



49° Congresso della Società Italiana di Biologia Marina

Cesenatico (FC), 4-8 giugno 2018



VOLUME DEI PRE-PRINT

A. NICCOLAI, G. CHINI ZITTELLI¹, L. RODOLFI, N. BIONDI, F. TULLI²,
E. TIBALDI², M.R. TREDICI

Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agroalimentari e dell'Ambiente (DISPAA), Università di Firenze,
Piazzale delle Cascine, 18 - 50144 Firenze, Italia.
alberto.niccolai@unifi.it

¹Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, CNR, Sesto Fiorentino (FI), Italia.

²Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali ed Animali (DI4A), Università di Udine,
Via Sondrio, 2 - 33100 Udine, Italia.

BIOMASSE MICROALGALI: NUOVI INGREDIENTI PER LA FORMULAZIONE DI DIETE DI ALTA QUALITÀ IN ACQUACOLTURA

MICROALGAE BIOMASSES: NEW INGREDIENTS FOR THE FORMULATION OF HIGH-QUALITY DIET IN AQUACULTURE

Abstract - Due to their valuable and balanced biochemical composition, microalgae (including cyanobacteria) are promising candidates as feed ingredients for aquaculture. A deep investigation on quality and safety of microalgae is necessary to increase their exploitation as new ingredients in diet preparation for aquaculture sector. In particular, the nutrient profile and the in vitro digestibility are essential information to provide details about the quality and bioavailability of nutritional constituents of microalgal biomasses. The aim of this study was to investigate the biochemical composition, the dry matter and protein in vitro digestibility of 10 cultivated microalgae and one commercial natural bloom of interest as feed source. Cyanobacteria and most of the freshwater algal species showed higher protein contents (up to 70% in *Arthrospira platensis*). Marine microalgae showed high amounts of long chain polyunsaturated fatty acids, whereas freshwater species were found to be rich in α -linolenic acid. Cyanobacteria showed the highest digestibility. While, the two green microalgae (*Chlorella sorokiniana* and *Tetraselmis suecica*), *Nannochloropsis oceanica*, *Phaeodactylum tricornutum* and *Porphyridium purpureum* showed lower digestibility values. Our study represents the starting point for the selection of the most suitable microalgae for specific feed applications.

Key-words: microalgae, protein, fatty acids, digestibility, functional feed.

Introduzione - Larve di molluschi e di alcuni pesci, echinodermi e crostacei si nutrono di microalghe. Il possibile utilizzo di microalghe quali *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin, 1898), *Isochrysis galbana* (Bendif & Probert, 2013), *Pavlova lutheri* (Green, 1975), *Tetraselmis suecica* (Butcher, 1959), *Dunaliella* sp. (Teodoresco, 1905) e *Nannochloropsis oculata* (Hibberd, 1981) sia come alimento unico che come additivo alimentare per fornire nutrienti di base, pigmentare la carne dei salmonidi o per altre attività biologiche è noto da decenni (Muller-Feuga, 2000; Tredici *et al.*, 2009; Tibaldi *et al.*, 2015). Le biomasse microalgali rappresentano una matrice promettente per la formulazione di diete per il settore dell'acquacoltura a causa della composizione biochimica bilanciata e dell'alto valore nutritivo (Muller-Feuga, 2000; Tredici *et al.*, 2009; Tibaldi *et al.*, 2015). Infatti, le microalghe possono contenere elevate quantità di proteine, vitamine, minerali (Becker, 2007; Liu e Hu, 2013) carotenoidi (Del Campo *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2009), e acidi grassi polinsaturi a catena lunga (Becker, 2004). In Europa il mercato del *food* e del *feed* ha un valore di circa 113 miliardi di € a livello globale. Il settore dei *feeds* è preponderante (circa 111 miliardi di €), soprattutto a causa della crescita della produzione ittica dell'acquacoltura, che copre il 90% di questo settore (circa 100 miliardi di €) (Barsanti e Gualtieri, 2018). Da questo scenario è

possibile comprendere il valore potenziale che potrebbero raggiungere le microalghe in acquacoltura. Il settore delle microalghe è attualmente molto dinamico e il mercato internazionalizzazione dei prodotti algali dovrebbe raggiungere 44,7 miliardi di US \$, equivalenti a circa 36,3 miliardi di € entro il 2023 (Credence Research Report, 2016). Ogni anno diverse aziende decidono di investire in questo settore in forte crescita, in particolare nella produzione alimentare e nella mangimistica (www.klamathafa.com; www.phycom.eu; www.earthrise.com; www.wilson-groups.com; www.bluebiotech.de). Ai fini di un possibile impiego delle microalghe nella formulazione di nuove diete è fondamentale conoscerne la composizione biochimica che aiuterà ad individuare composti preziosi (proteine e acidi grassi essenziali) nella microalga studiata (Mišurcová *et al.*, 2010). Inoltre, le informazioni sulla digeribilità delle varie sostanze nutritive sono di estrema importanza (Boisen e Eggum, 1991). I modelli di digestione *in vitro* possono essere utilizzati per studiare i cambiamenti strutturali, la digeribilità e il rilascio di componenti alimentari in condizioni gastrointestinali simulate (Hur *et al.*, 2011; Minekus *et al.*, 2014). Scopo del lavoro è stato studiare la composizione biochimica e la digeribilità *in vitro* di diversi ceppi microalgali che potrebbero essere impiegati per la formulazione di diete di alta qualità nel settore dell'acquacoltura.

Materiali e metodi - Le alghe esaminate in questo studio sono elencate nella Tab. 1.

Tab. 1 - Alghe testate per la caratterizzazione biochimica e per la digeribilità *in vitro*.
Algae tested for biochemical characterization and in vitro digestibility.

Ceppo	Mezzo di crescita	Ottenimento della biomassa
<i>Arthrospira platensis</i> F&M-C256	Alcalino	Coltivazione <i>in-house</i>
Klamath powder	Acqua dolce	Bloom naturale (Erbologica S.A.S.)
<i>Nostoc sphaeroides</i> F&M-C117	Acqua dolce	Coltivazione <i>in-house</i>
<i>Chlorella sorokiniana</i> F&M-M49	Acqua dolce	Coltivazione <i>in-house</i>
<i>Chlorella sorokiniana</i> IAM C-212	Acqua dolce	Coltivazione <i>in-house</i>
<i>Chlorella vulgaris</i> Allma	Acqua dolce	Prodotto commerciale (Allma Microalgae)
<i>Tetraselmis suecica</i> F&M-M33 (starvata)	Marino	Coltivazione <i>in-house</i>
<i>Tetraselmis suecica</i> F&M-M33 (non starvata)	Marino	Coltivazione <i>in-house</i>
<i>Porphyridium purpureum</i> F&M-M46	Marino	Coltivazione <i>in-house</i>
<i>Phaeodactylum tricorutum</i> F&M-M40	Marino	Coltivazione <i>in-house</i>
<i>Tisochrysis lutea</i> (T-ISO) F&M-M36	Marino	Coltivazione <i>in-house</i>
<i>Nannochloropsis oceanica</i> F&M-M24	Marino	Coltivazione <i>in-house</i>

La maggior parte delle biomasse testate in questo studio sono state prodotte presso la struttura Fotosintetica & Microbiologica S.r.l. o presso l'Istituto per lo Studio degli Ecosistemi (ISE) del CNR, entrambi situati a Sesto Fiorentino (Firenze, Italia). Le alghe sono state coltivate in fotobioreattori GWP®-II (Tredici *et al.*, 2011) in modalità semi-batch. Le biomasse sono state poi raccolte mediante centrifugazione, congelate, liofilizzate e polverizzate. Le biomasse polverizzate sono state conservate a -20 °C fino all'esecuzione delle determinazioni analitiche. Tutti i ceppi sono stati analizzati per proteine, carboidrati, lipidi, ceneri e umidità. La caratterizzazione biochimica è

stata eseguita su biomassa secca utilizzando un analizzatore CHNSO (Flash EA, serie 1112, Thermo Electron Corporation, USA) (Gnaiger e Bitterlich, 1984). Il contenuto proteico totale è stato stimato come $N \times 6,25$, dove N è il contenuto di azoto determinato attraverso l'analizzatore elementare. I carboidrati sono stati determinati seguendo il metodo Dubois *et al.* (1951) ed i lipidi seguendo Marsh e Weinstein (1966). Umidità, ceneri e acidi grassi sono stati analizzati seguendo i protocolli ISTISAN (Rapporto ISTISAN 1996/34, metodo B, pag. 7; Rapporto ISTISAN 1996/34, pagg. 77-78; Rapporto ISTISAN 1996/34, pag. 47, rispettivamente). Per la valutazione della digeribilità *in vitro* è stato adottato il metodo Boisen e Fernández (1997) modificato da Batista *et al.* (2017). La digeribilità *in vitro* ($D_{DM/CP}$) espressa come percentuale della sostanza secca (DM) e della proteina grezza (CP) è stata calcolata come segue:

$$D_{DM/CP} (\%) = \frac{SW_{DM/CP} - [(UW_{DM/CP} + RP) - B]}{SW_{DM/CP}} \times 100$$

dove:

$SW_{DM/CP}$: peso del materiale di partenza (sostanza secca o proteine), espresso in grammi

$UW_{DM/CP}$: peso del materiale indigerito (sostanza secca o proteine), espresso in grammi

RP: particolato residuo, qualsiasi residuo di biomassa e/o reagente non solubilizzato risospeso dal pellet o non sedimentato, espresso in grammi

B: bianco (tutti i reagenti senza la biomassa algale), espresso in grammi.

Risultati - *A. platensis* F&M-C256, Klamath powder e *N. sphaeroides* F&M-C117 presentano un alto contenuto proteico (51-69%) e un basso contenuto lipidico (6-15%). Le specie marine contengono alte concentrazioni di acidi grassi polinsaturi (PUFA) - $\omega 3$, principalmente C20:5 $\omega 3$ (EPA) e C22:6 $\omega 3$ (DHA) insieme a quantità consistenti di C16:1, C18:1 $\omega 9$ tra gli acidi grassi monoinsaturi (MUFA) e C16:0 tra gli acidi grassi saturi (SFA), mentre le alghe d'acqua dolce contengono alte concentrazioni di PUFA C18:3 $\omega 3$ (ALA) e una quantità ancora maggiore di SFA C16:0. I cianobatteri hanno mostrato la massima digeribilità in termini di sostanza secca (DM) e proteina grezza (CP). Mentre, *C. sorokiniana* F&M-M49, *T. suecica* F&M-M33, *P. tricorutum* F&M-M40 e *P. purpureum* F&M-M46 hanno mostrato i più bassi valori di digeribilità, principalmente a causa della loro spessa parete cellulare o per la presenza di esopolisaccaridi che potrebbe aver limitato l'azione degli enzimi digestivi.

Conclusioni - Nonostante il crescente interesse, l'impiego delle microalghe come ingrediente alimentare è ancora limitato a causa delle difficoltà di coltivazione e degli alti prezzi di mercato delle biomasse microalgali. L'elevato contenuto proteico e l'elevata digeribilità, in particolare per i cianobatteri, e le alte concentrazioni in acidi grassi polinsaturi evidenziano come questi microorganismi rappresentino matrici promettenti per la formulazione di diete nel settore dell'acquacoltura. Questo studio si configura come il punto di partenza per la selezione delle microalghe più adatte per la creazione di specifiche diete funzionali di alta qualità.

Ringraziamenti: Gli autori desiderano ringraziare lo spin-off dell'Università di Firenze Fotosintetica & Microbiologica S.r.l. e l'Istituto per lo Studio degli Ecosistemi (ISE) del CNR per l'utilizzo degli impianti di produzione, entrambi collocati a Sesto Fiorentino (Firenze, Italia), Archimede Ricerche Srl (Italia) e Allma Microalgae (Portogallo) per aver fornito alcune delle biomasse utilizzate in questo lavoro.

Bibliografia

- BARSANTI L., GUALTIERI P. (2018) - Is exploitation of microalgae economically and energetically sustainable? *Algal Res.*, **31**: 107-115.
- BATISTA A.P., NICCOLAI A., FRADINHO P., FRAGOSO S., BURSIC I., RODOLFI L., BIONDI N., TREDICI M.R., SOUSA I., RAYMUNDO A. (2017) - Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and *in vitro* digestibility. *Algal Res.*, **26**: 161-171.
- BECKER W. (2004) - Microalgae in human and animal nutrition. In: Richmond A. (ed), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Publishing Ltd: 312-351.
- BECKER E.W. (2007) - Microalgae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.*, **25**: 207-210.
- BOISEN S., EGGUM B.O. (1991) - Critical evaluation of *in vitro* methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutr. Res. Rev.*, **4**: 141-162.
- BOISEN S., FERNÁNDEZ J.A. (1997) - Prediction of the total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by *in vitro* analyses. *Anim. Feed Sci. Tech.*, **68**: 277-286.
- CREDENCE RESEARCH REPORT (2016) - Credence research report algae products market by application (nutraceuticals, food & feed supplements, pharmaceuticals, paints & colorants, pollution control, others). Growth, future prospects, competitive analysis, and forecast 2016-2023. <http://www.credenceresearch.com/report/algae-products-market>.
- DEL CAMPO J.A., MORENO J., RODRÍGUEZ H., VARGAS M.A., RIVAS J., GUERRERO M.G. (2000) - Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *J. Biotechnol.*, **76**: 51-59.
- DUBOIS M., GILLES K., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SMITH F. (1951) - A colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Nature*, **168**: 167.
- GNAIGER E., BITTERLICH G. (1984) - Proximate biochemical composition and caloric content calculated from elemental CHN analysis: a stoichiometric concept. *Oecologia*, **62**: 289-298.
- HUR S.J., LIM B.O., DECKER E.A., MCCLEMENTS D.J. (2011) - *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chem.*, **125**: 1-12.
- LIU J., HU Q. (2013) - *Chlorella*: industrial production of cell mass and chemicals. In: Liu J., Hu Q. (eds), *Applied Phycology and Biotechnology*. 2nd Ed. Wiley: 329-338.
- MARSH J.B., WEINSTEIN D.B. (1966) - Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid Res.*, **7**: 574-576.
- MINEKUS M., ALMINGER M., ALVITO P., BALANCE S., BOHN T., BOURLIEU C., CARRIÈRE F., BOUTROU R., CORREDIG M., DUPONT D., DUFOUR C., EGGER L., GOLDING M., KARAKAYA S., KIRKHUS B., LE FEUNTEUN S., LESMES U., MACIERZANKA A., MACKIE A., MARZE S., MCCLEMENTS D.J., MÉNARD O., RECIO I., SANTOS C.N., SINGH R.P., VEGARUD G.E., WICKHAM M.S.J., WEITSCHIES W., BRODKORB A. (2014) - A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.*, **5**: 11-13.
- MÍŠURCOVÁ L., KRÁČMAR S., KLEJDUS B., VACEK J. (2010) - Nitrogen content, dietary fiber, and digestibility in algal food products. *Czech J. Food Sci.*, **28**: 27-35.
- MULLER-FEUGA A. (2000) - The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *J. Appl. Phycol.*, **12**: 527-534.
- TIBALDI E., ZITTELLI G.C., PARISI G., BRUNO M., GIORGI G., TULLI F., VENTURINI S., TREDICI M.R., POLI B.M. (2015) - Growth performance and quality traits of European sea bass (*D. labrax*) fed diets including increasing levels of freeze-dried *Isochrysis* sp.(T-ISO) biomass as a source of protein and n-3 long chain PUFA in partial substitution of fish derivatives. *Aquaculture*, **440**: 60-68.
- TREDICI M.R., BIONDI N., PONIS E., RODOLFI L., CHINI ZITTELLI G. (2009) - Advances in microalgal culture for aquaculture feed and other uses. In: Burnell G., Allan G. (eds), *New technologies in aquaculture: improving production efficiency, quality and environmental management*. Woodhead Publishing: 610-676.
- TREDICI M.R., RODOLFI L., SAMPIETRO G., BASSI N. (2011) - Low-cost photobioreactor for microalgae cultivation. Patent WO 2011/013104 A1 (to Fotosintetica & Microbiologica s.r.l., Italy).
- WU Z.Y., QU C.B., SHI X.M. (2009) - Biochemical system analysis of lutein production by heterotrophic *Chlorella pyrenoidosa* in a fermentor. *Food Technol. Biotech.*, **47**: 450-455.