad esempio, i livelli di valina, isoleucina e fenilalanina in *G. gracilis* hanno raggiunto i massimi a luglio, superando le concentrazioni nelle altre due specie. Al contrario, la treonina è risultata più abbondante in *G. edulis* in tutti i confronti. La lisina ha mostrato una relativa stabilità in *G. gracilis* durante i mesi analizzati, con valori simili a *G. corticata* ma superiori a *G. edulis*. L'istidina è rimasta a livelli bassi in tutte le specie.



L'elevata presenza di alanina in *G. corticata* è stata una caratteristica distintiva, mentre *G. gracilis* a luglio ha mostrato un aumento di serina e glicina. L'acido aspartico è risultato più concentrato in *G. corticata* e *G. edulis*.

La marcata variabilità stagionale nella composizione aminoacidica di *G. gracilis* evidenzia la necessità di considerare il periodo di raccolta per ottimizzarne il valore nutrizionale e le potenziali applicazioni biotecnologiche. Il picco di luglio rappresenta un periodo di elevata concentrazione di aminoacidi, ma il bilanciamento degli EAA potrebbe essere più favorevole in altri periodi, come suggerito dal rapporto EAA/AA totali di maggio.

3.7 Composizione in macro e micro elementi di *G. gracilis*

L'analisi della composizione minerale di *G. gracilis* campionata in quattro diversi mesi (maggio, giugno, luglio e settembre) ha rivelato una certa variabilità (Tabella 6). L'analisi del contenuto in ceneri ha mostrato una relativa stabilità nei mesi di maggio, giugno e luglio, attestandosi intorno al 28-30% del peso secco, seguita da una significativa diminuzione a settembre ($21.22 \pm 1.61\%$ peso secco). Questo valore si colloca nell'intervallo riportato per le alghe del genere *Gracilaria* (7,4-40,3% peso secco) [32] ed è inferiore al contenuto medio di ceneri per le alghe rosse in generale ($22,9 \pm 10,99$ g/100 g peso secco), un valore molto più elevato rispetto a quello riscontrato nei vegetali terrestri [33].

L'analisi ICP-OES ha quantificato la concentrazione di 30 elementi minerali nell'alga durante i quattro mesi.

La composizione minerale di *G. gracilis* esaminata in questo studio è riassunta nella tabella 6.



Tabella 6. Concentrazione di macro e microelementi in *Gracilaria gracilis* (mg/Kg peso secco) campionata nei mesi di maggio, giugno, luglio e settembre 2023. I valori sono presentati come media \pm SD (n=3). "n.a." indica che il composto non è stato rilevato al di sopra del limite di quantificazione.

Element	mag-23 (mg/Kg)	giu-23 (mg/Kg)	lug-23 (mg/Kg)	set-23 (mg/Kg)
S	21557,15 \pm 59,21	21315,84 \pm 52,76	18716,61 \pm 27,09	17855,76 \pm 22,57
Pb	n.a.	n.a.	n.a.	0,61 \pm 4,09
Mn	545,69 \pm 2,36	999,07 \pm 1,68	1619,65 \pm 1,57	3228,78 \pm 5,035
Cu	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Ti	10,49 \pm 0,34	90,65 \pm 1,56	147,14 \pm 0,62	8,64 \pm 0,08
Ag	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Si	9964,75 \pm 139,43	10520,16 \pm 234,93	13781,34 \pm 265,88	6873,45 \pm 138,71
Fe	805,01 \pm 2,50	1553,05 \pm 4,05	2134,72 \pm 3,04	768,02 \pm 1,04
Cd	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
B	230,62 \pm 2,71	225,42 \pm 1,38	229,74 \pm 1,43	191,65 \pm 1,22
Hg	6,78 \pm 0,34	6,316 \pm 0,21	5,83 \pm 0,35	5,39 \pm 0,18
Te	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Li	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Be	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Se	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
As	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Al	72,20 \pm 1,18	864,34 \pm 1,75	2534,62 \pm 9,42	664,35 \pm 2,43
Ar	1437,86 \pm 5,23	1439,61 \pm 2,37	1462,04 \pm 1,95	1481,44 \pm 1,88
Ba	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Ca	5094,83 \pm 27,42	13381,30 \pm 33,29	15475,27 \pm 8,11	14315,79 \pm 22,39
Co	n.a.	n.a.	n.a.	13,88 \pm 0,27
Cr	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
K	60312,32 \pm 153,00	56351,49 \pm 76,01	47479,15 \pm 17,19	52462,45 \pm 162,85
Mg	3806,55 \pm 14,24	3319,60 \pm 9,59	5361,10 \pm 11,31	1750,70 \pm 1,74
Na	19668,66 \pm 139,47	17648,50 \pm 39,76	19087,21 \pm 77,38	2225,27 \pm 27,99
Ni	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
P	3205,65 \pm 27,72	2694,50 \pm 18,53	2165,76 \pm 4,21	2005,07 \pm 8,37
Sr	18,14 \pm 0,31	59,97 \pm 0,30	101,58 \pm 0,30	84,85 \pm 0,12
V	3,15 \pm 0,19	5,96 \pm 0,04	7,80,46	9,03 \pm 0,17
Zn	n.a.	n.a.	n.a.	28,22 \pm 0,20

Tra i macroelementi, potassio (K), sodio (Na) e zolfo (S) hanno mostrato concentrazioni elevate e relativamente stabili. Magnesio (Mg) e calcio (Ca), pur mantenendosi a livelli elevati, hanno esibito una maggiore variabilità stagionale, con un picco nel mese di luglio.



Le concentrazioni di potassio (K) in *G. gracilis* nel nostro studio sono risultate inferiori a quelle riportate per *Laminaria digitata* e *Undaria pinnatifida*, ma superiori a *Fucus vesiculosus* e *Chondrus crispus* [34]. Rispetto a *Porphyra tenera*, i nostri valori di K sono nettamente superiori [33]. Confrontando con altre specie di *Gracilaria*, le nostre concentrazioni di K sono generalmente più elevate di quelle riportate per *G. edulis* [32, 35] e *G. manilaensis* [28], comparabili o leggermente superiori a *G. salicornia*, e molto più alte di quelle di un altro studio su *G. gracilis* [36], evidenziando una notevole variabilità intraspecifica influenzata da fattori ambientali, geografici o metodologici.

Ancora, rispetto a *G. changii* e *Euचेuma cottonii*, *G. gracilis* nella nostra analisi presenta concentrazioni di K inferiori [31]. Inoltre i bassissimi valori riportati per le alghe del Mar Rosso in uno studio specifico suggeriscono una grande variabilità geografica o di specie all'interno del gruppo [37].

Le concentrazioni di sodio (Na) in *G. gracilis* sono elevate, in linea con quanto indicato per le alghe marine commestibili [34], e si collocano nella fascia alta delle medie per le alghe asiatiche ed europee [38], superando le medie riportate per le alghe da coltivazione biologica e convenzionale [34].

Le concentrazioni di calcio (Ca) in *G. gracilis* nella nostra analisi sono generalmente elevate, in linea con l'affermazione che le alghe sono una delle fonti vegetali più importanti di calcio [39]. Superano le medie riportate per le alghe da coltivazione biologica e convenzionale [38] e le concentrazioni riportate per diverse specie di *Gracilaria* [31] [38]. Sono comparabili o leggermente inferiori al valore più alto riportato per *Codium adhaerens* [38] e inferiori al valore massimo per *Eisenia* [34]. I nostri valori sono anche superiori a quelli riportati per le alghe del Mar Rosso in uno studio specifico [37]. Le concentrazioni di magnesio (Mg) in *G. gracilis* sono risultate superiori a quelle di diverse altre alghe brune e rosse [37] e comparabili o leggermente inferiori ai valori massimi riportati per *Ulva sp.* e superiori a *Codium adhaerens* [38].

Per quanto riguarda gli altri elementi, in *G. gracilis*, il fosforo (P) ha mantenuto una certa stabilità nelle sue concentrazioni, l'alluminio (Al), al contrario, ha mostrato un comportamento più variabile, con un picco significativo durante il mese di luglio. Il ferro (Fe) ha presentato un andamento bifasico, con concentrazioni più elevate osservate nei mesi primaverili di maggio e giugno, seguite da una diminuzione a luglio e una successiva ripresa



a settembre. Questa variazione potrebbe riflettere cambiamenti nella biodisponibilità del ferro nell'ambiente circostante, influenzata da fattori come l'ossigenazione dell'acqua; oppure potrebbe essere legata alle esigenze metaboliche specifiche dell'alga durante le diverse fasi del suo ciclo di crescita, in particolare in relazione ai processi fotosintetici. Il manganese (Mn) ha esibito una tendenza all'accumulo progressivo nel corso della stagione, con le concentrazioni che aumentavano costantemente da maggio a settembre. Il boro (B) ha mantenuto concentrazioni relativamente stabili durante l'intero periodo di osservazione.

L'Alluminio (Al) è considerato un metallo in traccia e potenzialmente tossico. I livelli più alti di Al sono stati rilevati nell'alga rossa *Palmaria*, mentre i contenuti più bassi sono stati osservati in *Eisenia* [34]. Le alghe rosse tendono ad avere livelli medi più elevati rispetto alle alghe brune [34]. È interessante notare che *G. manilaensis* in uno studio [40] ha riportato valori di alluminio molto elevati in contrasto con i livelli riscontrati in altre ricerche [34]. Questa discrepanza suggerisce una forte influenza di fattori ambientali locali, come l'acidificazione dei suoli circostanti o la presenza di attività industriali [39]. La variabilità stagionale osservata in *Laminaria digitata* [41] è in linea con le fluttuazioni riscontrate in *G. gracilis*.

Ferro (Fe), manganese (Mn) e boro (B) sono microelementi essenziali. Le alghe rosse mostrano livelli medi di Fe e Mn significativamente più alti rispetto alle alghe brune, al contrario il B tende ad avere livelli più elevati rispetto le alghe rosse [34]. Tra le varie alghe *Gracilaria manilaensis*, in uno studio presentava livelli di ferro e manganese eccezionalmente elevati [32].

Per quanto riguarda l'analisi degli elementi in traccia in *Gracilaria gracilis* ha rivelato la presenza di diverse sostanze a concentrazioni generalmente basse, ma con dinamiche stagionali che meritano attenzione. Il rame (Cu) e lo zinco (Zn), pur mantenendosi a livelli contenuti, hanno mostrato una certa variabilità nel corso dei mesi, probabilmente in risposta a variazioni nella loro disponibilità ambientale. Piombo (Pb) e mercurio (Hg) sono stati rilevati solo sporadicamente e sempre in quantità minime.

In genere, in letteratura, le concentrazioni di elementi in traccia risultano altamente variabili [42]. Le alghe rosse presentano livelli medi di Cu e Zn significativamente più elevati rispetto alle alghe brune [34]. Tra le alghe brune, le Laminariales e Fucales, sono state indicate come ricche di Cu e Zn [40].



Specie come *Dictyota divaricate* [36], *Agarophyton vermiculophyllum*, e *Himanthalia elongata* [43] mostrano contenuti notevoli di zinco.

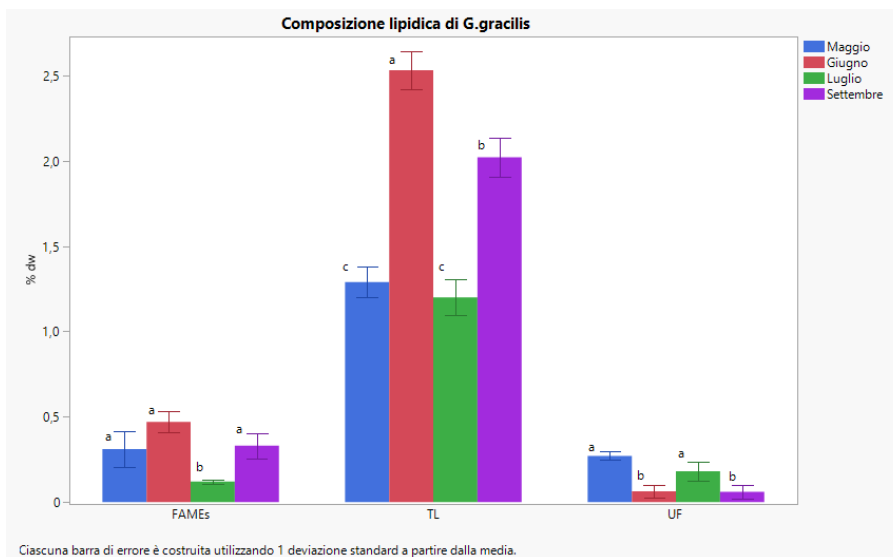
Le concentrazioni di Piombo mostrano una notevole variabilità. In uno studio, la concentrazione media di Pb nelle alghe europee era inferiore rispetto a quella delle alghe asiatiche [34]. Non sono state riscontrate differenze significative nei livelli di Pb tra alghe brune e rosse o tra metodi di coltivazione [34]. Alghe messicane contenevano piombo [34], mentre in quelle del Mar Rosso è stato rilevato solo in una specie a bassissima concentrazione [37]. Uno studio su *Gracilaria manilaensis* ha indicato variazioni stagionali con potenziali rischi di tossicità secondo le linee guida FAO/WHO [39].

Dunque le alghe presentano una composizione minerale molto variabile, influenzata da una interazione di fattori. Questi includono le caratteristiche specifiche della specie e del gruppo tassonomico, le condizioni ambientali del sito di crescita (concentrazione degli elementi nell'acqua, contaminazioni potenziali, salinità, pH, torbidità, contenuto nutrizionale e posizione geografica), la stagionalità, la fase fenologica dell'alga, le sue esigenze metaboliche e il metodo di produzione. Pertanto, il profilo di macro e microelementi delle alghe è il risultato combinato di fattori di fattori intrinseci e condizioni ambientali.

3.8 Lipidi e acidi grassi (FAME)

Il grafico 6 mostra la concentrazione in termini di lipidi totali (TL), acidi grassi (FAMES) e frazione insaponificata, estratti dall'alga.

Grafico 6. Concentrazione media (% dw) di lipidi totali (TL), esteri metilici degli acidi grassi (FAME) e frazione insaponificata (UF), estratti da *G. gracilis*. I valori rappresentano la media (n = 3), con barre di errore corrispondenti a \pm SD. Lettere diverse sopra le barre indicano differenze statisticamente significative (test di Tukey, $p < 0,05$).



La concentrazione più elevata di lipidi totali è stata registrata nel mese di giugno (2,53%), mentre i valori più bassi sono stati osservati a maggio (1,29%) e luglio (1,2%), senza differenze statisticamente significative tra questi due mesi. Una concentrazione intermedia è stata rilevata a settembre (2,02%).

È noto che la concentrazione e la composizione dei lipidi algali possa variare, oltre che in funzione della temperatura, anche in funzione della specie, della posizione geografica, delle condizioni ambientali e in funzione del ciclo biologico della stessa alga [44] [45].

Ad esempio Sansuto et al. [46], hanno riscontrato che il contenuto di lipidi totali di 15 specie di alghe marine era maggiore nelle acque più fredde rispetto quelle più calde. Francavilla et al. [47] hanno osservato in *G. gracilis* un contenuto lipidico totale più elevato in estate che in inverno. Nelson et al [48] hanno riportato che la concentrazione dei lipidi totali in altre macroalghe (*Egrecia menziesii*, *Chondracanthus canaliculatus*, *Ulva lobata*), aumentava in autunno e primavera.

Per quanto riguarda la frazione non saponificata dei lipidi totali, i valori minimi sono stati registrati a giugno e settembre (0,6%), mentre il valore massimo è stato osservato a maggio (0,27%), sebbene non statisticamente diverso da luglio (0,18%). Nel caso dei FAMES, la concentrazione maggiore è stata osservata a giugno (0,47%) anche se non statisticamente differente dai mesi di maggio e settembre (rispettivamente 0,31% e 0,33%). La concentrazione minore è stata invece rilevata a luglio (0,12%). La composizione dei FAMES in *Gracilaria*, è dettagliata nella tabella 7.



Tabella 7. Composizione degli acidi grassi (%p/p della quantità di acidi grassi totali) di *G. gracilis* campionata in quattro mesi diversi.

Name	Structure	Fatty Acid Methyl Esters %			
		Maggio	Giugno	Luglio	Settembre
Capric Acid	(C10:0)	0,04±0,41	nd	0,03±0,36	0,05±0,24
Lauric Acid	(C12:0)	0,46±0,21	0,26±0,33	0,32±0,10	0,23±0,11
Tridecanoic Acid	(C13:0)	0,04±0,52	0,99±0,52	nd	0,08±0,32
Myristic Acid	(C14:0)	6,43±0,64	7,26±0,82	4,59±0,42	6,28±0,79
Pentadecanoic Acid	(C15:0)	0,93±0,24	1,39±0,14	0,55±0,19	0,64±0,52
Palmitic Acid	(C16:0)	56,73±1,21	53,96±1,27	54,08±1,46	59,41±1,18
Palmitoleic Acid	(C16:1)	0,29±0,13	nd	0,31±0,24	0,22±0,12
Heptadecanoic Acid	(C17:0)	0,85±0,32	1,09±0,87	0,54±0,51	0,61±0,22
Stearic Acid	(C18:0)	15,30±0,58	11,96±1,24	13,05±1,49	8,90±1,16
Oleic Acid	(C18:1n9c)	2,26±0,5	1,60±0,44	10,37±0,71	8,15±0,99
Elaidic Acid	(C18:1n9t)	0,53±0,22	nd	3,19±0,66	2,76±0,30
Linoleic Acid	(C18:2n6c)	0,45±0,63	1,5±0,22	1,16±0,69	0,98±0,35
α-Linolenic Acid	(C18:3n3)	0,24±0,42	nd	nd	0,04±0,43
Arachidic Acid	(C20:0)	0,53±0,35	0,13±0,21	0,23±0,11	0,21±0,79
Cis 11,14-Eicosadienoic Acid	(C20:2)	0,65±0,23	0,12±0,41	0,24±0,39	0,21±0,62
Cis-11,14,17- Eicosatrienoic Acid	(C20:3n3)	0,52±0,25	0,24±0,13	0,60±0,25	0,32±0,13
Cis 8,11,14- Eicosatrienoic Acid	(C20:3n6)	1,72±0,52	1,57±0,41	4,60±0,85	4,45±0,81
Arachidonic Acid	(C20:4n6)	0,07±0,12	nd	1,37±0,21	0,97±0,10
Heneicosanoic Acid	(C21:0)	0,19±0,11	0,08±0,14	nd	nd
Behenic Acid	(C22:0)	0,92±0,41	0,78±0,37	0,34±0,25	0,19±0,12
Cis-13,16-Docosadienoic Acid	(C22:2)	9,94±1,12	16,51±1,46	4,01±0,96	5,01±0,85
Tricosanoic Acid	(C23:0)	0,15±0,44	0,10±0,39	0,14±0,12	0,09±0,18
Lignoceric Acid	(C24:0)	0,70±0,44	0,31±0,39	0,15±0,12	0,10±0,25
Nervonic Acid	(C24:1)	0,07±0,32	0,15±0,09	0,15±0,14	0,10±0,09
TOTAL (mg g ⁻¹ dry weight)		3,2±0,085	4,8±0,05	1,2±0,01	3,4±0,06
SFA (%w/w)		83,27±1,91	78,31±2,58	74,02±2,41	76,79±2,30
MUFA (%w/w)		3,15±0,72	1,75±1,00	14,01±1,13	11,23±1,07
PUFA (% w/w)		13,58±1,49	19,94±1,61	11,97±1,53	11,98±1,65
PUFAω6 (% w/w)		2,23±0,83	3,06±0,47	7,13±1,12	6,39±0,89
PUFAω3 (% w/w)		0,76±0,49	0,24±0,21	0,60±0,25	0,36±0,43
ω6/ω3		2,95	12,76	11,92	17,62

In tutti i mesi analizzati, gli acidi grassi saturi (SFA) rappresentano la frazione predominante, con valori compresi tra il 74,02% (luglio) e l'83,27% (maggio).

Tra gli SFA, l'acido palmitico (C16:0), si conferma il principale costituente, con valori superiori al 50% in tutti i campioni, seguito da miristico (C14:0) e stearico (C18:0).



Questi dati sono coerenti con quelli riportati da uno studio su nove specie di *Gracilariaceae*, dove il contenuto medio di SFA era $44,18 \pm 21,02\%$, con il palmitico come acido più abbondante ($47,83 \pm 26,16\%$) [49].

I MUFA (acidi grassi monoinsaturi) mostrano un andamento stagionale variabile. I valori più bassi sono stati rilevati nei mesi di maggio (3,15%) e giugno (1,75%), mentre si osserva un netto aumento a luglio (14,01%) e settembre (11,23%), principalmente dovuto all'incremento dell'acido oleico (C18:1n9c), che a luglio raggiunge il 10,37%. L'acido oleico risulta essere il MUFA predominante, in linea con quanto riportato in altri studi sull'alga *Gracilaria gracilis* [50] [51].

Il contenuto totale di PUFA (acidi grassi polinsaturi) ha raggiunto il valore massimo a giugno (19,94%), con una predominanza dell'acido docosadienoico, presente in quantità elevate in tutti i mesi considerati. Tra gli omega-6, l'acido linoleico (C18:2n6c), l'eicosatrienoico (C20:3n6) e l'acido arachidonico (C20:4n6) sono risultati più abbondanti nei mesi di luglio e settembre, mentre concentrazioni significativamente inferiori sono state riscontrate a maggio e giugno. Gli omega-3, come l'acido α -linolenico (C18:3n3) e l'eicosatrienoico (C20:3n3), invece, mostrano concentrazioni molto basse in tutti i campioni analizzati.

La composizione dei FAMES è fortemente influenzata dalla stagione e quindi dalla temperatura ambientale. In genere, temperature più basse portano ad un aumento degli acidi grassi insaturi suggerendo che la presenza di questi acidi grassi aiuti a mantenere la fluidità delle membrane vegetali nei mesi più freddi [48]. Questo tipo di meccanismo viene definito "adattamento omeoviscoso", ottenuto tramite modifiche strutturali come l'insaturazione, ramificazione, ciclizzazione o la riduzione della lunghezza delle catene degli acidi grassi [52]. Anche l'intensità luminosa risulta essere un fattore cruciale nella composizione lipidica: un'elevata irradianza può portare a una composizione più ricca in acidi grassi saturi [53].

Dal punto di vista nutrizionale, l'OMS raccomanda che il rapporto tra acidi grassi ω -6 e ω -3 non superi il valore di 10 [54]. Sebbene le alghe siano generalmente considerate una fonte equilibrata con rapporti ω -6/ ω -3 inferiori a 10 [55], nel nostro studio questo requisito è rispettato solo a maggio (2,95). Nei mesi successivi, il rapporto aumenta significativamente, raggiungendo 17,62 a settembre, suggerendo una riduzione più marcata degli ω -3 rispetto agli ω -6.



Nel complesso, i risultati evidenziano come la composizione lipidica di *G. gracilis* coltivata in sistema IMTA vari durante i campionamenti effettuati, sia in termini quantitativi che qualitativi. Queste variazioni influenzano il profilo nutrizionale e funzionale dell'alga e hanno rilevanti implicazioni per il suo utilizzo in ambito biotecnologico, dove la composizione lipidica può determinare la destinazione d'uso delle biomasse.

4 Conclusioni

Lo studio effettuato ha quindi evidenziato il potenziale della coltivazione dell'alga autoctona, *Gracilaria gracilis*, in sistemi di acquacoltura multitrofica integrata (IMTA), in combinazione con ostriche e mitili. I risultati sperimentali dimostrano come la scelta del sistema di coltivazione sia determinante per la crescita algale: le lanterne a maglia di 2,5 mm si sono rivelate essere il sistema più efficace, portando ai tassi di crescita più elevati, fornendo anche protezione all'alga da stress e predatori.

Le analisi biochimiche hanno rivelato una certa variabilità nella composizione dell'alga in termini di contenuto di ficobiliproteine, carboidrati, aminoacidi, lipidi e minerali, in funzione dei fattori ambientali e del metabolismo dell'alga stessa, confermando *G. gracilis* come una fonte promettente di nutrienti e composti bioattivi.

Inoltre, l'uso dell'alga in sistemi IMTA rigenerativi rappresenta un'opportunità concreta per promuovere una gestione più sostenibile delle risorse marine, contribuendo al miglioramento della qualità dell'acqua attraverso il sequestro di nutrienti in eccesso, in linea con i principi dell'economia circolare, rafforzando inoltre il legame tra innovazione scientifica e supporto per le comunità delle piccole aree costiere, aprendo la strada alla valorizzazione di *G. gracilis* come risorsa multifunzionale.



5. Bibliografia

1. European Commission. (2022). *Commission staff working document - Blue Bioeconomy - Towards a Strong and Sustainable EU Algae Sector* (SWD (2022) 361 final).
2. European Commission. (2021). *Communication from the commission to the European Parliament, the council, the European economic and social committee and the committee of the regions - Strategic guidelines for a more sustainable and competitive EU aquaculture for the period 2021 to 2030* (COM/2021/236 final).
3. Wanchao Li, Zhuangzhuang Du, Xianbao Xu, Zhuangzhuang Bai, Jie Han, Meng Cui, Daoliang Li. (2024). A review of aquaculture: From single modality analysis to multimodality fusion. *Computers and Electronics in Agriculture*. Volume 226.
4. Campanati, C., Willer, D., Schubert, J., & Aldridge, D. C. (2021). Sustainable Intensification of Aquaculture through Nutrient Recycling and Circular Economies: More Fish, Less Waste, Blue Growth. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 30(2), 143–169.
5. European Commission. (2021). *Communication from the commission to the European Parliament, the council, the European economic and social committee and the committee of the regions – On a new approach for a sustainable blue economy in the EU Transforming the EU's Blue Economy for a Sustainable Future* (COM/2021/240 final).
6. Holdt, S.L., Edwards, M.D (2014). Cost-effective IMTA: a comparison of the production efficiencies of mussels and seaweed. *Journal of Applied Phycology* 26, 933–945.
7. Carlos Sanz-Lazaro, Pablo Sanchez-Jerez (2020). Regional Integrated Multi-Trophic Aquaculture (RIMTA): Spatially separated, ecologically linked. *Journal of Environmental Management*, Volume 271.
8. Jacopo Borghese, Adriana Giangrande, Daniele Arduini, Roberta Trani, Lorenzo Doria, Marco Anglano, Lucia Rizzo, Sergio Rossi (2025). Influence of an innovative IMTA system (Mediterranean Sea, Italy) on environmental and biological parameters: Seasonal analysis. *Aquaculture*. Volume 596 (Part 1).



9. Max Troell, Alyssa Joyce, Thierry Chopin, Amir Neori, Alejandro H. Buschmann, Jian-Guang Fang (2009). Ecological engineering in aquaculture – Potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine offshore systems. *Aquaculture*, Volume 297 (1–4), 1-9.
10. Liu, C., Liu, G., Cristiano, S., Ulgiati, S., Xu, L., & Yang, Z. (2024). Investigating potential ecological benefits from mariculture. *Earth's Future*, 12.
11. Roleda, M. Y., & Hurd, C. L. (2019). Seaweed nutrient physiology: application of concepts to aquaculture and bioremediation. *Phycologia*, 58(5), 552–562.
12. Cotas, J., Leandro, A., Pacheco, D., Gonçalves, A. M. M., & Pereira, L. (2020). A Comprehensive Review of the Nutraceutical and Therapeutic Applications of Red Seaweeds (Rhodophyta). *Life*, 10(3), 19.
13. Farghali, M., Mohamed, I. M. A., Osman, A. I., & Rooney, D. W. (2022). Seaweed for climate mitigation, wastewater treatment, bioenergy, bioplastic, biochar, food, pharmaceuticals, and cosmetics: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 21(1), 97–152.
14. Torres, M. D., Flórez-Fernández, N., & Domínguez, H. (2019). Integral Utilization of Red Seaweed for Bioactive Production. *Marine Drugs*, 17(6), 314.
15. Cian, R. E., Drago, S. R., De Medina, F. S., & Martínez-Augustin, O. (2015). Proteins and Carbohydrates from Red Seaweeds: Evidence for Beneficial Effects on Gut Function and Microbiota. *Marine Drugs*, 13(8), 5358-5383.
16. Torres, M.D., Kraan, S. & Domínguez, H (2019). Seaweed biorefinery. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 18, 335–388.
17. Veeragurunathan, V., Prasad, K., Vizhi, J. M., Singh, N., Meena, R., & Mantri, V. A. (2019). *Gracilaria debilis* cultivation, agar characterization and economics: bringing new species in the ambit of commercial farming in India. *Journal of Applied Phycology*, 31(4), 2609–2621.
18. Mouedden Rajae, Abdellaoui Souad, El Madani Faid, El Ouamari Najib, Slimani Douaa, Kasmi Khaoula, Taibi Mohamed, Zahir Ilham, Chaabane Khalid (2024). *Gracilaria gracilis* – A Review of Ecological Knowledge, Chemical Composition, Cultivation, and Applications. *Ecological Engineering & Environmental Technology*. Vol 25, iss 1. 276–287.
19. Francavilla, M., Franchi, M., Monteleone, M., & Caroppo, C. (2013). The Red Seaweed *Gracilaria gracilis* as a Multi Products Source. *Marine Drugs*, 11(10), 3754-3776.



20. Kursar, T.A.; van der Meer, J.; Alberte, R.S (1983). Light harvesting system of red alga *Gracilaria tikvahiae*. I. biochemical analyses of pigment mutations. *Plant Physiology*, 73, 353–360.
21. Angell, A. R., Mata, L., De Nys, R., & Paul, N. A. (2015). The protein content of seaweeds: a universal nitrogen-to-protein conversion factor of five. *Journal of Applied Phycology*, 28(1), 511–524.
22. Hempel, N., Petrick, I. & Behrendt, F (2012). Biomass productivity and productivity of fatty acids and amino acids of microalgae strains as key characteristics of suitability for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 24, 1407–1418.
23. Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917.
24. Jansen HM, Strand Ø, Strohmeier T, Krogness C, Verdegem M, Smaal A (2011). Seasonal variability in nutrient regeneration by mussel *Mytilus edulis* rope culture in oligotrophic systems. *Marine Ecology Progress Series* 431,137-149.
25. Francavilla, M., Franchi, M., Monteleone, M., & Caroppo, C. (2013). The Red Seaweed *Gracilaria gracilis* as a Multi Products Source. *Marine Drugs*, 11(10), 3754-3776.
26. Marinho-Soriano, E., & Bourret, E. (2003). Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Bioresource Technology*, 90(3), 329–333.
27. Martín, L.A., Rodríguez, M.C., Matulewicz, M.C., Fissore, E.N., Gerschenson, L.N. and Leonardi, P.I. (2013). Agar from Patagonian *G. gracilis*. *Phycological Research*, 61: 163-171.
28. Ismail, M. M., & Osman, M. E. H. (2016). Seasonal fluctuation of photosynthetic pigments of most common red seaweeds species collected from Abu Qir, Alexandria, Egypt. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 51(3), 515–525.
29. Sanz, V., Torres, M. D., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2023). Seasonal and spatial compositional variation of the red algae *Mastocarpus stellatus* from the Northern coast of Portugal. *Journal of Applied Phycology*, 35, 419–431.
30. Mensi, F., Nasraoui, S., Bouguerra, S., Ksouri, R., & El Hachimi, M. L. (2020). Effect of lagoon and sea water depth on *Gracilaria gracilis* growth and biochemical composition in the northeast of Tunisia. *Scientific Reports*, 10, 10014.



31. Rosemary, T., Arulkumar, A., Paramasivam, S., Mondragon-Portocarrero, A., & Miranda, J. M. (2019). Biochemical, Micronutrient and Physicochemical Properties of the Dried Red Seaweeds *Gracilaria edulis* and *Gracilaria corticata*. *Molecules*, *24*(12), 2225.
32. Gamero-Vega, G., Palacios-Palacios, M., & Quitral, V. (2020). Nutritional composition and bioactive compounds of red seaweed: A mini-review. *Journal of Food and Nutrition Research*, *8*(8), 431-440.
33. Álvarez-Viñas, M., Flórez-Fernández, N., Torres, M. D., & Domínguez, H. (2019). Successful approaches for a red seaweed biorefinery. *Marine drugs*, *17*(11), 620.
34. Rupérez, P. (2002). Mineral content of edible marine seaweeds. *Food chemistry*, *79*(1), 23-26.
35. Sakthivel, R., & Devi, K. P. (2015). Evaluation of physicochemical properties, proximate and nutritional composition of *Gracilaria edulis* collected from Palk Bay. *Food chemistry*, *174*, 68-74.
36. Rasyid, A., Ardiansyah, A., & Pangestuti, R. (2019). Nutrient composition of dried seaweed *Gracilaria gracilis*. *Indonesian Journal of Marine Sciences*, *24*(1), 1-6.
37. Osman, N. A., El-Manawy, I. M., & Amin, A. S. (2011). Nutritional composition and mineral content of five macroalgae from red sea. *Egyptian Journal of Phycology*, *12*(1), 89-102.
38. Rubio, C., Napoleone, G., Luis-González, G., Gutiérrez, A. J., González-Weller, D., Hardisson, A., & Revert, C. (2017). Metals in edible seaweed. *Chemosphere*, *173*, 572-579.
39. Cabrita, A. R., Maia, M. R., Oliveira, H. M., Sousa-Pinto, I., Almeida, A. A., Pinto, E., & Fonseca, A. J. (2016). Tracing seaweeds as mineral sources for farm-animals. *Journal of applied phycology*, *28*, 3135-3150.
40. Aroyehun, A. Q., Palaniveloo, K., Ghazali, F., Rizman-Idid, M., & Abdul Razak, S. (2019). Effects of seasonal variability on the physicochemical, biochemical, and nutritional composition of Western Peninsular Malaysia *Gracilaria manilaensis*. *Molecules*, *24*(18), 3298.
41. Schiener, P., Black, K. D., Stanley, M. S., & Green, D. H. (2015). The seasonal variation in the chemical composition of the kelp species *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina latissima* and *Alaria esculenta*. *Journal of applied phycology*, *27*, 363-373.



42. Sánchez-Rodríguez, I., Huerta-Díaz, M. A., Choumiline, E., Holguin-Quinones, O., & Zertuche-González, J. A. (2001). Elemental concentrations in different species of seaweeds from Loreto Bay, Baja California Sur, Mexico: implications for the geochemical control of metals in algal tissue. *Environmental Pollution*, 114(2), 145-160.
43. Afonso, C., Correia, A. P., Freitas, M. V., Baptista, T., Neves, M., & Mouga, T. (2021). Seasonal changes in the nutritional composition of Agarophyton vermiculophyllum (Rhodophyta, Gracilariales) from the center of Portugal. *Foods*, 10(5), 1145.
44. Jaworowska, A., & Murtaza, A. (2022). Seaweed derived lipids are a potential anti-inflammatory agent: a review. *International journal of environmental research and public health*, 20(1), 730.
45. Djoundi, A. R., Morançais, M., Mossion, A., Ragueneau, E., Rabesaotra, V., Faraso, H. R., Ramanandraibe, V. V., & Dumay, J. (2025). Seasonal Variation in the Biochemical Composition and Fatty Acid Profiles of the Red Alga *Halymenia durvillei* from Ngazidja (Comoros). *Molecules*, 30(6), 1232
46. Susanto, E., Fahmi, A. S., Hosokawa, M., & Miyashita, K. (2019). Variation in lipid components from 15 species of tropical and temperate seaweeds. *Marine drugs*, 17(11), 630.
47. Francavilla, M., Franchi, M., Monteleone, M., & Caroppo, C. (2013). The red seaweed *Gracilaria gracilis* as a multi products source. *Marine drugs*, 11(10), 3754-3776.
48. Nelson, M. M., Phleger, C. F., & Nichols, P. D. (2002). Seasonal lipid composition in Macroalgae of the Northeastern Pacific Ocean. *Botanica Marina*, 45(1).
49. Jaworowska, A., & Murtaza, A. (2022). Seaweed derived lipids are a potential anti-inflammatory agent: a review. *International journal of environmental research and public health*, 20(1), 730.
50. Capillo, G., Savoca, S., Costa, R., Sanfilippo, M., Rizzo, C., Lo Giudice, A., Albergamo, A., Rando, R., Bartolomeo, G., Spanò, N., & Faggio, C. (2018). New Insights into the Culture Method and Antibacterial Potential of *Gracilaria gracilis*. *Marine Drugs*, 16(12), 492.
51. Rasyid, A., Ardiansyah, A., & Pangestuti, R. (2019). Nutrient composition of dried seaweed *Gracilaria gracilis*. *Indonesian Journal of Marine Sciences*, 24(1), 1-6.
52. Neidleman, S. L. (1987). Effects of temperature on lipid unsaturation. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 5(1), 245-268.



53. Olofsson, M., Lamela, T., Nilsson, E., Bergé, J. P., Del Pino, V., Uronen, P., & Legrand, C. (2012). Seasonal variation of lipids and fatty acids of the microalgae *Nannochloropsis oculata* grown in outdoor large-scale photobioreactors. *Energies*, 5(5), 1577-1592.
54. Burlingame, B., Nishida, C., Uauy, R., & Weisell, R. (2009). Fats and fatty acids in human nutrition. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 55(1/3), 5-7.
55. Rocha, C. P., Pacheco, D., Cotas, J., Marques, J. C., Pereira, L., & Gonçalves, A. M. (2021). Seaweeds as valuable sources of essential fatty acids for human nutrition. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(9), 4968.



Capitolo 3. OTTIMIZZAZIONE DELL'ESTRAZIONE SEQUENZIALE DI FICOBILIPROTEINE E AGAR DA *Gracilaria gracilis*: APPROCCIO INTEGRATO PER UNA BIORAFFINERIA SOSTENIBILE

Prefazione

Il presente capitolo descrive un approccio sostenibile per la valorizzazione della macroalga rossa *Gracilaria gracilis*, mediante l'ottimizzazione dell'estrazione sequenziale di due composti ad alto valore aggiunto: ficobiliproteine e agar. Per l'estrazione delle ficobiliproteine sono stati confrontati metodi convenzionali (come macerazione e omogeneizzazione) con tecnologie innovative, quali la sonicazione con sonda e i sistemi acquosi bifasici (ATPS), privilegiando l'uso di solventi acquosi e condizioni a basso impatto energetico. L'estrazione dell'agar è stata invece effettuata mediante tecnologia a microonde (MAE). L'R-ficoeritrina (R-PE) è stata quantificata in diverse condizioni operative, evidenziando l'efficacia della macerazione manuale e della sonicazione ottimizzata previa pre-trattamento della biomassa. Parallelamente, l'estrazione dell'agar mediante MAE è stata condotta sulla biomassa residua post-estrazione proteica, valutando l'effetto delle variazioni di temperatura e tempo sull'efficienza del processo. I risultati ottenuti dimostrano la fattibilità di un approccio integrato e sostenibile per la valorizzazione delle alghe, promuovendo un uso multifunzionale della biomassa algale.



1. Introduzione

Le alghe sono il gruppo filogeneticamente più diversificato di organismi pluricellulari. In quanto specie chiave degli ecosistemi marini, il loro ruolo è essenziale per la loro struttura e il loro funzionamento [1] [2].

Le alghe sono in grado di fornire servizi ecosistemici, definiti dal Millenium Ecosystem Assessment (MEA) come i “guadagni che gli esseri umani ottengono dagli ecosistemi”, sia economici che non economici [3].

I servizi ecosistemici delle alghe sono stati riassunti da João Cotas et al., [3], raggruppandoli in:

-servizi di supporto negli ecosistemi marini. Le alghe contribuiscono alla formazione dei sedimenti, alla protezione delle coste dall'erosione e influenzano il ciclo dei nutrienti. Inoltre tramite il processo di fotosintesi producono carbonio organico e ossigeno, essenziali per la vita e i cicli biologici;

-servizi di regolazione. Le alghe sono fondamentali nella lotta ai cambiamenti climatici in quanto sono in grado di assorbire CO₂, contrastare l'acidificazione degli oceani e la deossigenazione. Agiscono come barriere fisiche riducendo i fenomeni di erosione e come biofiltri per la purificazione dell'acqua;

-servizi di fornitura, che riguardano principalmente i prodotti che l'uomo ottiene dalle alghe come cibo, mangime per animali, applicazioni come fertilizzanti, biocarburanti, biochemicals e prodotti farmaceutici;

-servizi culturali, in quanto possiedono un elevato valore culturale testimoniato da costruzioni storiche e ricette oltre ad essere un importante strumento educativo per introdurre all'ecologia marina e sensibilizzare sull'argomento.

Le alghe, oltre ad essere una risorsa per l'ambiente, costituiscono anche una ricca e diversificata fonte di composti bioattivi con svariate potenziali applicazioni, dipendenti anche dal loro specifico gruppo tassonomico.

Le alghe possono essere principalmente classificate in tre gruppi, in base alla loro pigmentazione: alghe brune (*Phaeophyceae*), verdi (*Chlorophyta*) e rosse (*Rhodophyta*) [4][5]. La diversità filogenetica delle alghe si traduce in una vastità di composti bioattivi, che a loro volta aprono a differenti ambiti applicativi a seconda del gruppo considerato.



Clorofilla a e b sono i pigmenti principali che donano il colore caratteristico alle alghe verdi [6], la fucoxantina è responsabile del colore caratteristico delle alghe brune [7], mentre le alghe rosse risultano ricche in ficoeritrine che conferiscono la tipica colorazione rossa [5].

Tra le specie algali più coltivate al mondo troviamo le alghe del genere *Gracilaria* spp. (17,3%) [8]. Il genere *Gracilaria* è classificato all'interno del phylum Rhodophyta (alghe rosse), nella classe Florideophyceae, nell'ordine Gracilariales e nella famiglia Gracilariaceae [9].

Tra le alghe del genere *Gracilaria* più studiate rientra anche *Gracilaria gracilis* [8].

Il ciclo vitale di *Gracilaria gracilis* alterna una generazione diploide (tetrasporofito e carposporofito) a una generazione aploide (gametofito), con la produzione di spore (tetraspore e carpospore) che mediano il passaggio tra le fasi, garantendo la riproduzione sessuale dell'alga [10].

Grazie alla sua composizione biochimica è stata definita da Francavilla et al. [11], come “Multi Product Source”, in quanto risulta essere una fonte di composti bioattivi preziosi come ficobiliproteine, carboidrati, lipidi e acidi grassi, polifenoli, aminoacidi simili alle micosporine e fitormoni.

1.1 Ficobiliproteine

Le ficobiliproteine sono pigmenti fotosintetici con la funzione di catturare la luce. Sono presenti nei cianobatteri, in diversi gruppi di alghe eucariotiche, criptomonadi e glaucofite. Queste cromoproteine hanno il compito di raccogliere l'energia solare nelle regioni dello spettro visibile, in un intervallo di lunghezza d'onda compreso tra 495 e 650 nm, e trasferire questa energia di eccitazione alla clorofilla nella membrana fotosintetica [12]. Le ficobiliproteine sono proteine idrosolubili intracellulari, localizzate sui granuli della superficie esterna delle membrane dei tilacoidi delle alghe rosse, la cui estrazione è dunque favorita dal danneggiamento cellulare [13]. In base alle proprietà spettrali vengono suddivise in: ficoeritrina, (λ_{max} 540-570 nm), ficocianina (λ_{max} 610-620 nm) e alloficocianina (λ_{max} 650-655 nm) [14] [15]. Sono composte da due subunità polipeptidiche α e β che contengono le ficobiline, cromofori tetrapirrolici, a cui le ficobiliproteine sono legate covalentemente [5]. Le ficobiliproteine, trovano in *G. gracilis* una fonte primaria di estrazione. Queste biomolecole non solo offrono alternative naturali come coloranti nei settori alimentare e cosmetico, ma si distinguono anche in ambito farmaceutico grazie alle loro proprietà



antiossidanti, antinfiammatorie e anticancro. Inoltre, la loro caratteristica fluorescenza le rende strumenti di grande valore nella ricerca biomedica e diagnostica, dove possono essere impiegate come sonde ottiche e marcatori proteici in tecniche elettroforetiche [9] [13].

1.2 Polisaccaridi

Nel metabolismo algale, i carboidrati rivestono un ruolo essenziale, costituendo il substrato energetico primario per i processi respiratori e metabolici [16]. Tra i polisaccaridi contenuti nelle alghe rosse, l'agar risulta essere quello più abbondante. Anche se l'agar di migliore qualità viene estratto dalle alghe del genere *Gelidium*, la necessità di fonti di agar ha portato allo sfruttamento anche delle alghe del genere *Gracilaria* [17]. Per via dei gruppi solfati le specie del genere *Gracilaria* producono un agar di bassa qualità, tuttavia un trattamento di idrolisi alcalino è in grado di aumentare la forza del gel [18]. L'agar, derivato dalle alghe rosse, è un polisaccaride strutturale delle pareti cellulari. È costituito principalmente da agarosio e agaropectina. L'agarosio, costituito da D-galattosio e 3,6-anidro-L-galattosio legati da legami α -1,3- e β -1,4-glicosidici, costituisce la parte gelificante del polisaccaride, l'agaropectina, costituita da unità di galattosio sostituite con esteri solfati, gruppi metilici o piruvati, contribuisce alle proprietà addensanti [19] [20]. L'agar trova largo impiego sia nell'industria alimentare, in qualità di agente addensante, sia in microbiologia. Parallelamente, studi emergenti ne evidenziano la versatilità per applicazioni innovative quali la formulazione di biopolimeri degradabili [21], la formulazione di biofilm attivi per il packaging alimentare [22], e diverse applicazioni mediche [23].

1.3 Lipidi e acidi grassi

Le alghe rosse non sono note per il loro elevato contenuto in termini di lipidi. Alcuni studi identificano il contenuto di lipidi in *Gracilaria gracilis* pari allo 0,19% [15]. Per altre specie del genere *Gracilaria* è stato riportato un contenuto di 1,07% per *G. arcuate*, 1,47% per *G. salicornia* [15], 0,88% per *G. turuturu* [24]. Francavilla et al. [11], avevano riportato una variazione stagionale in termini di contenuto lipidico di *Gracilaria gracilis* tra 1,19% e 1,98%. In un altro studio, il contenuto totale di lipidi in *G. gracilis* variava tra l'1,37% e il 3,58% sulla base della profondità della coltivazione [9].

Il contenuto lipidico delle alghe varia in base alla specie, alla stagione, posizione geografica e temperatura [25].



Nonostante l'abbondanza di acido palmitico caratterizzi il contenuto lipidico dell'alga [24], lo studio del profilo completo degli acidi grassi è di particolare interesse. Le alghe sono in grado di sintetizzare omega3, omega6, acidi grassi polinsaturi (PUFA), come EPA e DHA che generalmente derivano da pesci marini, acidi grassi altamente insaturi (HUFA), così come acidi grassi monoinsaturi (MUFA) [26] [27]. Nello specifico sono stati identificati 31 composti di acidi grassi metilici esteri (FAMES) in *Gracilaria*, con una significativa variazione tra le stagioni analizzate [11]. Le alghe possono quindi rappresentare un'ottima alternativa alle risorse ittiche, come fonte alternativa di PUFA per mantenere e migliorare l'equilibrio tra omega-3 e omega-6 essenziale per la salute, per lo sviluppo del sistema nervoso e la prevenzione delle malattie cardiovascolari [28].

1.4 Polifenoli

Come risposte a fattori da stress biotici e abiotici, le alghe sono in grado di sintetizzare una vasta gamma di metaboliti secondari, tra cui i composti fenolici. I fenoli principalmente presenti nelle alghe rosse risultano essere i bromofenoli, flavonoidi, acidi fenolici e terpenoidi fenolici [29]. Grazie alle loro riconosciute proprietà antiossidanti, antinfiammatorie, antibatteriche e antitumorali, le alghe trovano un impiego crescente nei settori farmaceutico e nutraceutico [30] [31].

1.5 Aminoacidi simili alle micosporine (MAAs)

Gli aminoacidi simili alle micosporine (MAAs) sono composti solubili in acqua, a basso peso molecolare, con un assorbimento massimo compreso tra 310 e 360 nm, composti da un anello di cicloesenone o cicloesenina, con il sostituito azotato di un aminoacido [32]. Questi composti sono stati identificati per la prima volta nei funghi e le alghe *Rhodophyta* ne possiedono la più alta concentrazione [28] [33]. Questo gruppo di composti vengono sintetizzati principalmente tramite il percorso dell'acido shikimico [34]. I MAAs vengono sintetizzati in risposta ad un'elevata intensità di radiazioni fotosinteticamente attive e radiazioni ultraviolette, come meccanismo di protezione solare negli organismi marini [35]. Grazie alla loro struttura, i MAAs sono sempre più studiati per differenti impieghi come filtri solari per le loro proprietà anti-UV [36], oltre ad avere proprietà antiossidanti, antivirali, antinfiammatorie, antitumorali e anti-invecchiamento [37].



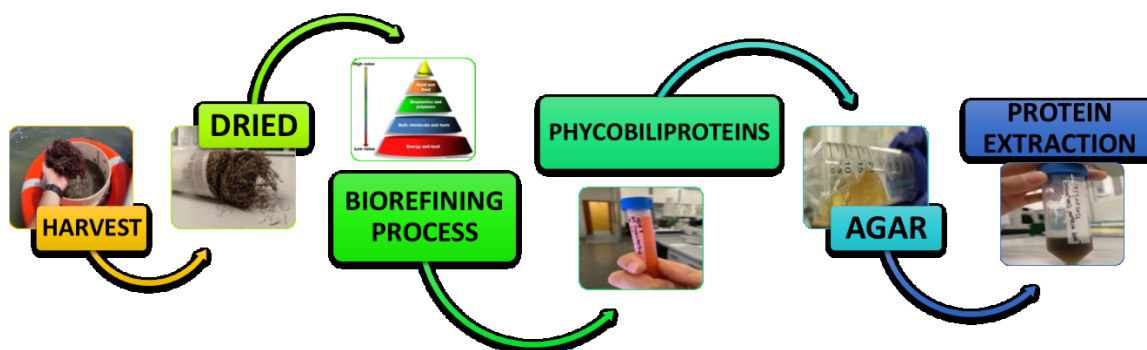
1.6 Fitormoni

I regolatori della crescita delle piante (PGR) sono un gruppo eterogeneo di piccole molecole naturali che, grazie alla loro diversità strutturale, esercitano un controllo su tutti i processi di sviluppo vegetale, agendo efficacemente anche a basse concentrazioni [38]. Le principali classi di PGR algali vengono identificate in gibberelline, citochinine, acido abscissico e auxine. Ai PGR viene riconosciuta una attività biostimolante in quanto la loro applicazione mira a migliorare la resistenza allo stress, morfologia, raccolta, resa e qualità delle colture [39].

Quindi, come evidenziato, la macroalga *Gracilaria gracilis* si configura come una fonte polifunzionale di composti bioattivi di elevato interesse. Tra questi, le ficobiliproteine emergono come molecole ad alto valore aggiunto, con un mercato globale stimato in crescita da 0,13 miliardi di dollari a circa 0,63 miliardi entro il 2032 (CAGR del 21,3%), trainato dalla crescente domanda di ingredienti clean-label nel settore alimentare (Report della Business Research insights: <https://www.businessresearchinsights.com/it/market-reports/phycobilioprotein-market-105145>). Tuttavia, i costi di produzione elevati e la complessità dell'estrazione di ficobiliproteine pure ne limitano attualmente la diffusione. Anche l'agar, grazie alle sue proprietà multifunzionali, costituisce un mercato in espansione (CAGR del 4%, raggiungendo circa 0,50 miliardi di dollari nel 2032) (<https://www.businessresearchinsights.com/market-reports/agar-market-112131>). Tuttavia, la potenziale scarsità di biomassa algale da cui estrarlo impone una gestione oculata di questa risorsa. I metodi tradizionali di estrazione degli idrocolloidi, come la macerazione in acqua calda [40] [41] [42], sono notoriamente lunghi e dispendiosi dal punto di vista energetico. Per superare questi limiti, la ricerca attuale si concentra sullo sviluppo di tecnologie estrattive innovative, mirate a migliorare l'efficienza dei processi e ad aumentare la resa di composti ad alto valore aggiunto.

Alla luce del valore della macroalga *Gracilaria gracilis*, lo scopo di questo studio è stato quello di definire un metodo efficiente e sequenziale per l'estrazione di ficobiliproteine e agar, secondo l'approccio tipico della bioraffineria (Figura 1). La ricerca si è articolata nella selezione e ottimizzazione del metodo di estrazione delle ficobiliproteine, attraverso il confronto tra tecniche convenzionali e innovative, e nell'incremento della resa di agar mediante estrazione assistita da microonde applicata alla biomassa algale residua.

Figura 1. Schema del processo di bioraffineria per l'estrazione sequenziale di ficobiliproteine e agar dalla macroalga *Gracilaria gracilis*.



2. MATERIALI E METODI

Per le esigenze sperimentali, *Gracilaria gracilis* è stata campionata dalla laguna di Lesina in due periodi distinti: luglio 2021 e giugno 2023. L'alga fresca prelevata è stata trasportata tempestivamente in laboratorio e lavata per la rimozione di epifite e corpi estranei. La biomassa così pulita è stata liofilizzata a -80°C per 5 giorni, macinata per ottenere una polvere sottile e conservata in contenitori sigillati a -18°C .

2.1 Caratterizzazione della biomassa

Gracilaria gracilis è stata caratterizzata in termini di proximate analysis e analisi elementare. Le proximate analysis sono state eseguite con un analizzatore termogravimetrico TGA 701 (LECO), con il metodo ASTM D7582. L'analisi elementare dei campioni (C, H, N, S e O) è stata ottenuta con il metodo LECO-ASTM-D 5291, eseguito con un analizzatore elementare CHNS-LECO 628. La % di O è stata calcolata indirettamente come percentuale complementare alla somma della percentuale di ciascun elemento e del contenuto di ceneri.

2.2 Solventi di estrazione

I solventi utilizzati per le estrazioni sono stati acqua distillata e tampone acido acetico-acetato di sodio 1M preparato con acido acetico e acetato di sodio acquistati da Sigma-Aldrich.



2.3 Procedura di estrazione delle ficobiliproteine

Sono stati valutati diversi metodi estrattivi mantenendo costanti le condizioni operative principali: tempo di trattamento, numero di cicli estrattivi e rapporto biomassa:solvente. I metodi testati sono stati classificati come "convenzionali" (macerazione e omogeneizzazione) e "innovativi" (bagno ad ultrasuoni e sonda ad ultrasuoni).

2.3.1 Macerazione

La sospensione di biomassa/solvente è stata macinata con mortaio e pestello. Una quantità di 0,5 g di biomassa liofilizzata sono stati macinati manualmente per 90 secondi con pestello e mortaio dopo essere stati sospesi in 10 mL di solvente. Dopo l'estrazione la miscela è stata trasferita in falcon per centrifuga a 4 °C ,5.000 giri per 10 minuti. Il surnatante è stato accuratamente raccolto e il pellet è stato sottoposto a tre ulteriori cicli di estrazione, seguendo la stessa procedura. I surnatanti combinati hanno raggiunto un volume finale di 30 mL. Questo protocollo di estrazione "convenzionale" è stato inizialmente adottato per valutare l'efficacia di due diversi solventi (acqua distillata e tampone acetato) nell'estrazione dei pigmenti target (tabella 1).

2.3.2 Omogeneizzatore

La sospensione biomassa/solvente è stata omogeneizzata utilizzando un omogeneizzatore Ultra-Turrax a due diverse velocità: 8.000 e 17.000 rpm. Anche in questo caso una quantità di 0,5 g di biomassa liofilizzata, macinata fino ad ottenere una polvere sottile, è stata sospesa in 10 mL di solvente e sottoposta al processo di omogeneizzazione per 90 secondi, testando separatamente entrambe le velocità. Dopo l'estrazione la miscela è stata trasferita in provette e centrifugata a 4 °C ,5.000 giri per 10 minuti. Il surnatante è stato raccolto e il pellet è stato ri-estratto per tre cicli, seguendo la stessa procedura di omogeneizzazione e centrifugazione (tabella 1).

2.3.3 Bagno ad ultrasuoni

La sospensione di biomassa liofilizzata (0,5 g in 10 mL di solvente) è stata sottoposta a sonicazione a 40 KHz in un bagno a ultrasuoni (FALC) raffreddato, per tre cicli, con una durata totale equiparabile agli altri trattamenti estrattivi. Successivamente, la miscela è stata centrifugata, il surnatante raccolto e il pellet ri-estratto per tre volte con la stessa procedura di sonicazione e centrifugazione (tabella 1).



2.3.4 Sonda a ultrasuoni

La sospensione di biomassa/solvente è stata sottoposta al trattamento con una sonda a ultrasuoni (Hielscher Ultrasonics) immersa in un bagno di ghiaccio per prevenire il surriscaldamento della biomassa durante il processo. Al fine di ottimizzare l'efficienza dell'estrazione, sono stati sistematicamente variati e valutati diversi parametri, tra cui il tempo di sonicazione, il numero di cicli di estrazione, il tempo di pre-trattamento e il duty cycle (tabella 2a-b-c).

2.3.5 Estrazione con sistema acquoso bifasico (ATPS)

È stato valutato anche l'impiego di un sistema acquoso a due fasi (ATPS). Il sistema acquoso a due fasi (ATPS) è una tecnica di frazionamento liquido-liquido sempre più apprezzata per la sua efficacia nell'estrazione, separazione e purificazione di diverse biomolecole, tra cui proteine, enzimi, virus, acidi nucleici e membrane. Pur essendo un sistema altamente versatile, il comportamento della partizione coinvolto nel metodo è complesso e difficile da prevedere [43]. Nel nostro studio, il sistema ATPS utilizzato era composto da acqua ed etilacetato, con la selezione dei solventi guidata dai principi della chimica verde. Il sistema è stato progettato con un approccio "one-pot", ovvero in modo da consentire l'estrazione simultanea di più composti in un singolo passaggio. Questo approccio presenta numerosi vantaggi: riduce i tempi di lavorazione, semplifica le fasi operative, limita l'uso di solventi e la produzione di rifiuti, e migliora la riproducibilità, riducendo la complessità del processo. Nei test sperimentali, le ficobiliproteine sono state estratte nella fase acquosa, mentre la fase in etilacetato risultava arricchita in lipidi. Sono stati quindi applicati i diversi metodi estrattivi precedentemente analizzati (macerazione manuale, omogeneizzazione meccanica, bagno a ultrasuoni), utilizzando come mezzo solvente il sistema bifasico. Le ficobiliproteine sono state quantificate nella fase acquosa, mentre nella frazione in etilacetato è stato valutato il contenuto totale di lipidi.

2.4 Quantificazione delle ficobiliproteine

Le ficobiliproteine (identificate come R-ficoeritrina (R-PE), ficocianina (PC) e alloficocianina (APC)) sono state quantificate mediante spettrofotometria secondo Kursar et al. (1983) [44]. L'assorbanza dei surnatanti acquosi è stata determinata a 498,5 nm, 614,0 nm e 651,0 nm. I contenuti di APC, PC e R-PE sono stati quindi calcolati, espressi in mg/g di biomassa, utilizzando le seguenti equazioni (1):



$$APC=181.3A_{651} - 22.3A_{614}$$

$$PC=151.1A_{614} - 99.1A_{651}$$

$$R-PE = 155.8A_{498.5} - 40.0A_{614} - 10.5A_{651}$$

(1)

Tuttavia, nelle analisi successive, le considerazioni sono state formulate esclusivamente sulla base della R-PE, in quanto rappresenta il pigmento principale presente in *G. gracilis*.

I dettagli relativi alle condizioni operative di estrazione applicate per ciascun metodo sono riassunti nelle tabelle 1, 2 e 3.

Tabella 1. Condizioni operative per i diversi metodi di estrazione testati su *G. gracilis*. (Parametri: tipo di solvente, rapporto biomassa/solvente, durata del ciclo, numero di cicli, campione di biomassa).

METODO DI ESTRAZIONE	Solvente	Rapporto biomassa/solvente e (w/vol ratio)	Tempo per ciclo(s)	N cicli estrattivi	biomassa
macerazione manuale	acqua	1/10	90	3	lug-21
	tampone acetato	1/10	90	3	
macerazione manuale	acqua	1/20	90	3	giu-24
ultrasuoni	acqua	1/20	90	3	
ultraturrex 8.000 rpm	acqua	1/20	90	3	
ultraturrex 17.000 rpm	acqua	1/20	90	3	

Tabella 2. Parametri testati per l'ottimizzazione dell'estrazione con sonda a ultrasuoni.

A) Valutazione dell'effetto del tempo di trattamento e del duty cycle (%). Condizioni operative: duty cycle=50 e 100%, ampiezza=100%, rapporto solido/liquido=1/20 (w/v), n cicli estrattivi=1.

Time(s)	Duty Cycle(%)	Amplitude(%)	S/L (w/vol ratio)	N Cicli
30	100	100	1/20	1
60	100	100	1/20	1
120	100	100	1/20	1
180	100	100	1/20	1
30	50	100	1/20	1
60	50	100	1/20	1
120	50	100	1/20	1
180	50	100	1/20	1



B) Valutazione dell'effetto del numero di cicli estrattivi sull'efficienza di estrazione. Condizioni operative: duty cycle=50 e 100%, ampiezza=100%, rapporto solido/liquido=1/20 (w/v), n cicli estrattivi=3.

Time(s)	Duty Cycle(%)	Amplitude(%)	S/L (w/vol ratio)	N Cicli
30	100	100	1/20	3
45	100	100	1/20	3
60	100	100	1/20	3
30	50	100	1/20	3
45	50	100	1/20	3
60	50	100	1/20	3

C) Effetto del pre-trattamento manuale sull'efficienza dell'estrazione con sonda ultrasuoni. Condizioni operative: tempo di trattamento=45 s, duty cycle=50 e 100%, ampiezza=100%, rapporto solido/liquido=1/20 (w/v), n cicli estrattivi=1 e 3.

Time(s)	Duty Cycle(%)	Amplitude(%)	S/L (w/vol ratio)	PRE-TRATTAMENTO (s)	N CICLI
45	100	100	1/20	300	1
45	50	100	1/20	300	1
45	100	100	1/20	300	3
45	50	100	1/20	300	3

Tabella 3. Confronto tra diversi metodi di estrazione utilizzando il sistema acquoso bifasico (ATPS). Condizioni operative: solvente = sistema ATPS (acqua/etilacetato), rapporto solido/liquido = 1/10 (w/v).

METODO DI ESTRAZIONE	Solvente	S/L (w/vol ratio)	Time(s)	N cicli estrattivi	biomassa
Macerazione manuale	ATPS	1/10	90	3	lug-21
Bagno ultrasuoni	ATPS	1/10	300	3	
Ultraturrex 17.000 rpm	ATPS	1/10	90	3	

2.5 Estrazione dell'agar mediante estrazione assistite da microonde (MAE)

Il residuo solido ottenuto dopo l'estrazione delle ficobiliproteine è stato utilizzato per l'estrazione dell'agar, secondo un approccio integrato e sostenibile. Per questa fase, è stato adottato il metodo estrattivo ottimizzato da Francavilla et al. [45], basato sull'estrazione assistita da microonde (MAE). Questo metodo è stato scelto in quanto consente di ridurre significativamente i tempi di lavorazione (10 minuti contro i 90 minuti richiesti dai metodi convenzionali), garantendo al contempo una buona qualità dell'estratto.



In linea con l'obiettivo di industrializzare un processo efficiente e semplice, si è deciso di non sottoporre la biomassa a pre-trattamento alcalino, così da mantenere intatto l'agar nativo e valutare il rendimento estrattivo in condizioni minimamente invasive. Le estrazioni assistite da microonde (MAE) sono state eseguite in un MARS configurato con un carosello a 12 posizioni. La biomassa umida (partendo da 1 g di biomassa liofilizzata prima dell'estrazione delle ficobiliproteine) è stata trasferita in un recipiente di estrazione in teflon contenente 20 mL di acqua distillata; quindi il recipiente è stato chiuso dopo l'introduzione di una sonda in fibra ottica per misurare la temperatura nei sistemi. I parametri operativi impiegati nell'apparato MAE sono stati i seguenti: potenza del magnetron 100%, tempo di rampa della temperatura, 5 min. Durante il funzionamento, sia la temperatura che la pressione sono state monitorate in un singolo recipiente (recipiente di controllo). Una prima fase sperimentale ha avuto lo scopo di valutare l'influenza dell'estrazione precedente delle ficobiliproteine sulla resa di agar. Successivamente, è stata avviata un'ottimizzazione dei parametri operativi (tempo e temperatura) per massimizzare l'estrazione del polisaccaride. I dettagli sperimentali delle condizioni testate sono riportati nella Tabella 4.

Tabella 4. Combinazioni di tempo e temperatura testate per ottimizzare la resa di agar da *G. gracilis*.

TEMPO (min)	TEMPERATURA (°C)
10	100
10	120
10	140
15	100
15	120
15	140
20	100
20	120
20	140

2.6 Analisi statistiche

I dati sono presentati come medie \pm deviazioni standard (SD), delle tre repliche (n=3). In questi esperimenti, le differenze significative ($p < 0,05$) tra le medie sono state determinate mediante analisi della varianza unidirezionale (ANOVA) con test post-hoc di Tukey e test t a due campioni, utilizzando il software Jmp 16 pro.



3. DISCUSSIONE E RISULTATI

3.1. Analisi termogravimetrica ed analisi elementare di *G. gracilis*

I risultati delle analisi termogravimetrica ed elementare condotte sui campioni di *Gracilaria gracilis* raccolti nei mesi di luglio 2021 e giugno 2024 sono riportati nella Tabella 5. I dati sono espressi come percentuale in peso secco (%dw) e rappresentano la media di tre replicati ($n = 3$) \pm deviazione standard.

Tabella 5. Composizione elementare e contenuto in ceneri di *G. gracilis* campionata in due stagioni. (L-21 = campione raccolto a luglio 2021; G-24= campione raccolto a giugno 2024.)

<i>G. gracilis</i>	Ash (%dw)	Carbon (%dw)	Hydrogen (%dw)	Nitrogen (%dw)	Sulfur (%dw)	Oxigen (%dw)
L-21	32,31 \pm 2,12	25,05 \pm 0,91	3,38 \pm 0,14	2,66 \pm 0,19	0,78 \pm 0,15	35,85 \pm 2,32
G-24	26,3 \pm 0,82	31,53 \pm 0,56	4,96 \pm 0,08	3,1 \pm 0,03	1,4 \pm 0,42	32,71 \pm 1,08

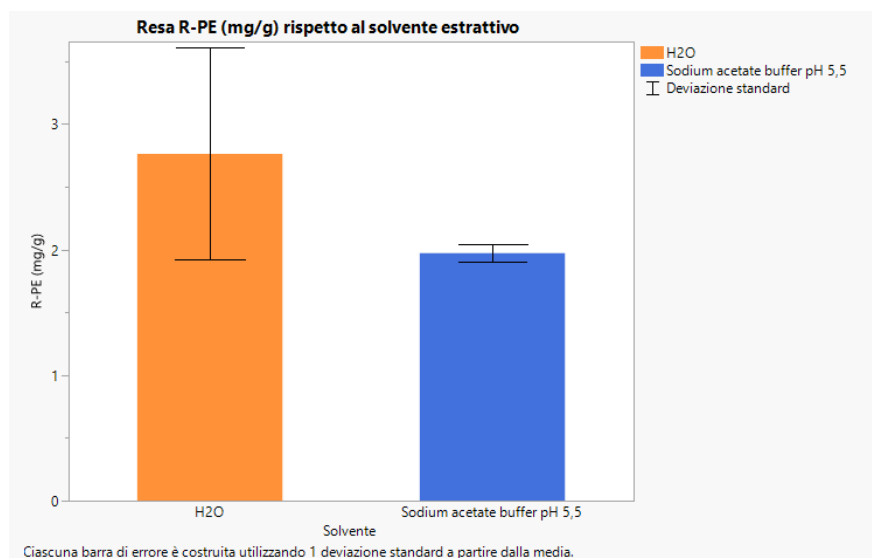
Il contenuto e la composizione delle ficobiliproteine sono influenzati da diversi fattori ambientali, tra cui luce, temperatura e pH, ma in modo particolare dalla disponibilità di azoto. I risultati ottenuti dalle prove di estrazione mostrano differenze nella resa di ficobiliproteine tra i due campioni analizzati. In particolare, il campione G-24 (giugno 2024) ha evidenziato una resa maggiore, in corrispondenza di un contenuto di azoto più elevato rispetto al campione L-21 (luglio 2021), caratterizzato invece da livelli inferiori di N. Questa osservazione è coerente con quanto riportato in letteratura: le ficobiliproteine agiscono come riserva intracellulare di azoto. Quando l'azoto è disponibile in eccesso, l'alga lo immagazzina sotto forma di questi pigmenti; al contrario, in condizioni di carenza, le ficobiliproteine vengono degradate per rilasciare l'azoto necessario ai processi metabolici e alla crescita [46] [47] [48].

3.2 Confronto tra solventi per l'estrazione di ficoeritrina (R-PE)

La selezione del metodo e del solvente più opportuno è un passaggio fondamentale per ottenere i composti desiderati. In una fase preliminare dello studio, è stata valutata l'efficacia di due solventi — acqua distillata e tampone acetato — applicati al metodo di macerazione manuale con pestello e mortaio. Sono state riportate solo le rese estrattive della R-ficoeritrina (R-PE), in quanto principale pigmento presente in *Gracilaria gracilis*. Le prove sono state condotte sul campione L-21 (luglio 2021) in triplicato ($n = 3$).

I risultati, riportati nel Grafico 1, mostrano una resa media di $2,76 \pm 0,68$ mg/g di R-PE utilizzando acqua distillata, rispetto a $1,97 \pm 0,06$ mg/g ottenuti con tampone acetato.

Grafico 1. Resa di R-ficoeritrina (mg/g) ottenuta da *G. gracilis* (L-21) con due solventi. Media \pm DS (n = 3). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata rilevata tra i due trattamenti ($p > 0,05$, test t di Student).

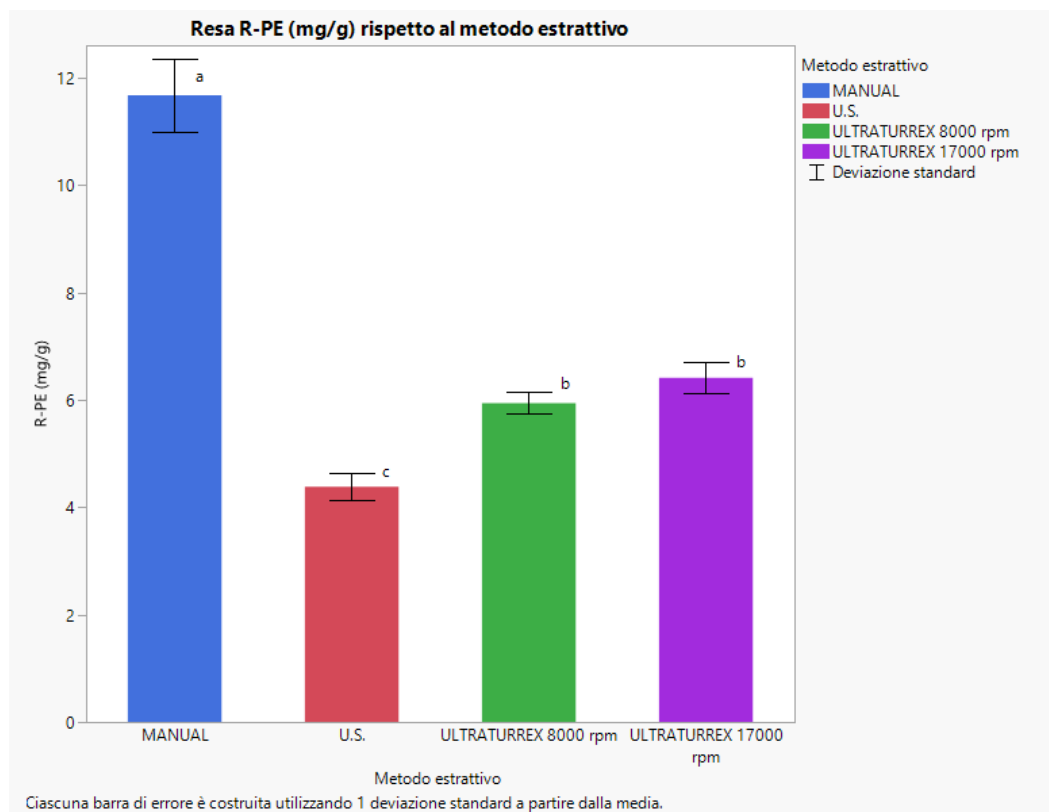


Sebbene l'acqua distillata abbia fornito una resa media superiore, l'analisi statistica mediante test t di Student non ha evidenziato una differenza significativa tra i due solventi ($p > 0,05$). Pertanto, in virtù di questi risultati, si è scelto di proseguire le successive prove utilizzando solo acqua distillata, privilegiandola per la sua eco-compatibilità, economicità e maggiore semplicità operativa, in linea con i principi della chimica verde.

3.3 Confronto tra metodi per l'estrazione dell'R-PE

Nel confronto tra le diverse tecniche estrattive, è stata impiegata l'acqua distillata come unico solvente, in linea con i criteri di sostenibilità e semplicità operativa. I test sono stati condotti sul campione G-24 (giugno 2024), mantenendo costanti i parametri operativi: tempo di trattamento (90 s), numero di cicli (3) e rapporto biomassa/solvente di 1/20 (w/v). I risultati ottenuti sono rappresentati nel grafico 2. Le medie dei gruppi sono state confrontate statisticamente mediante test di Tukey's HSD, considerando significative le differenze con $p < 0,01$.

Grafico 2. Resa di R-ficoeritrina (mg/g) ottenuta con diversi metodi di estrazione. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative ($p < 0,01$, test HSD di Tukey).



Il metodo di macerazione manuale con pestello e mortaio ha prodotto la resa più elevata di R-PE ($11,68 \pm 0,68$ mg/g), significativamente superiore rispetto agli altri trattamenti. Il metodo meno efficace è risultato essere il bagno a ultrasuoni, con una resa di $4,45 \pm 0,12$ mg/g. L'estrazione mediante Ultra-Turrax ha fornito risultati intermedi: $5,91 \pm 0,36$ mg/g alla velocità di 8.000 rpm e $6,65 \pm 0,24$ mg/g a 17.000 rpm, senza differenze statisticamente significative tra le due condizioni.

Questi dati sono coerenti con quelli riportati in letteratura, come nel caso dello studio di Tatiana Pereira et al. [12], che hanno confrontato diverse tecniche di estrazione, tra cui macerazione manuale e bagno a ultrasuoni. Anche nel loro studio, le rese più elevate di ficoeritrina (R-PE) sono state ottenute tramite macerazione, con un valore massimo di 3,58 mg/g in condizioni ottimali (10 minuti di trattamento, 10 minuti di omogeneizzazione e un rapporto biomassa/buffer di 5). Per quanto riguarda il bagno a ultrasuoni, la resa registrata da Pereira et al. è stata inferiore (1,88 mg/g), nonostante tempi di trattamento più lunghi (17,5 minuti per l'omogeneizzazione e 7,5 minuti di sonicazione), con un rapporto biomassa/solvente di 2,8.

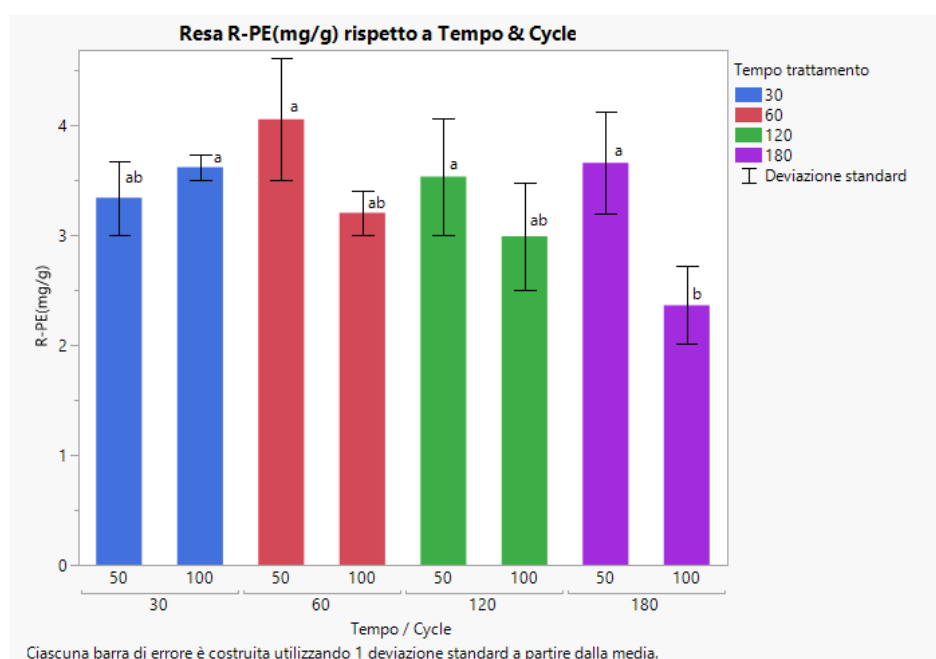


Questi dati confermano la tendenza osservata anche nel presente studio: l'estrazione manuale si dimostra più efficace, probabilmente per la sua capacità di rilasciare delicatamente i pigmenti senza comprometterne l'integrità, a differenza delle tecniche più invasive che possono determinare la degradazione parziale delle ficobiliproteine.

3.4 Estrazione con sonda ultrasuoni

Rispetto al bagno ad ultrasuoni tradizionale, la sonda ad ultrasuoni offre una cavitazione molto più intensa e localizzata grazie all'immersione diretta della sonda nel campione liquido [49]. Per identificare le condizioni ottimali di estrazione della R-ficoeritrina (R-PE), sono stati studiati gli effetti combinati di diversi parametri operativi, tra cui tempo di trattamento, duty cycle (%) e numero di cicli estrattivi. I risultati dello studio sono riassunti nei grafici sottostanti (grafico 3(a),3(b) e 3(c)).

Grafico 3(a). Resa di R-ficoeritrina (R-PE) espressa in mg/g di biomassa secca in funzione del tempo di trattamento (30, 60, 120, 180 s) e del duty cycle (50% e 100%), utilizzando sonda a ultrasuoni in un singolo ciclo di estrazione. Le barre rappresentano la media \pm deviazione standard ($n = 3$). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi ($p < 0,01$; test post-hoc di Tukey).



I risultati presentati nel grafico 3(a) evidenziano l'influenza combinata del tempo di trattamento e del duty cycle di sonicazione sulla resa di R-PE (mg/g).



I dati evidenziano un andamento della resa con un picco a 60 s, seguito da un calo per tempi più lunghi (120s e 180s). Questo comportamento è osservabile in entrambe le condizioni di cycle (50% e 100%). Le rese massime sono state ottenute con:

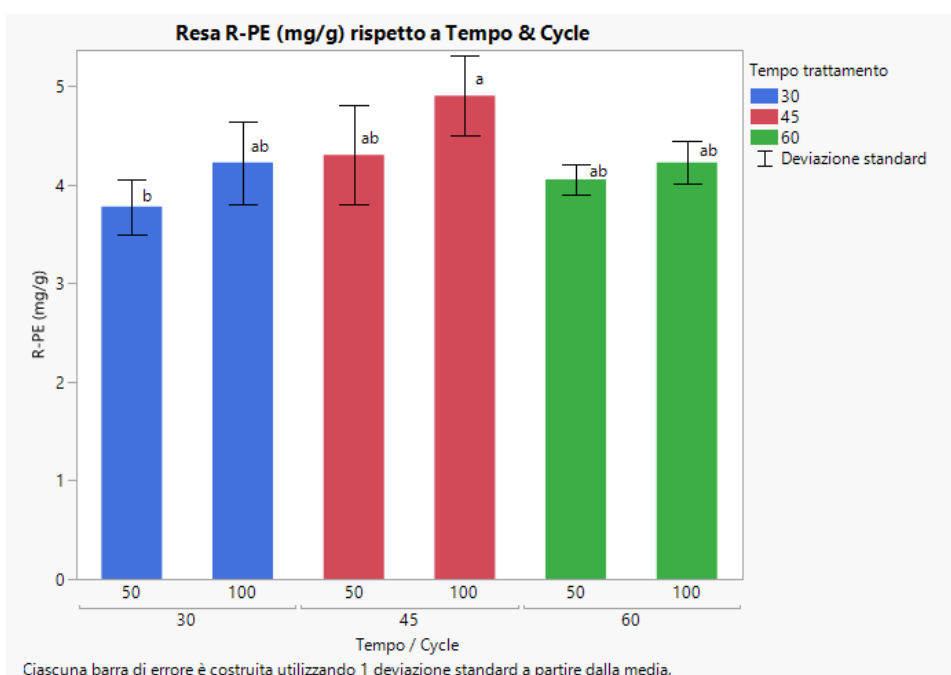
-60 s / 50% duty cycle: 4,0 mg/g;

-30 s / 100% duty cycle: 3,6 mg/g.

Tuttavia, non sono emerse differenze statisticamente significative tra questi due trattamenti ($p > 0,05$). La riduzione della resa dopo 60 s è probabilmente dovuta a un effetto di degradazione del R-PE in seguito all'esposizione prolungata alle onde ultrasoniche.

Determinato che il range ottimale di tempo per l'estrazione dell'R-PE dalla biomassa è tra i 30 e i 60 secondi. Per approfondire l'effetto del numero di cicli estrattivi, è stata condotta una seconda serie di prove con tre cicli di sonicazione. I dati, riportati nel grafico 3(b), mostrano l'evoluzione della resa in funzione del tempo (30, 45 e 60 s) e del duty cycle (50% e 100%).

Grafico 3(b). Resa di R-ficoeritrina (R-PE) espressa in mg/g di biomassa secca in funzione del tempo di trattamento (30, 45 e 60 s) e del duty cycle (50% e 100%), utilizzando sonda a ultrasuoni per 3 cicli di estrazione. Le barre rappresentano la media \pm deviazione standard ($n = 3$). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi ($p < 0,01$; test post-hoc di Tukey).



Ciascuna barra di errore è costruita utilizzando 1 deviazione standard a partire dalla media.



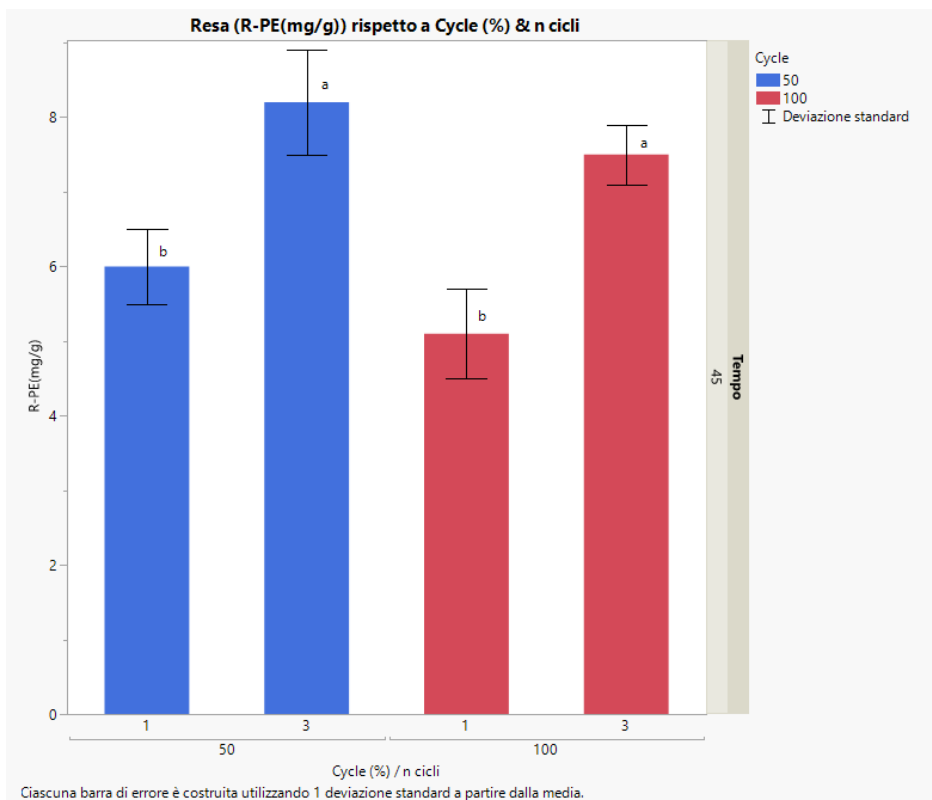
Nel grafico 3(b), l'incremento del numero di cicli estrattivi ha portato a un miglioramento della resa. La resa più elevata di R-PE (4,9 mg/g), coerentemente a quanto affermato in precedenza è ottenuta con un trattamento di 45 s e un duty cycle al 100%. La resa minore si ottiene quando la biomassa viene trattata per 30 s con un duty cycle al 50% (3,77 mg/g). Ciò conferma che trattamenti troppo brevi, a bassa intensità, non sono sufficienti per una estrazione completa. Il *duty cycle* di sonicazione influenza la resa, ma il suo effetto non è sempre lineare e dipende dal tempo di trattamento. In generale, un *duty cycle* più elevato (100%) tende a favorire una resa maggiore, soprattutto nei tempi di trattamento più brevi o intorno al tempo ottimale. Tuttavia, è importante considerare che un *duty cycle* più elevato implica una maggiore intensità di sonicazione per unità di tempo, il che potrebbe contribuire alla degradazione del pigmento a tempi più lunghi (come suggerito dal calo della resa nel grafico 3(a) a 180 secondi e 100% di cycle).

Dopo aver individuato i parametri ottimali per l'estrazione dell'R-PE è stata valutata anche l'influenza del pre-trattamento sulla resa estrattiva. Il pre-trattamento consisteva nella rottura della biomassa con mortaio e pestello, senza l'aggiunta di solvente, seguita dall'imbibizione della biomassa con il solvente estraente per 300 secondi. Successivamente, il campione è stato sottoposto al trattamento con sonda ultrasuoni.

I risultati ottenuti da questo set di esperimenti sono riportati nel grafico 3(c).



Grafico 3(c). Resa di R-ficoeritrina (R-PE) espressa in mg/g di biomassa secca, in funzione del duty cycle (50% in blu, 100% in rosso) e del numero di cicli estrattivi (1 e 3), dopo pre-trattamento meccanico della biomassa. Il trattamento è stato effettuato con sonda a ultrasuoni per 45 secondi per ciclo. Le barre rappresentano la media \pm deviazione standard ($n = 3$). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi ($p < 0,01$; test post-hoc di Tukey).



La resa più elevata (8,2 mg/g) è stata ottenuta con il pre-trattamento, utilizzando un ciclo di sonicazione di 45 secondi, un duty cycle del 50% e tre cicli estrattivi. L'aumento del numero di cicli ha determinato un incremento significativo della resa, sia con duty cycle al 50% (da circa 6,0 a 8,2 mg/g) che al 100% (da circa 5,2 a 7,4 mg/g), confermando quanto osservato negli esperimenti precedenti, dove i trattamenti in tre cicli si erano già dimostrati più efficaci rispetto al ciclo singolo.

L'effetto del duty cycle risulta meno evidente. Con un solo ciclo, un duty cycle inferiore (50%) sembra leggermente più favorevole, sebbene la differenza rispetto al 100% non sia statisticamente significativa. Quando il numero di cicli aumenta a tre, le differenze tra i due livelli di duty cycle si riducono ulteriormente e risultano anch'esse non significative.



Questo suggerisce che, al crescere del numero di cicli, il ruolo del duty cycle tende a diminuire in importanza.

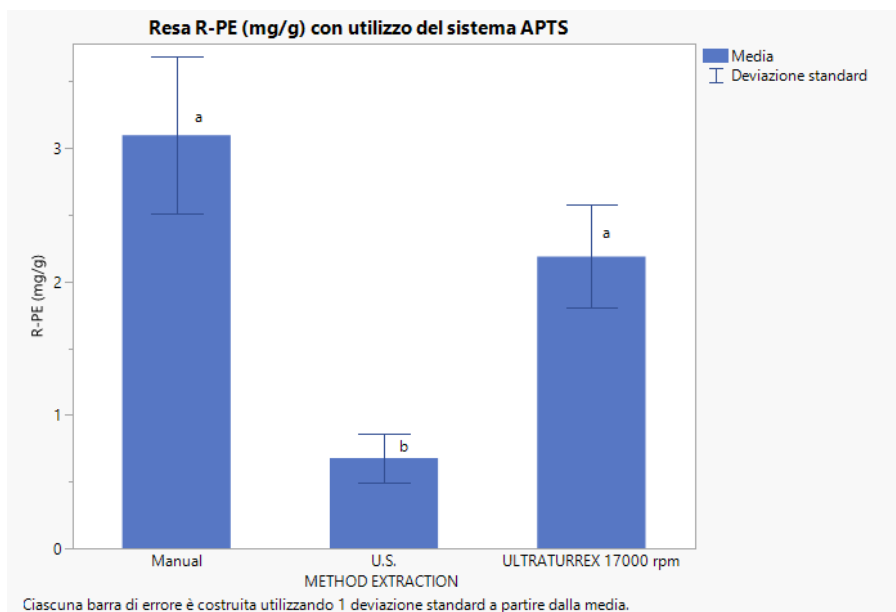
Infine, è importante sottolineare che l'inclusione del pre-trattamento ha avuto un impatto notevole sull'efficienza dell'estrazione. In particolare, il trattamento che ha fornito la resa più alta (45 s, 50% duty cycle, 3 cicli) ha mostrato un incremento della resa pari a circa il 91% rispetto allo stesso trattamento effettuato senza pre-trattamento.

In conclusione, i risultati di questo studio evidenziano l'importanza di considerare l'integrazione di strategie di pre-trattamento per potenziare l'efficacia dei metodi di estrazione non convenzionali come la sonicazione con sonda. L'ottimizzazione combinata dei parametri del pre-trattamento (tipologia, durata) e del trattamento principale (tempo, duty cycle, numero di cicli) rappresenta un approccio promettente per massimizzare la resa di R-PE da *Gracilaria gracilis*. È particolarmente interessante osservare che la semplice macerazione manuale ha prodotto le rese più elevate tra i trattamenti, suggerendo quindi il suo potenziale come metodo di riferimento. Inoltre, la sua semplicità, economicità e facilità di implementazione potrebbero renderla una fase strategica anche in prospettiva di processi su scala industriale, dove l'efficienza e la sostenibilità operativa sono fattori chiave.

3.5 Estrazione con sistema APTS

Le estrazioni con il sistema acquoso bifasico sono state eseguite sulla biomassa (L-21). La biomassa è stata sottoposta a tre diversi trattamenti: macerazione manuale, omogenizzazione con ultraturrex e ultrasuoni. Ogni trattamento è stato eseguito in tre cicli estrattivi, con durata di 90 secondi per ciclo, ad eccezione del trattamento ad ultrasuoni, che ha previsto una durata di 300 secondi per ciclo. I risultati ottenuti sono riassunti nel grafico 4.

Grafico 4. Resa di R-ficoeritrina (R-PE) espressa in mg/g di biomassa secca ottenuta con diversi metodi di estrazione (manuale, ultrasuoni, omogenizzazione) in combinazione con sistema ATPS. Le barre rappresentano la media \pm deviazione standard (n=3). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi ($p < 0,05$; test post-hoc di Tukey).



Il trattamento manuale ha generato la resa più elevata (3,1 mg/g), sebbene la resa ottenuta tramite omogeneizzazione con Ultra-Turrax (2,19 mg/g) non si discosti significativamente in termini statistici. Al contrario, il trattamento ad ultrasuoni ha mostrato la resa più bassa, in linea con quanto osservato anche nelle estrazioni effettuate con acqua distillata, suggerendo una potenziale degradazione della R-PE in seguito all'esposizione prolungata alle onde ultrasoniche.

È interessante notare come l'estrazione manuale in ATPS abbia fornito una resa di R-PE paragonabile a quella ottenuta con acqua, ma con il vantaggio aggiuntivo intrinseco al sistema ATPS: la possibilità di separare selettivamente diverse classi di composti durante un'unica procedura.

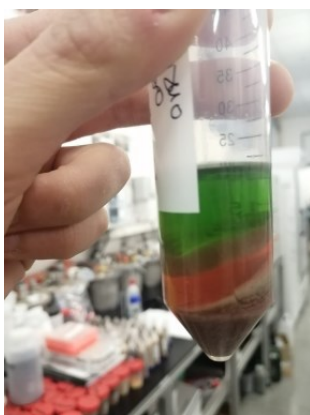
Oltre alla ficoeritrina (R-PE), è stato quantificato anche il contenuto lipidico totale nella fase etilacetato attraverso determinazione gravimetrica. I risultati hanno evidenziato un contenuto lipidico pari a 2,95 mg/g, 2,75 mg/g e 1,35 mg/g rispettivamente per i trattamenti manuale, con Ultra-Turrax e ad ultrasuoni.



I risultati ottenuti sono in linea con quanto riportato da Francavilla et al. [12], che avevano riportato un contenuto lipidico totale in *Gracilaria gracilis* compreso tra 1,98% e 1,12% in funzione della stagione della biomassa analizzata.

In prospettiva futura, sarà utile approfondire l'ottimizzazione delle condizioni di estrazione con sonda ultrasuoni all'interno del sistema ATPS, al fine di migliorare la selettività e la resa dei composti target, in particolare della R-PE, minimizzandone la degradazione.

Figura 2. Estrazione di R-PE e lipidi mediante sistema bifasico ATPS.

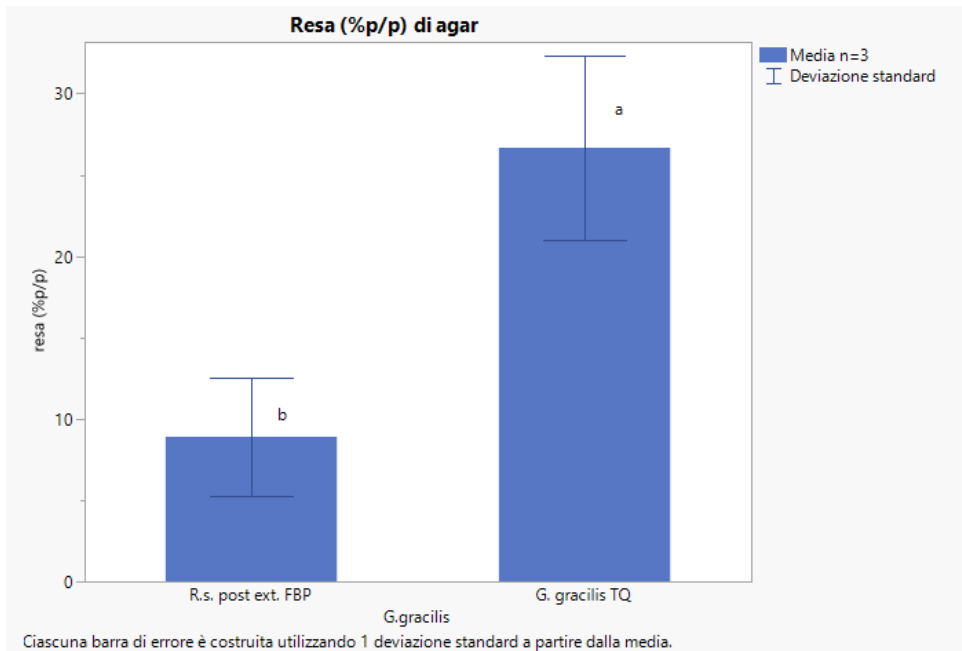


3.6 Rese estrattive dell'agar mediante l'uso di MAE

Dopo l'estrazione delle ficobiliproteine tramite macerazione con pestello e mortaio, si è proceduto con l'estrazione dell'agar sulla biomassa residua, utilizzando acqua come solvente. I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli ottenuti dall'estrazione dell'agar dalla biomassa non trattata.

Dopo l'estrazione, eseguita come descritto in precedenza, i recipienti del microonde sono stati aperti ancora caldi a causa delle proprietà di gelificazione dell'agar. La miscela è stata centrifugata, l'agar non ancora gelificato è stato separato dal pellet e conservato in frigorifero (+4°C) per favorire la gelificazione. L'agar è stato poi liofilizzato e quantificato gravimetricamente. I risultati sono riportati nel Grafico 5.

Grafico 5. Il grafico confronta la resa di agar (% p/p su peso secco) ottenuta da biomassa tal quale e da biomassa residua dopo l'estrazione delle ficobiliproteine. Le barre rappresentano la media \pm deviazione standard. Lettere diverse sopra le barre (a, b) indicano differenze statisticamente significative ($p < 0,05$).



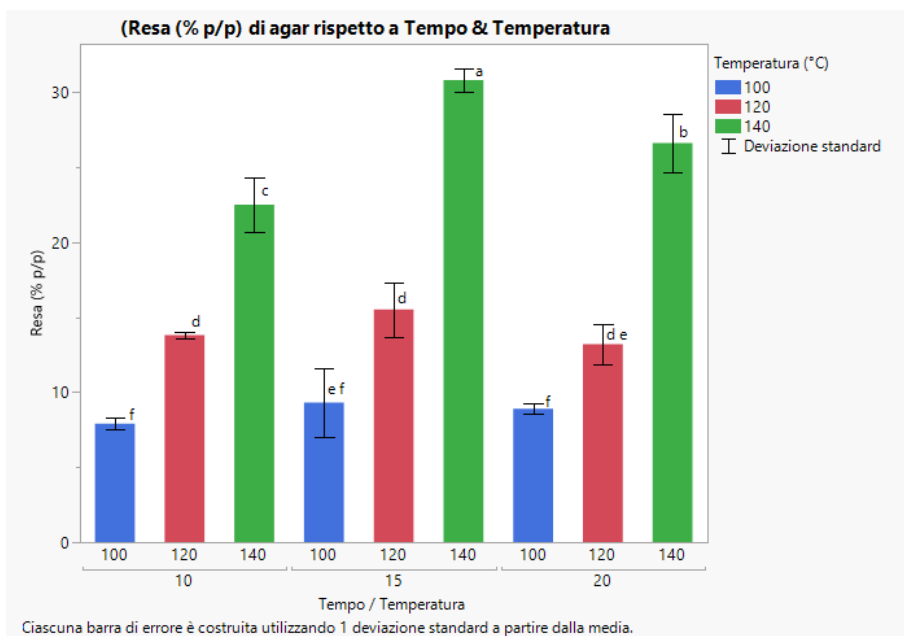
I dati mostrano che la biomassa non trattata ha fornito una resa di agar significativamente superiore (26%) rispetto alla biomassa residua post-estrazione delle ficobiliproteine (8,8%). Questi risultati differiscono da quanto riportato da Brain-Isasi et al. [50], per i quali la resa di agar ottenuta dal residuo algale dopo l'estrazione delle ficobiliproteine non era statisticamente differente da quella ottenuta estraendo l'agar dalla biomassa tal quale secca.

Una possibile spiegazione potrebbe essere la diversa metodologia adottata. Mentre Brain-Isasi et al., hanno utilizzato un metodo convenzionale basato su trattamenti alcalini e acidi seguiti da riscaldamento in bagno d'acqua, nel presente studio l'estrazione dell'agar è stata condotta senza pre-trattamento con alcali, mediante riscaldamento a microonde a 100°C per un tempo di 10 minuti. L'efficacia dell'estrazione assistita da microonde è fortemente dipendente dalla capacità del materiale e del solvente di assorbire l'energia delle microonde, un processo che è influenzato dalla polarità dei componenti presenti.



L'estrazione preliminare delle ficobiliproteine, proteine idrosolubili e polari, potrebbe aver alterato la composizione chimica della biomassa e di conseguenza la polarità della biomassa algale residua. Tale alterazione potrebbe aver reso la matrice meno suscettibile all'interazione con le microonde, portando ad un riscaldamento meno efficiente e una conseguente riduzione nella solubilizzazione e nel rilascio dell'agar. Pertanto, il breve tempo di estrazione inizialmente impiegato potrebbe non essere stato sufficiente per ottenere una resa ottimale. Per approfondire le dinamiche del processo, sono stati condotti ulteriori esperimenti variando i parametri di estrazione assistita da microonde (tempo e temperatura-tabella 4) sulla biomassa residua, precedentemente sottoposta all'estrazione delle ficobiliproteine. I risultati ottenuti sono rappresentati nel grafico 6 e discussi di seguito.

Grafico 6. Resa di agar (% p/p) estratto da *G. gracilis* (post estrazione di ficobiliproteine) mediante estrazione assistita da microonde (MAE), in funzione del tempo e della temperatura. Le barre rappresentano la media \pm deviazione standard (n=3). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi ($p < 0,05$; test post-hoc di Tukey).



Il grafico mostra come la resa di agar sia influenzata sia dal tempo che dalla temperatura. In generale, a parità di tempo, si osserva un incremento della resa con l'aumentare della temperatura. L'effetto del tempo, invece, non è lineare e varia in funzione della temperatura



applicata. A 100 °C, la resa si mantiene bassa e relativamente costante indipendentemente dalla durata (10, 15 o 20 minuti), suggerendo che tale temperatura non è sufficiente per solubilizzare efficacemente l'agar dalla biomassa pre-trattata. A 120 °C, la resa aumenta anche se non in modo significativo, passando da 10 a 15 minuti, ma diminuisce nuovamente a 20 minuti. Lo stesso andamento si osserva anche a 140 °C, dove si registrano le rese più elevate: il valore massimo ($31 \pm 0,65\%$) si ottiene a 15 minuti, mentre un ulteriore prolungamento del tempo a 20 minuti causa una riduzione della resa. Questa diminuzione potrebbe essere attribuita all'inizio di fenomeni di degradazione termica, come la pirolisi, che possono competere con i processi estrattivi e compromettere l'efficienza dell'estrazione, come già riportato da Francavilla et al. [46].

4. Conclusioni

In questo capitolo è stata condotta un'analisi approfondita sull'estrazione sequenziale di ficobiliproteine e agar da *Gracilaria gracilis* secondo i principi della bioraffineria, mirando all'estrazione sequenziale e sostenibile di molecole ad alto valore aggiunto, combinando approcci tradizionali e tecniche innovative di estrazione. Il confronto tra solventi per l'estrazione di R-PE ha indicato che l'acqua rappresenta la scelta da preferire per motivi di eco-compatibilità, economicità e semplicità. Inoltre, il confronto tra diverse tecniche estrattive ha evidenziato che la macerazione manuale, pur nella sua semplicità, garantisce rese superiori rispetto a metodi più tecnologici come l'ultrasuonazione e l'omogeneizzazione meccanica. L'impiego della sonda ad ultrasuoni ha permesso di individuare condizioni operative ottimali (45 s di trattamento, 50% di cycle, 3 cicli estrattivi) che, se precedute da un pre-trattamento della biomassa, consentono un significativo incremento della resa estrattiva (+91%). Questi risultati sottolineano l'importanza dell'integrazione tra strategie di pre-trattamento e parametri di sonicazione per massimizzare l'efficienza estrattiva. L'uso del sistema bifasico (ATPS) resta un approccio promettente che necessita di una fase successiva di ottimizzazione approfondita. Infine l'estrazione dell'agar ha mostrato una importante riduzione della resa quando eseguita sulla biomassa residua dopo l'estrazione delle ficobiliproteine. Questo risultato evidenzia come le caratteristiche della biomassa vengano alterate dai trattamenti preliminari, influenzando l'efficacia delle successive estrazioni. Per cui, nel complesso, la scelta della tecnica estrattiva e l'ottimizzazione dei parametri operativi sono fattori chiave per massimizzare la valorizzazione della biomassa algale.



5. Bibliografia

1. Machado, J. P. G., & Oliveira, V. P. (2024). The distribution of seaweed forms and foundational assumptions in seaweed biology. *Scientific Reports*, 14(1).
2. Wiencke, C., & Bischof, K. (2012). Seaweed biology. *Ecological studies*, 219.
3. Cotas, J., Gomes, L., Pacheco, D., & Pereira, L. (2023). Ecosystem services provided by seaweeds. *Hydrobiology*, 2(1), 75-96.
4. Belghit, I., Rasinger, J. D., Heesch, S., Biancarosa, I., Liland, N., Torstensen, B., Waagbø, R., Lock, E., & Bruckner, C. G. (2017). In-depth metabolic profiling of marine macroalgae confirms strong biochemical differences between brown, red and green algae. *Algal Research*, 26, 240–249.
5. Aryee, A. N., Agyei, D., & Akanbi, T. O. (2018). Recovery and utilization of seaweed pigments in food processing. *Current Opinion in Food Science*, 19, 113–119.
6. Chen, Z., Wu, W., Wen, Y., Zhang, L., Wu, Y., Farid, M. S., El-Seedi, H. R., Capanoglu, E., & Zhao, C. (2023). Recent advances of natural pigments from algae. *Food Production Processing and Nutrition*, 5(1).
7. Wijesinghe, W. a. J. P., & Jeon, Y. (2011). Biological activities and potential cosmeceutical applications of bioactive components from brown seaweeds: a review. *Phytochemistry Reviews*, 10(3), 431–443.
8. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Global seaweeds and microalgae production. (2021). <http://www.fao.org/3/cb4579en/cb4579en.pdf>.
9. Torres, P., Santos, J. P., Chow, F., & dos Santos, D. Y. (2019). A comprehensive review of traditional uses, bioactivity potential, and chemical diversity of the genus *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta). *Algal Research*, 37, 288-306.
10. Mouedden, R., Abdellaoui, S., Madani, F. E., Ouamari, N. E., Slimani, D., Kasmi, K., Taibi, M., Zahir, I., & Chaabane, K. (2023). *Gracilaria gracilis*– A Review of Ecological Knowledge, Chemical Composition, Cultivation, and Applications. *Ecological Engineering & Environmental Technology*, 25(1), 276–287.
11. Francavilla, M., Franchi, M., Monteleone, M., & Caroppo, C. (2013). The red seaweed *Gracilaria gracilis* as a multi products source. *Marine drugs*, 11(10), 3754-3776.
12. Pereira, T., Barroso, S., Mendes, S., Amaral, R. A., Dias, J. R., Baptista, T., Saraiva, J. A., Alves, N. M., & Gil, M. M. (2020). Optimization of phycobiliprotein pigments extraction from red algae *Gracilaria gracilis* for substitution of synthetic food colorants. *Food Chemistry*, 321, 126688.



13. Apt, K. E., Collier, J. L., & Grossman, A. R. (1995). Evolution of the phycobiliproteins. *Journal of Molecular Biology*, 248(1), 79-96.
14. Sonani, R. R., Rastogi, R. P., Patel, R., & Madamwar, D. (2016). Recent advances in production, purification and applications of phycobiliproteins. *World journal of biological chemistry*, 7(1), 100.
15. Singh, N. K., Sonani, R. R., Rastogi, R. P., & Madamwar, D. (2015). The phycobilisomes: an early requisite for efficient photosynthesis in cyanobacteria. *EXCLI journal*, 14, 268.
16. Rasyid, A., Ardiansyah, A., & Pangestuti, R. (2019). Nutrient composition of dried seaweed *Gracilaria gracilis*. *Indonesian Journal of Marine Science* 24(1), 1-6.
17. Rodríguez, M. C., Matulewicz, M. C., Nosedá, M. D., Ducatti, D. R. B., & Leonardi, P. I. (2009). Agar from *Gracilaria gracilis* (Gracilariales, Rhodophyta) of the Patagonic coast of Argentina—Content, structure and physical properties. *Bioresource technology*, 100(3), 1435-1441.
18. Marinho-Soriano, E. (2001). Agar polysaccharides from gracilaria species (Rhodophyta, gracilariaceae). *Journal of biotechnology*, 89(1), 81-84.
19. Martínez-Sanz, M., Gómez-Mascaraque, L. G., Ballester, A. R., Martínez-Abad, A., Brodkorb, A., & López-Rubio, A. (2019). Production of unpurified agar-based extracts from red seaweed *Gelidium sesquipedale* by means of simplified extraction protocols. *Algal Research*, 38, 101420.
20. Mostafavi, F. S., & Zaeim, D. (2020). Agar-based edible films for food packaging applications-A review. *International journal of biological macromolecules*, 159, 1165-1176.
21. Shah, M., Hameed, A., Kashif, M., Majeed, N., Muhammad, J., Shah, N., Rehan, T., Khan, A., Uddin, J., Khan, A., & Kashtoh, H. (2024). Advances in agar-based composites: A comprehensive review. *Carbohydrate Polymers*, 346, 122619.
22. Roy, S., & Siracusa, V. (2023). Multifunctional application of biopolymers and biomaterials. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), 10372.
23. Sudhakar, M. P., Nived, S. A., & Dharani, G. (2025). Fabrication and Characterization of Agar-and Seaweed-Derived Biomembrane Films for Biomedical and Other Applications. *Biopolymers*, 116(1), e23643.



24. Da Costa, E., Melo, T., Reis, M., Domingues, P., Calado, R., Abreu, M. H., & Domingues, M. R. (2021). Polar lipids composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of the atlantic red seaweed *Grateloupia turuturu*. *Marine drugs*, 19(8), 414.
25. Harwood, J. L., & Guschina, I. A. (2009). The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie*, 91(6), 679-684.
26. Soares, C., Sousa, S., Machado, S., Vieira, E., Carvalho, A. P., Ramalhosa, M. J., Morais, S., Correia, M., Oliva-Teles, T., Domingues, V. F., & Delerue-Matos, C. (2021). Bioactive Lipids of Seaweeds from the Portuguese North Coast: Health Benefits versus Potential Contamination. *Foods*, 10(6), 1366.
27. Rocha, C. P., Pacheco, D., Cotas, J., Marques, J. C., Pereira, L., & Gonçalves, A. M. (2021). Seaweeds as valuable sources of essential fatty acids for human nutrition. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(9), 4968.
28. Van Ginneken, V. J., Helsper, J. P., de Visser, W., van Keulen, H., & Brandenburg, W. A. (2011). Polyunsaturated fatty acids in various macroalgal species from north Atlantic and tropical seas. *Lipids in health and disease*, 10, 1-8.
29. Cotas, J., Leandro, A., Monteiro, P., Pacheco, D., Figueirinha, A., Gonçalves, A. M. M., Da Silva, G. J., & Pereira, L. (2020). Seaweed phenolics: From extraction to applications. *Marine Drugs*, 18(8), 384.
30. Subbiah, V., Xie, C., Dunshea, F. R., Barrow, C. J., & Suleria, H. A. (2023). The quest for phenolic compounds from seaweed: Nutrition, biological activities and applications. *Food Reviews International*, 39(8), 5786-5813.
31. Jiménez-Escrig, A., Gómez-Ordóñez, E., & Rupérez, P. (2012). Brown and red seaweeds as potential sources of antioxidant nutraceuticals. *Journal of Applied Phycology*, 24, 1123-1132.
32. Orfanoudaki, M., Hartmann, A., Karsten, U., & Ganzera, M. (2019). Chemical profiling of mycosporine-like amino acids in twenty-three red algal species. *Journal of Phycology*, 55(2), 393-403.
33. Peng, J., Guo, F., Liu, S., Fang, H., Xu, Z., & Wang, T. (2023). Recent advances and future prospects of mycosporine-like amino acids. *Molecules*, 28(14), 5588.



34. Raj, S., Kuniyil, A. M., Sreenikethanam, A., Gugulothu, P., Jeyakumar, R. B., & Bajhaiya, A. K. (2021). Microalgae as a source of mycosporine-like amino acids (MAAs); advances and future prospects. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(23), 12402.
35. Wada, N., Sakamoto, T., & Matsugo, S. (2015). Mycosporine-like amino acids and their derivatives as natural antioxidants. *Antioxidants*, *4*(3), 603-646.
36. Chrapusta, E., Kaminski, A., Duchnik, K., Bober, B., Adamski, M., & Bialczyk, J. (2017). Mycosporine-like amino acids: Potential health and beauty ingredients. *Marine drugs*, *15*(10), 326.
37. Punchakara, A., Prajapat, G., Bairwa, H. K., Jain, S., & Agrawal, A. (2023). Applications of mycosporine-like amino acids beyond photoprotection. *Applied and Environmental Microbiology*, *89*(11), e00740-23.
38. Gupta, V., Kumar, M., Brahmabhatt, H., Reddy, C. R. K., Seth, A., & Jha, B. (2011). Simultaneous determination of different endogenous plant growth regulators in common green seaweeds using dispersive liquid-liquid microextraction method. *Plant Physiology and Biochemistry*, *49*(11), 1259-1263.
39. Rademacher, W. (2015). Plant growth regulators: backgrounds and uses in plant production. *Journal of plant growth regulation*, *34*, 845-872.
40. Guerrero, P., Etxabide, A., Leceta, I., Peñalba, M., & De la Caba, K. (2014). Extraction of agar from *Gelidium sesquipedale* (Rhodophyta) and surface characterization of agar based films. *Carbohydrate polymers*, *99*, 491-498.
41. Li, H., Yu, X., Jin, Y., Zhang, W., & Liu, Y. (2008). Development of an eco-friendly agar extraction technique from the red seaweed *Gracilaria lemaneiformis*. *Bioresource Technology*, *99*(8), 3301-3305.
42. Marinho-Soriano, E., & Bourret, E. (2003). Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Bioresource Technology*, *90*(3), 329-333.
43. Iqbal, M., Tao, Y., Xie, S., Zhu, Y., Chen, D., Wang, X., Huang, L., Peng, D., Sattar, A., Shabbir, M. a. B., Hussain, H. I., Ahmed, S., & Yuan, Z. (2016). Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. *Biological Procedures Online*, *18*(1).



44. Kursar, T. A., van der Meer, J., & Alberte, R. S. (1983). Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*: I. Biochemical analyses of pigment mutations. *Plant Physiology*, *73*(2), 353-360.
45. Francavilla, M., Pineda, A., Lin, C. S., Franchi, M., Trotta, P., Romero, A. A., & Luque, R. (2013). Natural porous agar materials from macroalgae. *Carbohydrate polymers*, *92*(2), 1555-1560.
46. Yamanaka, G., & Glazer, A. N. (1980). Dynamic aspects of phycobilisome structure: Phycobilisome turnover during nitrogen starvation in *Synechococcus* sp. *Archives of Microbiology*, *124*, 39-47.
47. Ribeiro, A. L. N., Tesima, K. E., Souza, J. M., & Yokoya, N. S. (2013). Effects of nitrogen and phosphorus availabilities on growth, pigment, and protein contents in *Hypnea cervicornis* J. Agardh (Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, *25*, 1151-1157.
48. Wang, Q., Lan, L., Li, H., Gong, Q., & Gao, X. (2023). Effects of nitrogen source and concentration on the growth and biochemical composition of the red seaweed *Grateloupia turuturu* (Halymeniaceae, Rhodophyta). *Sustainability*, *15*(5), 4210.
49. Bromberger Soquetta, M., Schmaltz, S., Wesz Righes, F., Salvalaggio, R., & de Marsillac Terra, L. (2018). Effects of pretreatment ultrasound bath and ultrasonic probe, in osmotic dehydration, in the kinetics of oven drying and the physicochemical properties of beet snacks. *Journal of Food Processing and Preservation*, *42*(1), e13393.
50. Brain-Isasi, S., Correa, S., Amado-Hinojosa, J., Buschmann, A. H., Camus, C., & Lienqueo, M. E. (2022). Combined extraction methodology for simultaneous recovery of phycobiliproteins and agar from the red alga *Gracilaria chilensis* CJ Bird, McLachlan & EC Oliveira. *Algal Research*, *67*, 102821.



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



Ministero dell'Università
e della Ricerca



PON
RICERCA
E INNOVAZIONE
2014 - 2020

REACT EU



UNIVERSITÀ
DI FOGGIA

Capitolo 4. IDROLIZZATI PROTEICI, ESTRATTTI AMINOACIDICI E FITORMONI DA GRACILARIA GRACILIS: CARATTERIZZAZIONE, PRODUZIONE E IMPIEGO COME BIOSTIMOLANTI IN AGRICOLTURA.

Prefazione

La ricerca di alternative sostenibili per l'agricoltura moderna ha portato a un crescente interesse verso i biostimolanti, composti capaci di migliorare l'efficienza nutrizionale delle piante e la loro tolleranza agli stress abiotici. Questo studio esplora il potenziale della macroalga *Gracilaria gracilis* come fonte di biostimolanti, con un'enfasi particolare sulla valorizzazione del residuo solido derivante dai processi di bioraffineria algale. Dopo l'estrazione di composti ad alto valore aggiunto come ficobiliproteine e agar, il residuo solido di *G. gracilis* si rivela una matrice promettente per l'ottenimento di idrolizzati proteici, estratti aminoacidici e fitormoni. L'obiettivo principale è caratterizzare questo residuo, ottimizzare i processi di estrazione e valutare il suo impiego come biostimolante, contribuendo così a un approccio di economia circolare che massimizzi l'utilizzo della biomassa algale.



1. INTRODUZIONE

I biostimolanti costituiscono un elemento chiave per l'agricoltura moderna e in particolar modo per la sua sostenibilità. Questi composti possono prendere origini da varie matrici organiche, come microrganismi o composti derivanti da biomasse, agiscono incrementando la capacità delle piante di assorbire nutrienti dal suolo e aumentandone l'efficienza nell'uso nei processi metabolici. Attraverso questi meccanismi, i biostimolanti incrementano la riduzione della dipendenza dai fertilizzanti di sintesi, conseguenzialmente viene ridotto l'impatto ambientale dell'agricoltura e vengono agevolate pratiche maggiormente sostenibili dal punto di vista ecosistemico [1].

Secondo il regolamento 2019/1009 del parlamento europeo e del consiglio, un biostimolante è un qualunque prodotto che stimola i processi nutrizionali delle piante indipendentemente dal suo tenore di nutrienti, con l'unica finalità di migliorare una o più delle seguenti caratteristiche della pianta o della rizosfera della pianta: efficienza dell'uso dei nutrienti, tolleranza allo stress abiotico, caratteristiche qualitative, disponibilità di nutrienti confinati nel suolo o nella rizosfera. I biostimolanti sono divisi dal regolamento in due macro categorie, ovvero i biostimolanti di origine microbica e quelli di origine non microbica. I biostimolanti di origine microbica possono essere costituiti da microrganismi quali funghi o batteri e consorzi di questi ultimi [2]. Le fonti di biostimolanti di origine non microbica includono nel loro insieme, una vasta tipologia di composti naturali tra cui gli estratti di macroalghe [3].

Alcuni generi di Phaeophyceae (alghe brune), per esempio *Aschophyllum*, *Fucus* e *Laminaria*, sono fra le classi più comunemente sfruttate per l'estrazione di biostimolanti grazie al loro ricco profilo di composti bioattivi. Invece i generi della classe delle Rhodophyceae rappresentano una fonte particolarmente interessante di polisaccaridi, fra cui per esempio i carragenani, che presentano anch'essi un notevole potenziale come biostimolanti [4]. Dunque, più generalmente, le macroalghe si presentano come una risorsa di notevole importanza per la produzione di composti per applicazioni agricole, in quanto la loro biomassa è una fonte ricca di composti bioattivi per la produzione di idrolizzati proteici, per la presenza di amminoacidi e fitormoni, che possono essere impiegati in agricoltura per migliorare la fertilità del suolo, stimolare la crescita radicale, aumentare la resistenza delle piante agli stress abiotici e promuovere l'assorbimento di nutrienti.



1.1 Idrolizzati proteici

Il contenuto proteico delle alghe marine risulta essere notevolmente variabile, non solo in funzione della specie ma anche della stagionalità e della posizione geografica. In genere le alghe brune risultano essere quelle con il più basso contenuto proteico (3-15% di peso secco), seguite da alghe verdi (9-26% di peso secco), mentre le alghe rosse mostrano la più alta percentuale (47% di peso secco) [5][6]. Grazie al loro interessante profilo proteico, diverse specie di alghe sono state oggetto di studio per l'ottenimento di idrolizzati proteici attraverso varie metodologie. Un'efficace disgregazione della parete cellulare algale si configura come una fase preparatoria essenziale per facilitare la liberazione delle proteine e massimizzare l'efficienza del successivo processo di idrolisi, in quanto l'interazione ionica tra le molecole proteiche e i polisaccaridi ostacola una estrazione proteica efficiente [7]. L'idrolisi può essere realizzata mediante:

- idrolisi enzimatica, che impiega le proteasi per scindere i legami peptidici delle proteine, e consente, operando a basse temperature, di preservare l'integrità degli enzimi e ottenere un maggiore rendimento con minori reazioni secondarie [8]; inoltre enzimi come le polisaccaridasi possono essere impiegati prima dell'estrazione per degradare la parete cellulare algale e facilitare la successiva estrazione [9];
- metodi fisici come macinazione, shock osmotico, omogeneizzazione ed elevate temperature, che combinati possono indurre l'idrolisi senza l'impiego di sostanze chimiche [8][9];
- idrolisi chimica, in condizioni acide o alcaline è efficace nell'idrolizzare i legami peptidici, tuttavia la composizione dell'idrolizzato è difficile da controllare. Ad esempio, nonostante le idrolisi alcaline con NaOH siano generalmente utilizzate in quanto sicure, possono portare ad alcuni svantaggi come denaturazione delle proteine, precipitazione di composti non proteici, isomerizzazione e riduzione di alcuni aminoacidi [8] [10]. Comune è anche l'estrazione combinata in condizioni acide/alcaline per massimizzare la resa estrattiva, sfruttando le condizioni acide per la rottura delle pareti cellulari ed aumentare così la solubilità delle proteine in soluzione [11].

Le proteine idrolizzate svolgono numerose attività biologiche utili in ambito agricolo, ampiamente documentate.



Tra i principali benefici vi sono il miglioramento della sostenibilità e della qualità delle colture, una maggiore efficienza nell'assorbimento dei nutrienti e una maggiore tolleranza agli stress abiotici. Inoltre, possono influenzare positivamente l'equilibrio ormonale delle piante, aumentare la concentrazione di composti fitochimici, ridurre il contenuto di nitrati nei frutti e contribuire a limitare le perdite causate da stress ambientali [12].

1.2 Aminoacidi

La composizione aminoacidica algale varia in funzione della specie. Gli aminoacidi oltre ad essere una fonte di azoto organico, sono molecole funzionali coinvolte in diversi ruoli fisiologici della pianta, e il loro basso peso molecolare ne permette un rapido assorbimento. Sono essenziali per la germinazione e la sintesi proteica, migliorano la fotosintesi e la resistenza allo stress. Agiscono da precursori di fitormoni e sono coinvolti nella sintesi di composti fenolici. Sono cruciali per la biosintesi di pigmenti, vitamine, coenzimi e basi nucleotidiche, e possono potenziare l'assorbimento e il metabolismo dei nutrienti radicali [13]. L'efficacia degli estratti aminoacidici come agenti benefici per diverse colture è stata ampiamente supportata da evidenze scientifiche e ricerche.

Ad esempio, Zewail et al. [14], hanno dimostrato che applicazioni fogliari di estratti aminoacidici su *Phaseolus vulgaris* L. hanno portato ad un aumento della crescita generale, come altezza, diametro del fusto, numero di rami e foglie, superficie fogliare totale e il peso secco della parte aerea. È stato riscontrato un incremento dei pigmenti fotosintetici, in particolare del contenuto totale di clorofilla. L'applicazione di aminoacidi per via fogliare ha anche portato a un aumento della resa e delle sue componenti, come il numero di baccelli per pianta, il peso dei baccelli, il numero di semi per baccello, il numero di semi pienamente sviluppati, il peso di 100 semi, il numero totale di semi per pianta, la resa di semi per pianta e l'indice di raccolta. A livello biochimico, si è notato un incremento dei costituenti come azoto, fosforo, potassio, magnesio, calcio, ferro, zinco, carboidrati totali e proteine grezze nelle foglie. Infine, anche nelle fave, l'applicazione fogliare di aminoacidi ha aumentato significativamente l'altezza della pianta e il numero di foglie e rami per pianta.

Marhoon et al. [15], ne hanno studiato l'effetto su *Capsicum annuum* L. dimostrando che l'applicazione di aminoacidi, a diverse concentrazioni, incrementa il diametro del fusto e la percentuale di sostanza secca, inducendo variazioni significative nella struttura interna del



fusto, influenzando lo spessore della corteccia, del cilindro vascolare e dello strato del midollo.

Ricerche su *Lycopersicon esculentum* condotte da Xiang Wang et al. [16], hanno dimostrato che l'uso di un fertilizzante a base di aminoacidi solubile in acqua (WAAF) promuove la crescita e migliora la qualità dei pomodori in modo più efficace dei fertilizzanti chimici. Inoltre influenza positivamente la composizione e l'abbondanza dei batteri benefici nella rizosfera, reclutando specifici generi coinvolti nella chemiotassi e nella formazione di biofilm, fattori che contribuiscono al miglioramento di resa e qualità del pomodoro.

Anche la vite (*Vitis vinifera*) trae beneficio dagli estratti aminoacidici. El-Sese et al. [17], hanno rilevato che trattamenti fogliari con estratti di alghe marine o aminoacidi migliorano sia la resa sia la qualità dei grappoli. In uno studio quadriennale condotto su diverse cultivar, è stato osservato che tali trattamenti influenzano in modo significativo i solidi solubili totali (TSS%), l'acidità e il rapporto TSS/acidi.

1.3 Fitormoni

Con il termine "fitormoni" ci si riferisce a quelle sostanze naturali che influenzano i processi fisiologici a basse concentrazioni. I PGR (in inglese: Plant Growth Regulators) includono sia i fitormoni naturali prodotti dalla pianta (endogeni) sia le sostanze chimiche sintetiche (esogene) che, applicate alle piante, influenzano la loro crescita e il loro sviluppo [18]. Regolatori di crescita delle piante simili a fitormoni (PGR) sono stati identificati in molteplici estratti algali. Le principali classi di PGR presenti nelle macroalghe possono essere riassunte in: gibberelline, citochinine, acido abscissico e auxine.

Le gibberelline sono originate nei plastidi e sono associate a diversi processi di accrescimento delle piante superiori quali: l'allungamento dello stelo, l'attivazione dell' α -amilasi e quindi all'inizio della germinazione dei semi, allo sviluppo degli organi floreali, influenzano inoltre la biosintesi delle proteine e l'inizio della fioritura.

Le citochinine invece sono coinvolte in differenti processi fisiologici dei tessuti meristemati in cui sono prodotte, chimicamente derivate dalla purina svolgono diverse funzioni correlate allo sviluppo cellulare, esse: controllano la divisione cellulare, promuovono la sintesi proteica e della clorofilla, promuovono lo sviluppo dei cloroplasti e dei tessuti vascolari, promuovono lo sviluppo delle gemme, stimolano la crescita dei germogli, favoriscono lo sviluppo dei frutti e dei fiori, regolano la dormienza apicale, contribuiscono allo sviluppo



della lamina fogliare e alla tolleranza a stress abiotici come stress da caldo e stress idrico. Diversamente l'acido abscissico viene prodotto a partire da carotenoidi nelle radici e da foglie adulte delle piante, la funzione principale di questo fitormone è quella di indurre la chiusura stomatica, inibire la crescita dei germogli e favorire l'immagazzinamento delle proteine nei semi in dormienza.

Le auxine sono rappresentate dagli acidi indolacetici, dall'acido butirrico e fenilacetico, sintetizzati prevalentemente nei primordi fogliari, foglie giovani e nei frutti, queste ultime attivano l'ATPasi plasmalemma favorendo l'allungamento cellulare, sono coinvolte nella differenziazione del floema, nella dormienza apicale, nei tropismi, e nell'inizio della formazione delle radici oltre che nella tolleranza a stress abiotici come salinità, calore e stress idrico [19].

1.4 REGOLAMENTO (CE) 2019/1009, D. Lgs. 75/2010, e NORMATIVE CEN/TS 17700(1-2-3-4-5)

1.4.1 Regolamento (UE) 2019/1009

Il Regolamento (UE) 2019/1009 [2] ha l'obiettivo di armonizzare le norme relative ai fertilizzanti nell'Unione Europea, promuovendo la libera circolazione di questi prodotti e garantendo un elevato livello di protezione dell'ambiente e della salute umana. Nel testo viene riportata la definizione di "biostimolante", così come sopra definita, che non era presente nel precedente regolamento (CE) n. 2003/2003 [20] che normava l'utilizzo dei fertilizzanti, in cui venivano normati solo i concimi minerali, gli agenti chelanti e alcuni inibitori della nitrificazione e dell'ureasi. Inoltre nel vecchio regolamento non erano presenti limiti relativi all'eventuale presenza di sostanze indesiderate, come i metalli pesanti. Dal 15 luglio 2019 è entrato in vigore il nuovo regolamento europeo (Reg (UE) 2019/1009), che, con la sua piena applicazione dal 16 luglio 2022, ha abrogato il precedente. Gli obiettivi principali che lo costituiscono sono:

-creare un mercato unico europeo per i fertilizzanti, garantendo standard qualitativi uniformi e facilitando la

libera circolazione dei prodotti;

-promuovere l'uso di fertilizzanti più sostenibili, a basso impatto ambientale;



-favorire l'innovazione nel settore dei fertilizzanti, consentendo l'immissione sul mercato di nuovi prodotti e tecnologie;

-garantire un elevato livello di protezione della salute umana e dell'ambiente.

La nuova normativa europea è inoltre costituita da cinque allegati:

- 1) "PFC, Product Function Categories" (categorie funzionali di prodotto), dove per ogni categoria di fertilizzante sono definiti i requisiti qualitativi;
- 2) "CMC, Component Material Categories" (categorie di materiali costituenti), dove sono classificati i materiali e le sostanze ammesse nella produzione dei fertilizzanti. Il regolamento elenca diverse CMC (come materiali vegetali, compost, digestato, sottoprodotti animali, ecc.), ognuna con requisiti specifici che i produttori devono rispettare per la conformità normativa.
- 3) Relativo all'etichettatura e alle tolleranze dei valori in etichetta rispetto a quelli normati;
- 4) Relativo alle procedure di valutazione della conformità;
- 5) Riporta un fac-simile della dichiarazione UE di conformità del prodotto.

Dunque Il Regolamento (UE) 2019/1009 ha un impatto significativo sulle imprese che producono e commercializzano fertilizzanti. Richiede un adeguamento dei processi produttivi, dei sistemi di controllo qualità e delle etichette dei prodotti. Tuttavia offre una maggiore tutela al consumatore in quanto garantisce una maggiore trasparenza, prodotti più sicuri e una maggiore attenzione alla sostenibilità ambientale.

1.4.2 DECRETO LEGISLATIVO 29 aprile 2010, n. 75

Il D. Lgs. 75/2010 [21], insieme al Regolamento (UE) 2019/1009, costituisce il quadro normativo di riferimento per il settore dei fertilizzanti in Italia. La conoscenza approfondita di queste disposizioni è fondamentale per tutti gli operatori del settore, dai produttori agli utilizzatori. Questo provvedimento, emanato in attuazione della direttiva comunitaria, ha l'obiettivo di riordinare e revisionare la disciplina nazionale in materia, allineandola alle nuove esigenze del settore e garantendo un elevato livello di tutela dell'ambiente e della salute umana. Il decreto legislativo affronta numerosi aspetti, tra cui:

-definizione precisa dei termini utilizzati nel settore dei fertilizzanti;



- classificazione dei fertilizzanti in base alla loro composizione e alle loro caratteristiche;
- stabilisce i requisiti di qualità che i fertilizzanti devono soddisfare;
- disciplina l'etichettatura dei fertilizzanti, indicando le informazioni obbligatorie che devono essere riportate;
- prevede controlli sulla produzione e sulla commercializzazione dei fertilizzanti.

1.4.3. Normative CEN/TS 17700(1-2-3-4-5)

La specifica tecnica definisce i principi generali per la giustificazione degli effetti dichiarati per i biostimolanti delle piante. I principi generali comprendono e definiscono tutti i parametri generali, i requisiti e i criteri di qualità, e hanno lo scopo di essere applicati per valutare l'efficacia delle prove utilizzate per la convalida dell'effetto dichiarato (o degli effetti dichiarati) come risultato dell'uso di un biostimolante delle piante.

La serie CEN/TS 17700 [22] è composta da diverse parti, ciascuna dedicata a un aspetto specifico dei biostimolanti.

-CEN/TS 17700-1 (Principi generali). Stabilisce i principi generali per la giustificazione delle affermazioni relative ai biostimolanti e stabilisce i criteri per la valutazione dell'efficacia dei test condotti sui biostimolanti. Definisce i parametri generali, i requisiti di qualità per le prove e indica i diversi tipi di dati utilizzabili (sperimentazioni in campo e protette, condizioni controllate, revisioni bibliografiche). Fornisce inoltre indicazioni sulla progettazione degli studi (raggruppamento colture, numero minimo prove, analisi statistica) e sulla terminologia da utilizzare in etichetta, oltre ai criteri di qualità per l'esecuzione delle prove e le informazioni da raccogliere.

-CEN/TS 17700-2 (Efficienza dell'uso dei nutrienti). Si concentra sulle affermazioni relative al miglioramento dell'efficienza con cui le piante utilizzano i nutrienti. Definisce il concetto di efficienza dell'uso dei nutrienti, specifica la terminologia dei claims in questo ambito, propone indici di valutazione e fornisce indicazioni dettagliate per l'esecuzione delle prove, inclusi i controlli necessari e le condizioni ambientali.

-CEN/TS 17700-3 (Tolleranza allo stress abiotico). Fornisce le linee guida per giustificare i claims riguardanti la capacità dei biostimolanti di aumentare la tolleranza delle piante a diversi tipi di stress abiotico (termico, luminoso, meccanico, idrico, chimico).



Definisce la tolleranza allo stress abiotico, specifica la terminologia dei claims, descrive le modalità di giustificazione (inclusi i disegni sperimentali con e senza controllo negativo), elenca i marcatori agronomici per la validazione e fornisce specifiche per l'esecuzione delle prove, in linea con i principi generali.

-CEN/TS 17700-4 (Caratteristiche qualitative). Specifica le linee guida per giustificare scientificamente i claims relativi al miglioramento delle caratteristiche qualitative delle piante tramite l'uso di biostimolanti in agricoltura. Si rivolge a produttori, laboratori e autorità del settore, definendo:

-caratteristica qualitativa e le sue sottocategorie: agronomica (legate alla performance della pianta) e commerciabile (che migliorano il valore di mercato).

-La terminologia dei claims, che devono specificare l'effetto sulle caratteristiche qualitative e la coltura (in riferimento alla Parte 1). L'Allegato A fornisce esempi di claims.

-I marcatori utilizzabili per validare i claims, che devono essere misurabili con metodi consensuali e scientificamente validi. Gli Allegati B e C forniscono esempi di fonti di metodi e metodi specifici di misurazione.

-Le specifiche per l'esecuzione delle prove, consentendo prove in condizioni controllate per misurazioni nel suolo (es. radici, germinazione), ma non per la parte commerciabile della pianta.

-CEN/TS 17700-5 (Disponibilità di nutrienti confinati). Specifica i principi per giustificare le affermazioni relative al miglioramento della disponibilità di nutrienti confinati nel suolo o nella rizosfera tramite l'uso di biostimolanti per le piante. Definisce termini chiave come nutriente disponibile, nutriente confinato e rizosfera. I claims devono specificare il nutriente interessato e se l'effetto è nel suolo, nella rizosfera o in entrambi. La valutazione si basa sul confronto della concentrazione del nutriente disponibile tra il trattamento con biostimolante e il controllo. I marcatori possono essere misurati nel suolo/rizosfera (con metodi specifici che escludono la misurazione del nutriente totale) o nelle piante (tramite l'aumento dell'esportazione di nutrienti, calcolata in base alla concentrazione e alla resa). Le prove possono essere in condizioni controllate o in campo, considerando il pH e la tessitura del suolo (con un numero minimo di prove specificato in base al claim). È necessario indicare il tempo tra l'applicazione del biostimolante e la misurazione.



Dunque le norme CEN/TS 17700 rappresentano uno strumento fondamentale per garantire la qualità e l'efficacia dei biostimolanti, contribuendo così a un'agricoltura più sostenibile e produttiva.

Alla luce di quanto detto, l'agricoltura biologica, aiuta a conservare la biodiversità, usa l'energia e le risorse in modo sostenibile, migliora la fertilità del suolo e mantiene la qualità delle acque. I biostimolanti naturali offrono una alternativa sostenibile agli input chimici tradizionali, come pesticidi e fertilizzanti.

Si prevede inoltre che il mercato dei biostimolanti crescerà da 4,46 miliardi di dollari nel 2025 a 7,84 miliardi di dollari entro il 2030, con un CAGR dell'11,9% (<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biostimulant-market-1081.html>), mercato spinto anche dalle politiche governative che favoriscono pratiche sostenibili e che mirano a rendere l'Unione Europea climaticamente neutrale entro il 2050 [23].

Il presente studio si concentra sull'utilizzo di *Gracilaria gracilis* come potenziale fonte di composti bioattivi destinati ad applicazioni in ambito agricolo. In quest'ottica, *G. gracilis* - macroalga rossa raccolta nella Laguna di Lesina (Mar Adriatico Meridionale, Italia) - rappresenta una risorsa promettente per la produzione di biostimolanti. L'attenzione è rivolta in particolare al residuo solido ottenuto dopo il processo di bioraffineria algale, una volta estratti composti ad alto valore aggiunto come le ficobiliproteine e l'agar, come descritto nel capitolo precedente. L'attività di ricerca, condotta in collaborazione con l'azienda partner SOUTH AGRO SRL, ha avuto come obiettivo la caratterizzazione del profilo biochimico dell'alga. In particolare, si è posta enfasi sull'analisi dell'idrolizzato proteico, sulla definizione del profilo aminoacidico e sull'identificazione e quantificazione dei fitormoni presenti in *G. gracilis*.

2. MATERIALI E METODI

Gracilaria gracilis è stata campionata nella laguna di Lesina. L'alga fresca campionata è stata portata in laboratorio e lavata per la rimozione di epifite e corpi estranei. La biomassa pulita è stata liofilizzata a -80°C per 5 giorni, macinata per ottenere una polvere sottile e conservata in contenitori sigillati a -18°C. Per esigenze operative, la raccolta della biomassa è avvenuta in due distinti periodi: luglio 2021 (L-21) e novembre 2022 (N-22). Considerata la possibile variabilità stagionale nella composizione chimica, è stata determinata e riportata la composizione elementare per entrambe le raccolte.



2.1 Caratterizzazione della biomassa

I campioni di *G. gracilis* raccolti nei periodi L-21 (luglio 2021) e N-22 (novembre 2022), nonché il residuo solido derivante dal processo di estrazione di ficobiliproteine e agar (dal campione N -22) sono stati caratterizzati in termini di proximate analysis e analisi elementare. Le proximate analysis sono state eseguite con un analizzatore termogravimetrico TGA 701 (LECO), con il metodo ASTM D7582. L'analisi elementare dei campioni (C, H, N, S e O) è stata ottenuta con il metodo LECO-ASTM-D 5291, eseguito con un analizzatore elementare CHNS-LECO 628. Il contenuto di O è stato calcolato indirettamente come percentuale complementare alla somma della percentuale di ciascun elemento e del contenuto di ceneri.

2.2 Idrolisi alcalina con microonde

L'idrolisi delle proteine è stata effettuata sia sulla biomassa algale tal quale che sul residuo solido post estrazione di ficobiliproteine e agar. Gli esperimenti sono stati condotti in condizioni alcaline mediante microonde MARS configurato con un carosello a 12 posizioni. La biomassa algale, sia liofilizzata che umida (residuo post-estrazione), è stata pesata e trasferita in un recipiente di estrazione in teflon contenente 10 mL di KOH 2M (con un rapporto solido: liquido di circa 1:10). Il recipiente è stato chiuso dopo l'introduzione di una sonda in fibra ottica per misurare la temperatura nei sistemi. I parametri operativi impiegati nell'apparato MAE sono stati i seguenti: potenza del magnetron 100%, tempo di rampa della temperatura, 10 minuti. Durante il funzionamento, sia la temperatura che la pressione sono state monitorate in un singolo recipiente (recipiente di controllo).

Per individuare le condizioni ottimali di idrolisi, sono stati testati diversi tempi e temperature, come riportato nella Tabella 1. Al termine del trattamento, le fasi liquida e solida sono state separate mediante centrifugazione a 5.000 rpm per 10 minuti. La frazione liquida contenente l'idrolizzato proteico è stata successivamente analizzata mediante saggio colorimetrico secondo il metodo di Lowry per la quantificazione delle proteine [24].



Tabella 1. Condizioni operative di idrolisi alcalina assistita da microonde (MAE) applicate alla biomassa algale.

Tempo (min)	Temperatura (°C)
30	70
60	70
15	80
30	80
60	80
15	90
30	90
60	90

2.3 Caratterizzazione idrolizzato alcalino

Una volta ottimizzate le condizioni di idrolisi alcalina, l'idrolizzato proteico ottenuto è stato sottoposto a una serie di analisi per valutarne il potenziale impiego come biostimolante in ambito agricolo. La caratterizzazione chimica ha incluso la determinazione del contenuto di carbonio organico e azoto totale, effettuata con un analizzatore elementare CHNS LECO 628 secondo il metodo LECO-ASTM D5291. La composizione ionica dell'idrolizzato, in termini di cationi e anioni, è stata analizzata mediante cromatografia ionica. Per valutare la presenza di macro e microelementi, nonché di eventuali contaminanti inorganici, i campioni sono stati sottoposti a digestione acida in H₂O₂, HNO₃ e HF, utilizzando un digestore a microonde a vaso chiuso (sistema MARS). Le soluzioni risultanti sono state analizzate mediante spettrometria a emissione ottica con plasma accoppiato induttivamente (ICP-OES, Agilent 700).

Queste analisi sono fondamentali per verificare la conformità del prodotto ai requisiti imposti dalla Parte II dell'Allegato I del Regolamento (UE) 2019/1009, che stabilisce i limiti massimi ammessi per i contaminanti nei biostimolanti delle piante, come riportato di seguito:

- Cadmio (Cd) -> 1,5 mg/kg materia secca;
- Cromo esavalente (CrVI) -> 2,0 mg/kg sostanza secca;
- piombo (Pb) -> 120 mg/kg sostanza secca;
- Mercurio (Hg) -> 1 mg/kg sostanza secca;



-Nichel (Ni) -> 50 mg/kg sostanza secca;

-Arsenico inorganico (As) -> 40 mg/kg sostanza secca.

Inoltre il tenore di rame (Cu) non deve superare i 600 mg/Kg di materia secca, e il tenore di zinco (Zn) non deve superare i 1500 mg/Kg di materia secca.

2.4 Idrolisi degli aminoacidi

Prima dell'analisi i peptidi e le proteine devono essere completamente idrolizzati per produrre aminoacidi liberi. L'idrolisi è una fase delicata ed esistono molti protocolli di applicazione. Nel presente studio, è stata impiegata l'idrolisi assistita da microonde al fine di determinare la composizione aminoacidica della biomassa *Gracilaria gracilis*. Inoltre, sono state condotte prove sperimentali con l'obiettivo di ottimizzare il metodo di idrolisi a microonde, riducendo i tempi di analisi rispetto al metodo convenzionale.

L'idrolisi convenzionale prevede un trattamento con HCl concentrato, in ambiente privo di ossigeno, in condizioni di temperature di 110°C per tempi di 18-24 h. Tuttavia questo tipo di trattamento tende a degradare serina e treonina, la cisteina può essere distrutta e la metionina può essere ossidata a metionina solfossido; per evitare l'alogenazione della tirosina viene aggiunto il fenolo; il triptofano invece può essere distrutto dall'idrolisi acida ragione per cui per la sua determinazione spesso viene usata l'idrolisi alcalina [25]. L'idrolisi a microonde, nonostante permetta di accelerare i tempi di analisi, può risultare impegnativa quando si lavora con matrici più complesse, per cui richiede un'attenta standardizzazione e controllo di diversi fattori come l'uniformità della radiazione, il volume del liquido, la potenza del microonde e, soprattutto, il tempo di idrolisi, per garantire risultati accurati e quantitativi [26]. Per valutare l'efficacia del metodo e isolare gli effetti legati alla complessità della matrice, l'idrolisi (sia convenzionale che a microonde) è stata eseguita in parallelo su *Bovine Serum Albumin* (BSA, acquistata da Sigma-Aldrich), una proteina standard comunemente utilizzata per la calibrazione nelle analisi spettrofotometriche, e sulla biomassa algale.



2.4.1 Idrolisi convenzionale

L'idrolisi degli aminoacidi con il metodo convenzionale è stata eseguita come riportato da Elisabete et al. [27]. 50 mg di campione sono stati pesati e idrolizzati con 10 mL di HCl 6 N e 1% di fenolo (m/V) in provette per autoclave, in ambiente saturo di azoto, a 110°C per 24 ore.

2.4.2 Idrolisi con microonde

Per l'idrolisi assistita da microonde, 50 mg di campione sono stati pesati e trasferiti in un recipiente di estrazione in teflon, al quale sono stati aggiunti 10 mL di HCl 6 N contenente l'1% (m/V) di fenolo. I vessel sono poi stati saturati con gas di azoto; quindi il recipiente è stato chiuso dopo l'introduzione di una sonda in fibra ottica per monitorare la temperatura nel sistema. I parametri operativi impiegati nell'apparato MAE sono stati i seguenti: potenza del magnetron 100%, tempo di rampa della temperatura, 15 min. Durante il funzionamento, sia la temperatura che la pressione sono state monitorate in un singolo recipiente (recipiente di controllo). Sono stati testati diversi programmi di tempo e temperatura per identificare le condizioni ottimali di idrolisi. Le condizioni operative valutate sono riportate nella Tabella 2.

Tabella 2. Condizioni operative testate per l'idrolisi acida della biomassa con microonde.

Tempo (min)	Temperatura (°C)
15	130
15	150
15	170
30	130
30	150
30	170
60	130
60	150
60	170

2.5. Analisi HPLC/MS degli aminoacidi

Gli aminoacidi sono stati quantificati utilizzando il sistema HPLC 1200/MS 6120 (Agilent Technologies). I parametri operativi strumentali sono stati settati così come indicato nel metodo di A. Kennedy and A. Bivens [28], con delle modifiche relative al settaggio della massa. Le condizioni strumentali sono riassunte nella tabella 3.



Tabella 3. Condizioni strumentali HPLC 1200/MS 6120.

Parameter	Value
HPLC	
Column	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 × 100 mm
Mobile phase A	10 % (200 mM ammonium formate in water at pH = 3), 90 % water
Mobile phase B	10 % (200 mM ammonium formate in water at pH = 3), 90 % acetonitrile
Flow rate	0.50 mL/min
Column temperature	25 °C
Injection volume	1 µL
Total run time	15 minutes
Gradient	Time (min)/%B: 0 100 11,5 70 12 100
MS	
Ionization mode	MM-APCI
Polarity	Positive
Percent Cycle Time	25%
Gas temperature	250°C
Vaporizer	200 °C
Drying Gas	12,0 L/min
Nebulizer	35 psi
Capillary voltage	1.500 V
Charge voltage	1.000 V

2.6 Estrazione e quantificazione dei fitormoni

2.6.1 Preparazione standard

Le sostanze standard (purezza > 98%) di acido gibberellico (GA₃), acido indolacetico (IAA), acido abscissico (ABA), acido indolbutirrico (IBA) e chinetina (KN) sono state acquistate da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). I composti standard sono stati preparati così come indicato nel metodo di Spagnuolo et al. [29], solubilizzandoli in MeOH:H₂O (50:50 v / v) a una concentrazione standard di 1000 µg/mL e conservati a 4 °C. Le soluzioni standard di lavoro sono state ottenute diluendole con MeOH:H₂O (50:50 v / v) prima dell'uso.

2.6.2 Preparazione campione

Anche i campioni per la successiva quantificazione tramite analisi con HPLC/MS, sono stati preparati secondo il metodo di Spagnuolo et al. [29], leggermente modificato. 1 g di campione in polvere, precedentemente liofilizzato ed omogeneizzato, è stato infuso in una soluzione di MeOH:H₂O (80:20 v/v) di 4 mL con 1 mmol /L di acido citrico. La soluzione è stata sonicata per 3 cicli da 15 minuti ciascuno.



In seguito la soluzione è stata centrifugata per 10 minuti a 5.000 rpm, il surnatante è stato concentrato e risospeso in metanolo. Il campione è stato filtrato con un filtro per siringa da 0,2 μm di diametro prima dell'iniezione.

2.6.3. Quantificazione dei fitormoni

La quantificazione dei fitormoni è stata eseguita con una HPLC 1200/MS 6120 (Agilent Technologies). Come colonna di separazione è stata utilizzata una colonna Zorbax SB-C18 (Agilent) 4.6 x 250 mm, 5 μm . La fase mobile era composta da: fase mobile A (metanolo:acido acetico 0.5%) e fase mobile B (H₂O, acido acetico 0.5%) rispettivamente al 30% e 70% in gradiente, come segue.

Time (min)	%B
0	70
5,5	50
25	50

Il volume di iniezione era di 20 μL e la velocità di flusso di 1 mL/min. Il rivelatore UV/Vis era impostato a 280 nm.

2.7 Analisi statistica

I dati sono presentati come medie \pm deviazioni standard (SD), delle tre repliche (n=3). In questi esperimenti, le differenze significative ($p < 0,05$) tra le medie sono state determinate mediante analisi della varianza unidirezionale (ANOVA) con test post-hoc di Tukey, utilizzando il software Jmp 16 pro.



3. DISCUSSIONE E RISULTATI

3.1 Caratterizzazione della biomassa

I risultati di analisi termogravimetrica ed analisi elementare dei campioni di *Gracilaria gracilis*, campionati nel mese di luglio 2021 (L-21) e novembre 2022 (N-22) sono presentati nella tabella 4. È inclusa inoltre la caratterizzazione del residuo solido (R.s. N-22) ottenuto a valle dell'estrazione di ficobiliproteine e agar dalla biomassa raccolta a novembre 2022.

Tabella 4. Analisi termogravimetrica ed elementare di *G. gracilis* campionata a luglio 2021 (L-21), novembre 2022 (N-22), e del residuo solido post-estrazione (R.s. N-22). I risultati sono espressi come percentuale sul peso secco (Wt% Dry). I valori rappresentano la media ($n = 3$) \pm deviazione standard.

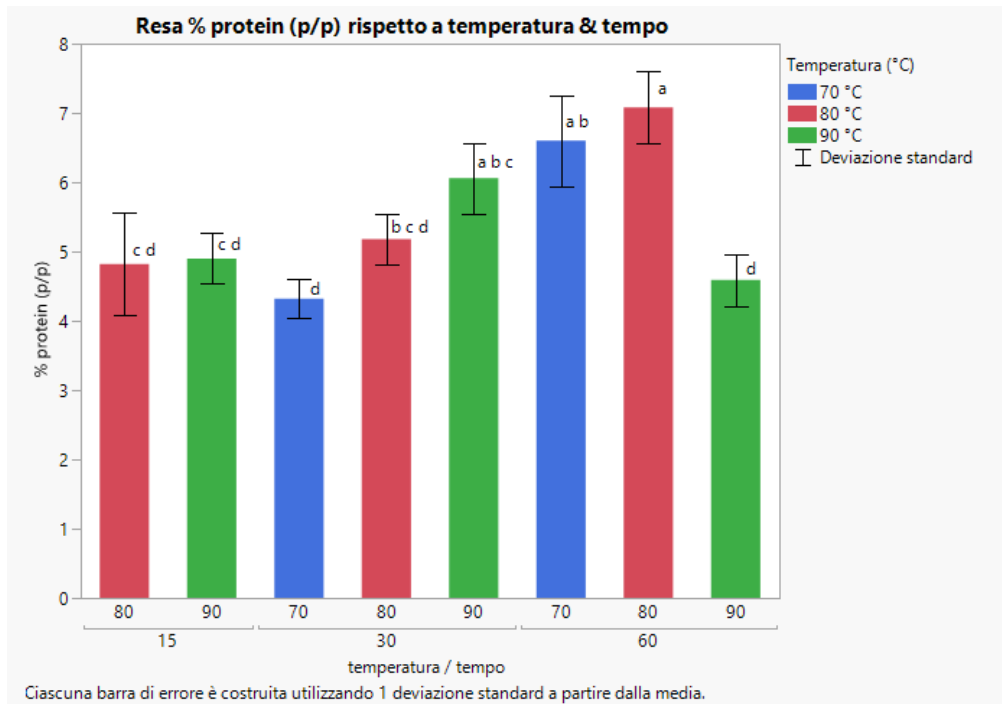
<i>G. gracilis</i>	Ash (%dw)	Carbon (%dw)	Hydrogen (%dw)	Nitrogen (%dw)	Sulfur (%dw)	Oxigen (%dw)
Lug-21 (L)	32,31 \pm 2,12	25,05 \pm 0,91	3,38 \pm 0,14	2,66 \pm 0,19	0,78 \pm 0,15	35,85 \pm 2,32
Nov-22 (N)	25,15 \pm 0,55	32,09 \pm 0,49	5,51 \pm 0,09	4,08 \pm 0,06	1,78 \pm 0,07	31,39 \pm 0,75
R.s. (N)	6,63 \pm 0,75	40,78 \pm 0,20	6,72 \pm 0,04	3,77 \pm 0,02	-	-

A partire dal contenuto di azoto (N%), è possibile stimare il contenuto proteico dei campioni moltiplicando il valore di N% per un fattore di conversione azoto-proteine (NP), pari a 5,1, come suggerito da Angell et al. [30]. Questo approccio consente di ottenere una stima affidabile del tenore proteico della biomassa e del residuo solido, utile per valutare il potenziale biostimolante dell'idrolizzato derivato.

3.2 Idrolisi alcalina con microonde

Il contenuto proteico iniziale stimato della biomassa algale campionata nel mese di luglio 2021 (L-21), risultava essere del 13,57%. I risultati delle prove sperimentali di idrolisi alcalina, condotte secondo le condizioni operative riportate nella Tabella 1, sono illustrati nel grafico 1.

Grafico 1. Resa proteica percentuale (p/p) ottenuta da biomassa algale tramite MAE, in funzione della temperatura e del tempo di trattamento. I valori rappresentano la media (n = 3), con barre di errore corrispondenti a \pm deviazione standard. Lettere diverse sopra le barre indicano differenze statisticamente significative (test di Tukey, $p < 0,05$).



Il grafico evidenzia l'effetto combinato di tempo e temperatura sulla resa proteica dell'idrolizzato.

I risultati indicano una tendenza generale all'aumento della resa proteica con l'incremento sia della temperatura che del tempo di esposizione alle microonde. Per tempi di trattamento più brevi (15 minuti), la differenza nella resa proteica tra le diverse temperature non appaiono statisticamente significative. Ciò suggerisce che per intervalli di tempo limitato la temperatura non esercita una influenza marcata. Tuttavia allungando i tempi di idrolisi si osserva un effetto positivo dell'aumento della temperatura sulla quantità di proteine estratte per temperature di 70°C e 80°C, ma una diminuzione quando le temperature raggiungono i 90°C. In particolare, condizioni di idrolisi a 80°C per 60 minuti, sono state individuate come le condizioni ottimali per ottenere la più alta resa di proteine nell'idrolizzato (7%). Confrontando i risultati con il contenuto proteico iniziale della biomassa algale (13,57%), è possibile affermare che il trattamento che meglio ha permesso di idrolizzare le proteine, partendo dalla biomassa algale tal quale, ha permesso un recupero di circa il 52,16%.



Per l'idrolisi proteica del residuo solido ottenuto dall'estrazione sequenziale di ficobiliproteine e agar, il tempo di trattamento è stato mantenuto costante a 60 minuti — valore ottimizzato in precedenza — mentre sono state testate tre diverse temperature (70 °C, 80 °C e 90 °C) al fine di massimizzare la resa proteica. I risultati ottenuti non hanno evidenziato differenze statisticamente significative tra le temperature esaminate, in linea con quanto osservato per l'idrolisi della biomassa algale tal quale alle temperature di 70 °C e 80 °C. Tuttavia, a differenza di quest'ultima, l'idrolisi del residuo solido ha mostrato un comportamento differente: il trattamento condotto a 90 °C per 60 minuti, che nella biomassa tal quale aveva prodotto la resa più bassa, ha invece determinato la resa proteica più elevata nel residuo (6,37%), corrispondente a un recupero di circa il 90% rispetto al contenuto proteico iniziale nel residuo solido.

La necessità di una temperatura maggiore per ottenere una resa ottimale nel residuo solido potrebbe essere attribuita al significativo cambiamento nella polarità del materiale in seguito alla rimozione dei composti idrofilici come ficobiliproteine e agar. La diminuzione della polarità complessiva del residuo può aver ridotto la sua capacità di assorbire efficientemente l'energia delle microonde, richiedendo temperature più elevate per un riscaldamento efficace e per rendere solubili le proteine alla soluzione alcalina.

3.2.1. Caratterizzazione idrolizzato alcalino

L'idrolizzato proteico ottenuto da *Gracilaria gracilis* mediante trattamento a microonde (80 °C per 60 minuti) è stato sottoposto a diverse analisi chimiche per valutarne la composizione e la conformità ai requisiti normativi previsti per i biostimolanti. I risultati ottenuti sono riassunti nelle tabelle 5, 6, 7 e 8.

Tabella 5. Analisi Elementare di Carbonio e azoto nell'Idrolizzato alcalino da *Gracilaria gracilis* (% p/p peso secco). Tutti i valori sono la media di 3 determinazioni ($x \pm SD$): deviazione standard.

Idrolizzato alcalino		
da <i>G. gracilis</i>	Organic Carbon%	Nitrogen %
	8,3±1,94	1,86±0,07



Tabella 6. Concentrazione di anioni e cationi nell'idrolizzato alcalino da *Gracilaria gracilis* (mg/kg peso secco). Tutti i valori sono la media di 3 determinazioni (x±SD): deviazione standard.

Idrolizzato alcalino	
G.gracilis	mg/Kg
NO ₃	17,04±0,43
PO ₄	1616,08±0,12
SO ₄ ²⁻	40,39±0,98
Na	1647,99±1,52
NH ₄ ⁺	952,73±0,62
K	8570±3,51
Mg	46,55±1,32
Ca	16,93±0,85

Tabella 7. Contenuto di microelementi nell'idrolizzato alcalino da *Gracilaria gracilis* (mg/kg peso secco). Tutti i valori sono la media di 3 determinazioni (x±SD): deviazione standard.

Micro elements	mg/Kg (dry matter)
Mn	5,36±0,02
Fe	9,83±0,1
Zn	26,40±0,34
B	96,62±0,23

Tabella 8. Concentrazione di contaminanti nell'idrolizzato alcalino da *Gracilaria gracilis* e limiti di legge (mg/kg peso secco). Tutti i valori sono la media di 3 determinazioni (x±SD): deviazione standard.

CONTAMINANTS	mg/Kg (dry matter)	Limit Values mg/kg (dry matter)
Cadmium (Cd)	absent	1,5
Hexavalent chromium (Cr VI)	absent	2
Lead (Pb)	absent	120
Mercury (Hg)	0,11±0,02	1
Nickel (Ni)	absent	50
Inorganic arsenic (As)	absent	40
Copper (Cu)	absent	600
Zinc (Zn)	26,40±0,34	1500



L'analisi dettagliata della composizione chimica dell'idrolizzato proteico ottenuto da *Gracilaria gracilis* mediante idrolisi alcalina assistita da microonde (80°C per 60 minuti), presentata nelle tabelle 5, 6, 7 e 8, fornisce una solida base per discutere il suo potenziale come biostimolante agricolo. I risultati rivelano un profilo complesso che integra nutrienti essenziali, microelementi e un'assenza di contaminanti significativi, aspetti cruciali per un'applicazione sicura ed efficace in agricoltura sostenibile.

La tabella 5 riporta il contenuto di azoto totale ($1,86 \pm 0,07\%$) e di carbonio organico ($8,3 \pm 1,94\%$) nell'idrolizzato. Come risaputo, l'azoto è un elemento chiave per la vita delle piante, per la composizione di molecole organiche vitali, la fotosintesi, la crescita della biomassa e la resa delle colture. Una gestione ottimale dell'assorbimento di azoto è fondamentale per massimizzare la produzione e migliorare l'efficienza d'uso dell'azoto (NUE), un aspetto chiave per la sostenibilità agricola e la riduzione degli impatti ambientali negativi legati all'eccesso di fertilizzanti azotati [31]. È dimostrato che quando utilizzati come biostimolanti, gli idrolizzati proteici aiutano a migliorare l'efficienza del metabolismo dell'azoto nelle piante e ottenere rese più elevate [32] [33]. Inoltre anche le modalità di applicazione degli idrolizzati possono influenzare gli effetti sulla pianta [34].

L'analisi del contenuto di anioni e cationi (tabella 6) rivela una composizione ionica interessante. Tra i macroelementi, il potassio (K) presenta la concentrazione più elevata ($8570 \pm 3,51$ mg/Kg), seguito da sodio (Na) e ammonio (NH_4^+). Il fosfato (PO_4^{3-}) è presente in quantità significativa, mentre nitrato (NO_3^-), magnesio (Mg) e calcio (Ca) mostrano concentrazioni inferiori. Questa composizione ionica suggerisce che l'idrolizzato potrebbe apportare diversi macro elementi essenziali per la nutrizione delle piante, sebbene la salinità dovuta all'elevato contenuto di sodio e potassio debba essere attentamente considerata in applicazioni agricole, suggerendo la necessità di importanti diluizioni dell'idrolizzato prima dell'applicazione.

La Tabella 7 illustra il contenuto di microelementi essenziali. Zinco (Zn) e boro (B) sono presenti in concentrazioni relativamente elevate, seguiti da manganese (Mn) e ferro (Fe). L'applicazione di micro elementi, anche se applicati in tracce ha dimostrato avere effetti positivi. Ad esempio applicati su cavolo rosso hanno dimostrato aumentarne la crescita, la resa, la qualità e l'attitudine alla conservazione [35].



L'applicazione fogliare della miscela di microelementi (Zn, B, Fe) ha dimostrato di avere un effetto altamente positivo e migliorativo sulla crescita vegetativa, sulla resa, sulla qualità (inclusi contenuti nutrizionali e riduzione di nitrati/nitriti) del cavolfiore [36].

W. Karol et al. [37], hanno dimostrato che fertilizzanti minerali quando applicati in combinazione con un biostimolante a base di alghe marine, hanno effetti su graminacee e leguminose principalmente in termini di resa (aumentata fino al 40%), sulla composizione botanica e presenza di erbe infestanti, e sul contenuto di macro elementi.

L'applicazione fogliare di micro elementi (Cu, Mn, Mo, Zn) sull'orzo primaverile da malto ha generalmente migliorato la resa in granella e delle sue componenti, con effetti variabili a seconda del microelemento e della fertilizzazione di base. Mo e Zn hanno prodotto le rese più elevate. L'altezza della pianta è diminuita, mentre il numero di culmi produttivi e di spighe sono aumentati, come anche il peso della granella [38].

Infine la tabella 8 analizza la presenza di potenziali contaminanti. Cadmio (Cd), cromo esavalente (Cr VI), piombo (Pb), nichel (Ni), rame (Cu) e arsenico (As) sono risultati assenti. Il mercurio (Hg) è stato rilevato a una concentrazione di $0,11 \pm 0,02$ mg/kg (peso secco), valore significativamente inferiore al limite massimo consentito di 1 mg/kg, mentre lo zinco (Zn) è stato rilevato a una concentrazione di $26,40 \pm 0,34$ mg/kg (peso secco, inferiore rispetto a 1.500 mg/Kg del limite di legge. I metalli pesanti sono noti per il loro impatto negativo sulla salute umana e sull'ambiente. Infatti quando presenti contaminano il suolo, vengono assorbiti e bioaccumulati dalle piante, propagandosi nella catena alimentare; inoltre, la contaminazione del suolo da metalli pesanti può causare danni ecologici e compromettere la qualità dell'acqua [39]. Quindi il rispetto dei limiti di legge per questi contaminanti è un prerequisito fondamentale per la sua applicazione agricola su larga scala.

3.3 Idrolisi degli aminoacidi

3.3.1 Idrolisi albumina sierica bovina (BSA)

La soluzione, dopo aver subito il processo di idrolisi, è stata centrifugata, l'estratto è stato filtrato utilizzando un filtro per siringa in nylon da $0,22 \mu\text{m}$ e trasferito in vial prima dell'iniezione. Per ottimizzare il metodo di idrolisi acida assistita da microonde, è stata utilizzata l'albumina sierica bovina (BSA) come proteina modello.



La composizione teorica degli aminoacidi della BSA è stata calcolata sulla base delle sequenze dei residui proteici, come riportato da E. Marconi et al. [40], ed è espressa in percentuale sul totale degli aminoacidi. La Tabella 9 riporta il confronto tra questa composizione teorica e quella ottenuta tramite il metodo di idrolisi convenzionale (110 °C per 24 ore). Gli aminoacidi asparagina, glutammina e triptofano non sono stati inclusi nell'analisi, in quanto assenti nel multi-standard utilizzato per la calibrazione del metodo con HPLC/MS.

Tabella 9. Composizione teorica e sperimentale (idrolisi convenzionale) della BSA – percentuali riferite al peso totale di aminoacidi. (Le percentuali teoriche sono da letteratura, mentre quelle sperimentali sono quelle ottenute con il metodo convenzionale.)

Amino acid name	Amino acid teorico %	Amino acid % Conventional method
Phenilalanine	5,81	4,37±0,08
Leucine	10,43	8,32±0,07
Isoleucine	2,39	2,05±0,01
Methionine	0,78	0,52±0,02
Tyrosine	4,49	2,95±0,17
Valine	5,5	3,8±0,06
Proline	4,2	1,55±0,39
Alanine	5,33	2,87±0,15
Threonine	5,28	3,69±0,09
Glycine	1,57	1,23±0,14
Serine	3,83	2,66±0,13
Glutamic acid	11,31	8,15±0,79
Aspartic acid	7,11	5,69±0,44
Histidine	3,44	2,77±0,28
Arginine	5,22	3,86±0,36
Lysine	11,23	7,65±0,30
Cystine	5,53	3,27±0,57
Tot	93,45	65,41±4,05

Il profilo aminoacidico ottenuto con il metodo convenzionale è stato assunto come riferimento (100% di recupero). I risultati delle idrolisi assistite da microonde, eseguite in diverse condizioni di tempo e temperatura, sono stati confrontati con questi valori e presentati come percentuale di recupero rispetto al metodo di riferimento. I dati sono riportati nella tabella 10, espressi come media ± deviazione standard.

Tabella 10. Percentuale di recupero degli aminoacidi dopo idrolisi acida della BSA: confronto tra metodo convenzionale e metodo a microonde in diverse condizioni di tempo e temperatura.

Amino acid	Conventional method	Microwave method								
	110°C x 24 h	130°C x 15 min	150°C x 15 min	170°C x 15 min	130°C x 30 min	150°C x 30 min	170°C x 30 min	130°C x 60 min	150°C x 60 min	170°C x 60 min
	Amino acid %	% recupero aminoacidi								
Phenilalanine	100	44,15±0,29	83,24±0,05	92,23±0,01	68,56±0,11	85,8±0,101	86,55±0,07	77,24±0,13	86,48±0,13	88,79±0,15
Leucine	100	42,26±0,27	87,52±0,01	89,58±0,04	67,04±0,10	83,96±0,11	83,18±0,28	74,04±0,15	86,32±0,31	87,53±0,21
Isoleucine	100	30,6±0,11	78,68±0,01	101,33±0,03	56,11±0,12	91,05±0,09	96,26±0,06	72,39±0,18	96,07±0,09	102,15±0,09
Methionine	100	5,72±0,12	50,2±0,03	88,5±0,01	86,75±12	87,02±0,12	83,76±0,03	78,34±0,06	84,53±0,25	90,79±0,12
Tyrosine	100	19,41±0,17	58,98±0,01	41,04±0,02	29,37±0,16	33,31±0,18	38,79±0,08	30,05±0,17	46,14±0,15	34,9±0,19
Valine	100	46,65±0,13	92,55±0,07	134,01±0,01	75,8±0,17	96,89±0,16	129,03±0,08	96,9±0,09	122,32±0,09	134,95±0,1
Proline	100	62,35±0,18	102,21±0,08	97,38±0,40	90,57±0,41	102,08±0,36	94,96±0,16	94,68±0,21	87,45±0,37	100,99±0,09
Alanine	100	82,14±0,10	126,56±0,02	127,06±0,11	115,72±0,22	121,79±0,2	116,28±0,08	110,93±0,16	113,25±0,15	117,19±0,21
Threonine	100	24,36±0,18	84,39±0,05	57,61±0,04	45,41±0,27	60,04±0,25	44,01±0,05	52,05±0,29	50,61±0,16	40,37±0,32
Glycine	100	170,12±0,21	225,4±0,03	180,38±0,14	173,98±0,29	172,11±0,29	169,19±0,02	176,61±0,08	169,56±0,36	177,12±0,01
Serine	100	60,06±0,99	88,91±0,02	76,18±0,01	86,9±0,01	91±0,01	61,15±0,05	90,14±0,13	79,13±0,19	46,5±0,69
Glutamic acid	100	62,41±0,83	23,84±0,04	121,8±0,49	98,03±0,65	119,95±0,71	114,42±0,06	111,54±0,63	114,65±0,63	121,34±0,55
Aspartic acid	100	60,23±0,23	35,07±0,07	108,12±0,24	104±0,78	105,04±0,88	100,94±0,32	105,04±0,52	104,23±0,21	113,05±0,14
Histidine	100	20,89±0,40	104,23±0,03	58,73±0,09	46,81±0,91	60,55±0,60	58,5±0,12	53,03±0,31	60,23±0,12	63,55±0,71
Arginine	100	34,23±0,63	44,27±0,52	84,48±0,02	64,71±0,15	79,85±0,14	81,68±0,18	75,03±0,5	82,62±0,41	83,33±0,35
Lysine	100	46,93±0,26	75,1±0,03	97,69±0,07	75,09±0,24	96,16±0,20	94,14±0,08	75,68±0,09	97,51±0,31	98,6±0,33
Cystine	100	0,00	0,00	21,52±0,44	22,99±0,55	20,79±0,48	0,00	31,03±0,52	20,41±0,32	0,00
Tot %	100	46,43±3,03	70,03±4,38	92,19±5,78	73,73±5,65	87,79±5,57	86,15±5,38	80,06±5,07	88,13±5,56	89,55±5,67

Il metodo convenzionale ha mostrato un recupero complessivo pari a $65,41 \pm 4,05\%$. Questo valore è stato assunto come riferimento (100%) per gli aminoacidi estraibili al fine di valutare l'efficienza estrattiva dei metodi di idrolisi a microonde. Tuttavia, è noto che questo metodo può portare a una sottostima di alcuni aminoacidi, come la cistina e il triptofano (non riportato), a causa della loro parziale o totale degradazione durante il processo. La cistina, ad esempio, è stata quantificata con una resa del 3,27%, ma questo valore potrebbe essere sottostimato, non riflettendo la sua reale presenza nel campione.

Osservando le idrolisi eseguite al microonde si nota una tendenza generale all'aumento del recupero totale degli aminoacidi con l'aumentare della temperatura, specialmente per tempi di trattamento più brevi (15 e 30 minuti). Osservando il recupero % dei singoli aminoacidi si osserva che:

- gli aminoacidi acidi (aspartico e glutammico) tendono ad avere un buon recupero molto vicino e in alcuni casi superiori a quello ottenuto mediante idrolisi convenzionale;
- gli aminoacidi basici (istidina, arginina, lisina) mostrano un recupero ottimale con l'idrolisi a microonde a temperature di 150°C;



-gli aminoacidi apolari (fenilalanina, leucina, isoleucina, valina) mostrano un recupero variabile a seconda delle condizioni. In generale, temperature più elevate sembrano favorire il loro rilascio;

-gli aminoacidi polari (serina, treonina, tirosina), come previsto, in quanto sensibili alla degradazione acida, mostrano una certa variabilità di recupero.

-aminoacidi con catene laterali R (prolina, alanina, glicina), contrariamente alla tendenza generale, mostrano un recupero particolarmente elevato in molte delle condizioni di idrolisi a microonde, spesso superando notevolmente il 100% rispetto al metodo convenzionale. L'idrolisi a microonde potrebbe indurre una degradazione di questi aminoacidi portando a una potenziale sovrastima durante la quantificazione. Pertanto, i valori elevati di recupero osservati per questi aminoacidi potrebbero non riflettere un'estrazione più efficiente, ma piuttosto la formazione di prodotti di degradazione.

-Metionina e Cistina. La metionina mostra un recupero variabile, potenzialmente a causa dell'ossidazione. La cistina, notoriamente instabile, mostra un recupero molto basso o nullo in molte condizioni a microonde, suggerendo una sua rapida degradazione anche con questo metodo. La sua assenza in alcune condizioni potrebbe essere dovuta alla completa distruzione.

La scelta delle condizioni di idrolisi a microonde a 150 °C per 30 minuti come metodo ottimale rappresenta un compromesso ponderato tra diversi fattori cruciali: tempo di analisi, recupero complessivo degli aminoacidi e minimizzazione della potenziale sovrastima, in particolare per gli aminoacidi prolina, alanina e glicina.

Per questo le successive idrolisi aminoacidiche sulla biomassa algale sono state eseguite in queste condizioni.



3.3.2. Idrolisi *Gracilaria gracilis*

Il metodo di idrolisi al microonde è stato impiegato per analizzare il profilo aminoacidico di *Gracilaria gracilis* e delle sue frazioni derivate. L'analisi ha riguardato cinque matrici: la biomassa di partenza, il residuo solido dopo l'estrazione di ficobiliproteine e agar, l'idrolizzato alcalino ottenuto con KOH (80 °C per 60 minuti), il residuo solido post-idrolisi e la frazione solubile di aminoacidi liberi nell'idrolizzato alcalino. I risultati sono riassunti nella tabella 11.

Tabella 11. Composizione aminoacidica (g/100 g peso secco \pm deviazione standard, n=3) di *Gracilaria gracilis* e delle sue frazioni processate.

Aminoacid name	Aminoacid G.gracilis (%dw)	R.s. post estrazione FBP e agar (%dw)	Idrolizzato KOH 80°Cx60' (%dw)	R.s.post ext FBP ,AGAR e idrolisi KOH (%dw)	Aa liberi in soluzione di idrolizzato in KOH (%dw)
Phenilalanine	0,762 \pm 0,082	0,71 \pm 0,010	0,397 \pm 0,005	0,284 \pm 0,025	0,008 \pm 0,002
Leucine	0,978 \pm 0,092	0,720 \pm 0,026	0,427 \pm 0,028	0,251 \pm 0,011	0,008 \pm 0,002
Isoleucine	0,521 \pm 0,233	0,716 \pm 0,022	0,469 \pm 0,019	0,169 \pm 0,008	0,002 \pm 0,001
Methionine	1,11 \pm 0,512	0,248 \pm 0,021	0,068 \pm 0,006	0,086 \pm 0,020	0,002 \pm 0,001
Tyrosine	0,36 \pm 0,037	0,0832 \pm 0,005	n.d.	n.d.	0,003 \pm 0,001
Valine	0,862 \pm 0,158	1,251 \pm 0,105	0,813 \pm 0,16	n.d.	0,005 \pm 0,001
Proline	0,252 \pm 0,2	0,430 \pm 0,021	0,179 \pm 0,035	0,219 \pm 0,009	0,002 \pm 0,005
Alanine	0,752 \pm 0,035	0,855 \pm 0,166	0,376 \pm 0,050	0,381 \pm 0,204	0,004 \pm 0,012
Threonine	0,675 \pm 0,091	0,272 \pm 0,025	0,0457 \pm 0,017	0,060 \pm 0,009	0,027 \pm 0,004
Glycine	0,71 \pm 0,142	0,846 \pm 0,249	0,725 \pm 0,069	0,931 \pm 0,10	0,131 \pm 0,011
Serine	0,742 \pm 0,086	0,678 \pm 0,013	0,151 \pm 0,122	0,248 \pm 0,044	0,100 \pm 0,007
Glutamic acid	1,595 \pm 0,102	0,786 \pm 0,014	0,370 \pm 0,002	0,164 \pm 0,013	0,021 \pm 0,005
Aspartic acid	1,402 \pm 0,071	0,805 \pm 0,038	0,693 \pm 0,055	0,612 \pm 0,001	0,0445 \pm 0,007
Histidine	0,121 \pm 0,012	0,0154 \pm 0,003	n.d.	n.d.	n.d.
Arginine	0,363 \pm 0,480	0,489 \pm 0,039	0,071 \pm 0,016	0,000	0,006 \pm 0,001
Lysine	0,399 \pm 0,072	0,497 \pm 0,017	0,235 \pm 0,010	0,123 \pm 0,001	0,005 \pm 0,001
Cystine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TOTALE	11,58\pm0,834	9,403\pm0,327	5,022\pm0,232	3,528\pm0,235	0,367\pm0,021

Questi dati offrono una panoramica completa della distribuzione degli aminoacidi nelle varie frazioni algali nel corso del processo di bioraffineria.

La composizione aminoacidica della biomassa algale di partenza trattata con idrolisi al microonde (150 °C per 30 minuti) risulta coerente con quella riportata da Abdullah Rasyid et al. [41], che avevano eseguito l'idrolisi con metodo convenzionale (110 °C x 22 h).



Questo confronto suggerisce che l'idrolisi a microonde, nelle condizioni ottimizzate del nostro esperimento, è un metodo efficace per l'estrazione degli aminoacidi da *Gracilaria gracilis*, fornendo un profilo comparabile a quello ottenuto con tecniche di idrolisi convenzionali. La cistina non è stata rilevata poiché probabilmente degradata durante il processo di idrolisi acida.

Il residuo solido, ottenuto dopo l'estrazione delle ficobiliproteine e dell'agar, mostra una diminuzione generale nella concentrazione di molti aminoacidi rispetto alla biomassa di partenza, indicando che una parte delle proteine è stata solubilizzata ed estratta. Tuttavia, il residuo solido, pur avendo un contenuto proteico totale inferiore rispetto alla biomassa di partenza, rimane una fonte significativa di aminoacidi che fanno parte di quelle proteine strutturali, meno solubili, che non vengono estratte con il processo di estrazione delle ficobiliproteine.

L'idrolisi alcalina con KOH ha prodotto un idrolizzato contenente circa il 5% di aminoacidi totali, di cui lo 0,36% si presenta sotto forma di aminoacidi liberi. Gli aminoacidi liberi rappresentano quella frazione di aminoacidi biodisponibili che possono essere rapidamente assorbiti dalla pianta. Sebbene la concentrazione totale sia bassa la presenza di alcuni aminoacidi come fenilalanina, prolina, valina e alanina suggerisce un possibile effetto biostimolante dell'idrolizzato [42].

Il residuo solido finale, risultante dal completamento dell'intero processo di bioraffineria, conserva ancora un discreto contenuto di aminoacidi ($3,528 \pm 0,235$ g/100 g peso secco). Sebbene meno "ricco" rispetto alle altre frazioni, esso potrebbe comunque essere valorizzato in ambito agricolo, ad esempio come ammendante organico o come matrice per il rilascio lento di azoto. Per confermare queste potenzialità, sarà necessario condurre ulteriori caratterizzazioni, in particolare per determinarne la composizione in carboidrati complessi, la presenza di eventuali composti fitotossici e la sua degradabilità nel suolo, per un importante passo verso la messa a punto di un processo di bioraffineria a ciclo completo.

3.4 Quantificazione dei fitormoni

La concentrazione dei fitormoni presenti in *Gracilaria gracilis*, determinata mediante HPLC-MS, secondo i protocolli descritti, è riportata nella tabella 12.



Tabella 12. Concentrazione di fitormoni (GA₃, IAA, ABA, IBA, KN) di *G. gracilis* (in µg g⁻¹ dw).

PGR	µg/g
acido giberellico	4,6±0,14
acido 3-indolacetico	2,3±0,08
acido abscissico	3,5±0,01
acido 3-indolobutirrico	2,7±0,18
chinetina	n.d.

L'analisi ha evidenziato la presenza di vari fitormoni nella biomassa di *G. gracilis*. L'acido giberellico (GA₃) è emerso come il fitormone presente in maggiore concentrazione, seguito da acido abscissico (ABA), acido 3-indolobutirrico (IBA) e acido 3-indolacetico (IAA) con concentrazioni leggermente inferiori. Le concentrazioni di IAA e GA₃ si sono dimostrate coerenti con quanto riportato per altre specie appartenenti alla famiglia delle *Gracilariaceae* [43].

L'assenza di chinetina, un regolatore chiave della divisione cellulare, è in linea con quanto osservato in altre specie algali come *Sargassum tenerrimum* e *Gracilaria edulis* [44].

Tuttavia, la letteratura evidenzia una notevole variabilità del profilo fitormonale tra diverse specie di alghe rosse. Ad esempio, concentrazioni più elevate, rispetto i nostri valori, di GA₃ e IAA sono state riscontrate in *Hypnea corona* e *Spryridia filamentosa* [31].

Lo studio di Yalçın et al. [45], ha messo in luce la distribuzione eterogenea dei fitormoni in diverse alghe rosse, come *Halopithys incurva*, *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ellisolandia elongata* e *Polysiphonia scopulorum*. In tale studio, la chinetina è risultata generalmente assente o in tracce, tranne che in *Polysiphonia scopulorum*, dove è stata rilevata in concentrazioni relativamente alte. Anche la gibberellina (GA₃) era spesso assente o al di sotto del limite di rilevabilità. L'acido abscissico (ABA) era invece sempre presente, seppure in concentrazioni variabili, mentre l'IAA risultava essere il fitormone più abbondante. Relativamente alle citochinine, come zeatina (Z) e 6-benzilamminopurina (BAP), esse sono state rilevate solo in alcune specie, suggerendo una distribuzione non omogenea di questi regolatori della crescita nelle Rhodophyta. Tali risultati suggeriscono un potenziale coinvolgimento di diverse forme di citochinine nella regolazione della crescita e dello sviluppo. La loro distribuzione variabile tra le specie evidenzia la complessità dei profili fitormonali nelle Rhodophyta.



In un ulteriore studio, Nair S. Yokoya et al. [46], hanno analizzato l'attività citochinina-simile (CK-like) in estratti di varie alghe rosse, tra cui *Gelidium floridanum*, *Gracilaria birdiae*, *Gracilaria cervicornis*, *Gracilaria domingensis*, *Gracilaria tenuistipitata*, *Chondracanthus teedei*, *Hypnea pseudomusciformis* e *Dichotomaria marginata*. Tra queste, *Gracilaria cervicornis* ha evidenziato la più alta attività CK-like (equivalente a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ di chinetina), mentre le altre specie hanno mostrato un'attività compresa tra 1 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Koji Mikami et al. [47], hanno esplorato il profilo ormonale di *Pyropia yezoensis* e *Bangia fuscopurpurea*, rilevando la presenza endogena di IAA (in particolare in *P. yezoensis*), iP, ABA e acido salicilico (SA), ma non di altri fitormoni comuni come tZ, DHZ, gibberelline e jasmonati. L'analisi genomica ha indicato che queste specie possiedono i geni per sintetizzare determinati fitormoni, ma non quelli per i relativi recettori, suggerendo meccanismi di segnalazione ormonale marcatamente differenti da quelli delle piante terrestri.

In conclusione, emerge che, pur potendo riscontrare alcune similarità a livello di gruppo tassonomico, le alghe non presentano un profilo univoco di regolatori della crescita. La presenza e la concentrazione dei fitormoni variano significativamente in base alla specie, al genere, oltre che in base alla fase fenologica dell'alga al momento della raccolta. Questa eterogeneità sottolinea la necessità di studi specifici per ciascuna specie al fine di comprendere appieno il suo potenziale biostimolante.

3.5 Conclusioni e prospettive future: può l'estratto di *Gracilaria gracilis* essere utilizzato come biostimolante?

I risultati ottenuti in questo studio supportano l'ipotesi che *Gracilaria gracilis* può rappresentare un ottimo punto di partenza per la formulazione di biostimolanti destinati all'agricoltura sostenibile.

L'idrolisi alcalina assistita da microonde ha permesso di ottenere un idrolizzato proteico caratterizzato da un ottimo contenuto di azoto, un interessante profilo di aminoacidi liberi prontamente disponibili e la presenza di macro e micro elementi essenziali per l'accrescimento delle piante. Inoltre, la totale assenza di alcuni contaminanti o la presenza al di sotto dei limiti normativi critici di altri, attesta la sicurezza per un impiego in agricoltura.



L'analisi dei fitormoni ha evidenziato la presenza di regolatori della crescita come acido gibberellico, acido abscissico, acido indolacetico e acido indolbutirrico, confermando ulteriormente il potenziale biostimolante dell'estratto. Tali composti, notoriamente coinvolti nella regolazione di processi fisiologici fondamentali quali la germinazione, la crescita vegetativa, lo sviluppo radicale e la tolleranza agli stress abiotici, possono sinergicamente contribuire al miglioramento della produttività e della qualità delle colture.

Un aspetto particolarmente rilevante di questo lavoro è rappresentato dal concetto di bioraffineria algale. Infatti, dopo l'estrazione dalla biomassa di partenza di composti ad elevato valore aggiunto, quali ficobiliproteine e agar, il residuo solido rimanente viene utilizzato per la produzione dell'idrolizzato proteico. Questo approccio "a cascata", massimizza l'efficienza d'uso della risorsa marina e minimizza la produzione di scarti, allineandosi ai principi dell'economia circolare.

Inoltre, anche il residuo solido rimanente a valle del processo estrattivo sequenziale presenta ancora un profilo biochimico interessante, segno che potrebbe rappresentare un'interessante risorsa per applicazioni secondarie in agricoltura.

Alla luce dei dati sperimentali, si può concludere che *Gracilaria gracilis* rappresenta una matrice naturale di elevato interesse per la produzione di biostimolanti multifunzionali, sostenibili e conformi alle normative europee vigenti. Tuttavia, per una piena validazione dell'efficacia agronomica dell'estratto, saranno necessari ulteriori studi in vivo su diverse colture, in condizioni controllate e di campo, in linea con le direttive CEN/TS 17700. Prospettive future includono l'ottimizzazione delle modalità di applicazione, la valutazione della persistenza degli effetti e l'eventuale formulazione commerciale del prodotto, contribuendo a promuovere pratiche agricole più sostenibili.



4. Bibliografia

1. Win, T. T., Barone, G. D., Secundo, F., & Fu, P. (2018). Algal biofertilizers and plant growth stimulants for sustainable agriculture. *Industrial Biotechnology*, 14(4), 203-211.
2. Regulation (EU) 2019/1009 of the European Parliament and of the Council of 5 June 2019 Laying down Rules on the Making Available on the Market of EU Fertilising Products and Amending Regulations (EC) No 1069/2009 and (EC) No 1107/2009 and Repealing Regulation (EC) No 2003/2003.
3. Roupheal, Y., & Colla, G. (2020). Toward a sustainable agriculture through plant biostimulants: From experimental data to practical applications. *Agronomy*, 10(10), 1461.
4. Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia horticultrae*, 196, 3-14.
5. Fleurence, J., Morançais, M., & Dumay, J. (2018). Seaweed proteins. In *Proteins in food processing* (pp. 245-262). Woodhead Publishing.
6. Pliego-Cortés, H., Wijesekara, I., Lang, M., Bourgougnon, N., & Bedoux, G. (2020). Current knowledge and challenges in extraction, characterization and bioactivity of seaweed protein and seaweed-derived proteins. *Advances in botanical research*, 95, 289-326.
7. Naseri, A., Marinho, G. S., Holdt, S. L., Bartela, J. M., & Jacobsen, C. (2020). Enzyme-assisted extraction and characterization of protein from red seaweed *Palmaria palmata*. *Algal Research*, 47, 101849.
8. Echave, J., Fraga-Corral, M., Garcia-Perez, P., Popović-Djordjević, J., H. Avdović, E., Radulović, M., Xiao, J., A. Prieto, M., & Simal-Gandara, J. (2021). Seaweed Protein Hydrolysates and Bioactive Peptides: Extraction, Purification, and Applications. *Marine Drugs*, 19(9), 500.
9. Thiviya, P., Gamage, A., Gama-Arachchige, N. S., Merah, O., & Madhujith, T. (2022). Seaweeds as a source of functional proteins. *Phycology*, 2(2), 216-243.
10. Rawiwan, P., Peng, Y., Paramayuda, I. G. P. B., & Quek, S. Y. (2022). Red seaweed: A promising alternative protein source for global food sustainability. *Trends in Food Science & Technology*, 123, 37-56.



11. De Souza Celente, G., Sui, Y., & Acharya, P. (2023). Seaweed as an alternative protein source: Prospective protein extraction technologies. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 86, 103374.
12. Colla, G., Nardi, S., Cardarelli, M., Ertani, A., Lucini, L., Canaguier, R., & Rouphael, Y. (2015). Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 28-38.
13. Sierras, N., Botta, A., Staasing, L., Martinez, M. J., & Bru, R. (2015, November). Understanding the effect of amino acids based biostimulant by an enantiomeric analysis of their active principles and a proteomic profiling approach. *In II World Congress on the Use of Biostimulants in Agriculture 1148* (pp. 93-100).
14. Zewail, R. M. Y. (2014). Effect of seaweed extract and amino acids on growth and productivity and some biocostituents of common bean (*Phaseolus vulgaris* L) plants. *Journal of Plant Production*, 5(8), 1441-1453.
15. Marhoon, I. A., & Abbas, M. K. (2015). Effect of foliar application of seaweed extract and amino acids on some vegetative and anatomical characters of two sweet pepper (*Capsicum annum* L.) cultivars. *International Journal of Research Studies in Agricultural Sciences*, 1(1), 35-44.
16. Wang, X., Zhang, Y., Xu, W., Cheng, J., Liu, J., Pei, W., Wang, J., & Chuang, S. (2023). Amino acid fertilizer strengthens its effect on crop yield and quality by recruiting beneficial rhizosphere microbes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 103(12), 5970-5980.
17. El-Sese, A. M., Mohamed, A. K. A., Abou-Zaid, E. A., & Abd-El-Ghany, A. M. M. (2020). Impact of foliar application with seaweed extract, amino acids and vitamins on yield and berry quality of some Grapevine cultivars. *SVU-International Journal of Agricultural Sciences*, 2(1), 73-84.
18. Sajjad, Y., Jaskani, M. J., Asif, M., & Qasim, M. (2017). Application of plant growth regulators in ornamental plants: a review. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 54(2).
19. Kapoore, R. V., Wood, E. E., & Llewellyn, C. A. (2021). Algae biostimulants: A critical look at microalgal biostimulants for sustainable agricultural practices. *Biotechnology Advances*, 49, 107754.



20. Regolamento (CE) n 2003/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio del 13 ottobre 2003 *relativo ai concimi (e successive modifiche)*. G.U. dell'Unione europea IT L 304/1 del 21.11.2003.
21. Lgs, D. (2010). 75/2010. *Decreto Legislativo, (75), 2010.*
22. European Committee for Standardization. (2022). CEN/TS 17700:2022(1-5) – *Technical specification-plant biostimulants*. CEN.
23. European Commission. Farm to Fork Strategy- *For a fair, healthy and environmentally-friendly food system*. (2020).
24. Waterborg, J. H., & Matthews, H. R. (1994). The Lowry method for protein quantitation. *Basic protein and peptide protocols*, 1-4.
25. Rutherford, S. M., & Gilani, G. S. (2009). Amino acid analysis. *Current protocols in protein science*, 58(1), 11-9.
26. Weber, P. (2022). Determination of amino acids in food and feed by microwave hydrolysis and UHPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 1209, 123429.
27. Barbarino, E., & Lourenço, S. O. (2005). An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro-and microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 17, 447-460.
28. Kennedy, A., & Bivens, A. (2017). Methods for the analysis of underivatized amino acids by LC/MS. *Application Note*.
29. Spagnuolo, D., Russo, V., Manghisi, A., Di Martino, A., Morabito, M., Genovese, G., & Trifilò, P. (2022). Screening on the presence of plant growth regulators in high biomass forming seaweeds from the Ionian Sea (Mediterranean Sea). *Sustainability*, 14(7), 3914.
30. Angell, A. R., Mata, L., de Nys, R., & Paul, N. A. (2016). The protein content of seaweeds: a universal nitrogen-to-protein conversion factor of five. *Journal of applied phycology*, 28, 511-524.
31. Fathi, A. (2022). Role of nitrogen (N) in plant growth, photosynthesis pigments, and N use efficiency: A review. Zenodo (CERN European Organization for Nuclear Research).
32. Engel, D. C. H., Feltrim, D., Rodrigues, M., Baptistella, J. L. C., & Mazzafera, P. (2024). Application of protein hydrolysate improved the productivity of soybean under greenhouse cultivation. *Agriculture*, 14(8), 1205.



33. Choi, S., Colla, G., Cardarelli, M., & Kim, H. J. (2025). Effects of vegetal protein hydrolysate application method, nitrogen level, and nitrate-to-ammonium ratio on growth and composition of hydroponic lettuce. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 105(1), 599-610.
34. Pasković, I., Popović, L., Pongrac, P., Polić Pasković, M., Kos, T., Jovanov, P., & Franić, M. (2024). Protein Hydrolysates—Production, Effects on Plant Metabolism, and Use in Agriculture. *Horticulturae*, 10(10), 1041.
35. Abd El-Hady, M. A., & Doklega, S. M. (2023). Effect of spraying some microelements and bio-stimulants on yield, quality and storage ability of red cabbage heads. *Egyptian Journal of Horticulture*, 50(1), 109-122.
36. Abdel Nabi, H. M. A., El-Gamily, E. I., & El-Amoushi, A. A. R. A. (2020). Organic fertilization and foliar application with some microelements and biostimulants effects on productivity and quality of cauliflower. *Journal of Plant Production*, 11(1), 41-47.
37. Wolski, K., Biernacik, M., Swierszcz, S., Talar-Krasa, M., & Leshchenko, O. (2019). Effect of the application of a biostimulant and mineral fertilization on the mineral element concentration in the sward of forage mixtures cultivated on light soil. *Journal of Elementology*, 24(1).
38. Stadnik, B., Tobiasz-Salach, R., & Migut, D. (2024). Influence of Foliar Application of Microelements on Yield and Yield Components of Spring Malting Barley. *Agriculture*, 14(3), 505.
39. Tóth, G., Hermann, T., Da Silva, M. R., & Montanarella, L. J. E. I. (2016). Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. *Environment international*, 88, 299-309.
40. Marconi, E., Panfili, G., Bruschi, L., Vivanti, V., & Pizzoferrato, L. (1995). Comparative study on microwave and conventional methods for protein hydrolysis in food. *Amino Acids*, 8(2), 201-208.
41. Rasyid, A., Ardiansyah, A., & Pangestuti, R. (2019). Nutrient composition of dried seaweed *Gracilaria gracilis*. *Indonesian Journal of Marine Science* 24(1), 1-6.
42. Sun, W., Shahrajabian, M. H., Kuang, Y., & Wang, N. (2024). Amino acids biostimulants and protein hydrolysates in agricultural sciences. *Plants*, 13(2), 210.



43. Sambhwani, K., Mathukiya, G., Dawange, P. S., Sequeira, R. A., Prasad, K., & Mantri, V. A. (2022). Analysis of functional traits in *Gracilaria dura* (Rhodophyta: Gracilariaceae) reveals variation in wild and farmed populations. *Journal of Applied Phycology*, 34(2), 1017-1031.
44. Prasad, K., Das, A. K., Oza, M. D., Brahmabhatt, H., Siddhanta, A. K., Meena, R., Eswaran, K., Rajyaguru, M. R., & Ghosh, P. K. (2010). Detection and Quantification of Some Plant Growth Regulators in a Seaweed-Based Foliar Spray Employing a Mass Spectrometric Technique sans Chromatographic Separation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4594–4601.
45. Yalçın, S., Okudan, E. Ş., Karakaş, Ö., & Önem, A. N. (2020). Determination of major phytohormones in fourteen different seaweeds utilizing SPE–LC–MS/MS. *Journal of Chromatographic Science*, 58(2), 98-108.
46. Yokoya, N. S., Stirk, W. A., & van Staden, J. (2024). Cytokinin-like activity of some species of Rhodophyta from tropical and subtropical waters. *Journal of Applied Phycology*, 36(2), 757-764.
47. Mikami, K., Mori, I. C., Matsuura, T., Ikeda, Y., Kojima, M., Sakakibara, H., & Hirayama, T. (2016). Comprehensive quantification and genome survey reveal the presence of novel phytohormone action modes in red seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 28, 2539-2548