





# I GEORGOFILI

Quaderni  
2012-IX



IL CLOROPLASTO E LA RICERCA BIOLOGICA  
PER LA PRODUZIONE DI CIBO ED ENERGIA

Firenze, 24 maggio 2012



EDIZIONI POLISTAMPA

*Con il contributo di*



ENTE CASSA DI RISPARMIO DI FIRENZE

Copyright © 2013  
Accademia dei Georgofili  
Firenze  
<http://www.georgofili.it>

Proprietà letteraria riservata

Supplemento a «I Georgofili. Atti della Accademia dei Georgofili»  
Anno 2012 - Serie VIII - Vol. 9 (188° dall'inizio)

Direttore responsabile: Paolo Nanni

Edizioni Polistampa  
Via Livorno, 8/32 - 50142 Firenze  
Tel. 055 737871 (15 linee)  
[info@polistampa.com](mailto:info@polistampa.com) - [www.polistampa.com](http://www.polistampa.com)  
Sede legale: Via Santa Maria, 27/r - 50125 Firenze

ISBN 978-88-596-1292-6

Servizi redazionali, grafica e impaginazione  
SOCIETÀ EDITRICE FIORENTINA

## INDICE

AMEDEO ALPI <i>Le diverse forme di plastidi e le vie metaboliche associate</i>	7
MARIO R. TREDICI <i>Cibo ed energia dalle microalghe:   realità o illusione che si rinnova?</i>	37
ROBERTO BASSI, SILVIA BERTEOTTI, MATTEO BALLOTTARI, ALESSANDRO ALBORESI, NICO BETTERLE, LUCA DALL'OSTO <i>Domesticazione delle alghe unicellulari   per la produzione di biocombustibili in fotobioreattore</i>	69
TOMAS MOROSINOTTO, DIANA SIMIONATO <i>L'importanza dell'efficienza fotosintetica   per la produzione di biodiesel da alghe unicellulari</i>	87
DONATELLA CARBONERA, MARILENA DI VALENTIN <i>Assorbimento della luce, fotoprotezione e fotosintesi artificiale</i>	105
STEFANO SANTABARBARA, GIUSEPPE ZUCHELLI, ROBERT JENNINGS <i>Trasporto di Elettroni Secondario   nel centro di reazione del Fotosistema I:   descrizione delle cinetiche di ossidazione   dei fillochinoni legati alle subunità PsA e PsB</i>	119

PAOLO PESARESI, FABIO ROSSI <i>Trasporto ciclico di elettroni nel cloroplasto</i>	131
MIRKO ZAFFAGNINI, NASTASIA DI GIACINTO, PAOLO TROST <i>Meccanismi di regolazione redox nel cloroplasto</i>	145
MATTEO BALLOTTARI, ALESSANDRA SCALA, LINDA BIANCO, CARMINE MANCONE, MARCO TRIPODI, GIOVANNI GIULIANO, GAETANO PERROTTA, ROBERTO BASSI <i>Analisi proteomica della cromoplastogenesi nella bacca di Solanum lycopersicon</i>	163
FRANZ-W. BADECK, FULVIA RIZZA, ELISABETTA MAZZUCOTELLI, CATERINA MARÉ, FRANCO MIGLIETTA, ALESSANDRO ZALDEI, LUIGI CATTIVELLI <i>Il ruolo centrale del cloroplasto nella risposta della produzione vegetale all'incremento della CO<sub>2</sub> atmosferica</i>	193

## Le diverse forme di plastidi e le vie metaboliche associate

I plastidi sono organelli cellulari che effettuano funzioni metaboliche fondamentali come la fissazione fotosintetica del carbonio, la sintesi dell'amido, degli aminoacidi, degli acidi grassi e di molti metaboliti secondari. Questi organelli esistono in più tipi nella cellula dei vegetali, distinguibili per struttura, qualità dei pigmenti e per funzione. Tra i più diffusi, oltre ai cloroplasti del tessuto fotosintetico fogliare, si conoscono i cromoplasti dei fiori e dei frutti, e, tra i leucoplasti, gli amiloplasti delle radici e dei tessuti di riserva (fig. 1).

### CLOROPLASTO

I cloroplasti, sotto il profilo evolutivo, si considerano originati per integrazione endosimbiontica di un procariote fotosintetico – cianobatterio – in un eucariote progenitore delle alghe; in altre parole, una intera cellula si sarebbe trasformata in un organello che, del cianobatterio, avrebbe conservato molte funzioni, nonostante che molti dei geni batterici siano stati trasferiti nel nucleo dell'organismo ospite.

Considerata l'importanza di questo comparto della cellula verde, la sua fisiologia è sempre stata studiata con grande attenzione, soprattutto tramite metodologie biochimiche e biofisiche, sino a quando, negli anni '80 del secolo scorso, le metodiche "high throughput" hanno cambiato il nostro modo di indagare sui fenomeni biologici; la genomica e la genomica funzionale, oltre alle analisi trascrittomiche, proteomiche e metabolomiche, hanno consentito di avere un quadro delle attività del cloroplasto certamente più preciso e completo che nel passato. In particolare la trascrittomica e la proteomica sono i me-

\* *Università di Pisa*

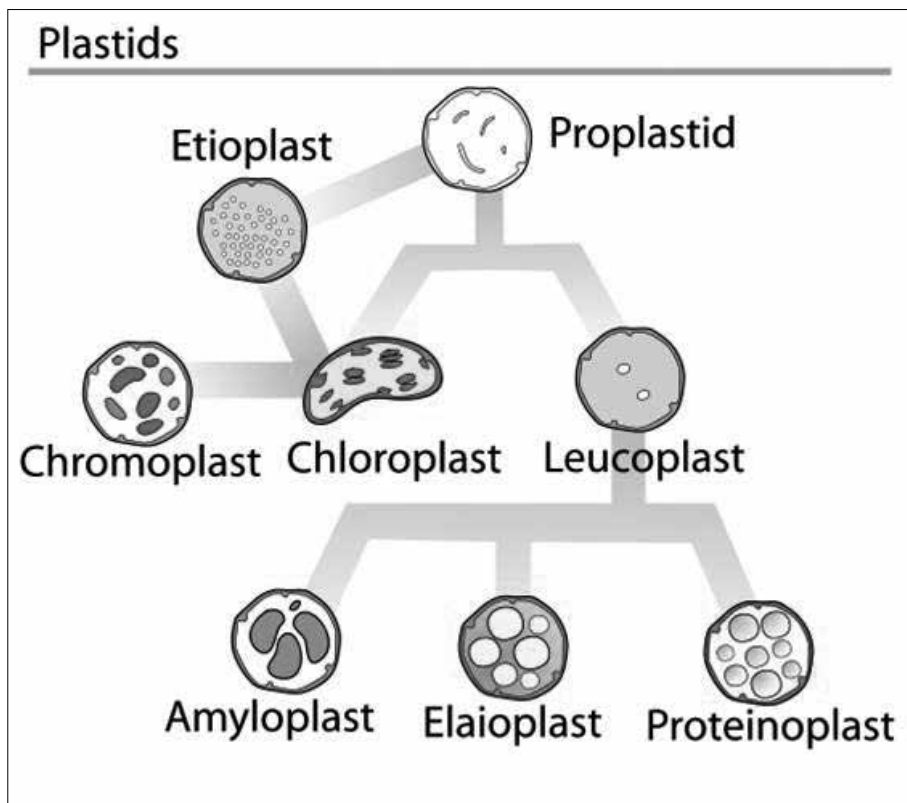


Fig. 1 I diversi tipi di plastidio della cellula dei vegetali (Wikipedia)

todi normalmente impiegati per assegnare precise funzioni alle proteine del cloroplasto. In questo periodo, come è accaduto in altri settori della fisiologia vegetale, sono cambiate, parzialmente, anche le specie oggetto di indagine: si indaga sostanzialmente per le alghe verdi, il *Chlamydomonas reinhardtii*, e per le piante superiori, *Zea mays* e *Arabidopsis thaliana*.

Le funzioni essenziali del cloroplasto sono, oltre alla fotosintesi, la biosintesi dell'amido, la biosintesi degli aminoacidi e il metabolismo dei lipidi. Il livello di approfondimento di cui siamo stati capaci nei decenni accennati, ha reso possibile lo sfruttamento delle conoscenze acquisite nel miglioramento delle coltivazioni tramite metodi biotecnologici. Siamo ormai vicini alla totale identificazione del proteoma plastidiale, pertanto è facile prevedere che progredirà anche lo studio delle interazioni tra queste proteine, mettendo nelle mani dei ricercatori utilissime informazioni per procedere a ulteriori conoscenze e inevitabili applicazioni.



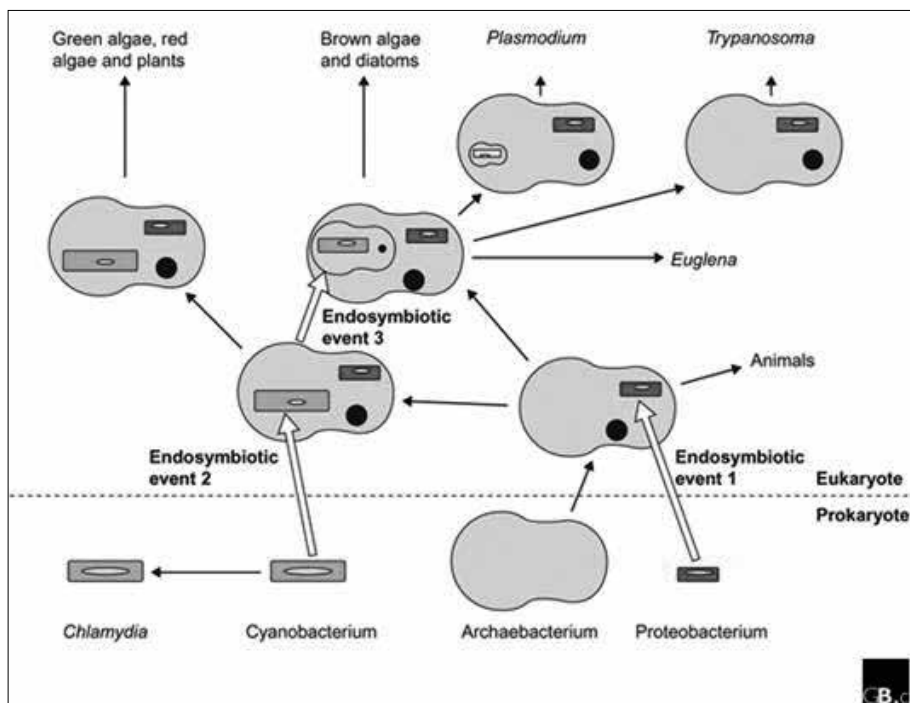


Fig. 2 Rappresentazione schematica del processo endosimbiontico (Raven e Allen, 2003). Le frecce nere indicano le pathway evolutive; quelle bianche gli eventi endosimbiontici nelle cellule ospiti. L'evento simbiotico 1 rappresenta l'origine degli eucarioti e l'acquisizione del mitocondrio; l'evento 2 è l'origine della cellula contenente il plastidio, mentre l'evento 3 rappresenta endosimbiosi di ordine superiore che avrebbe condotto all'origine di molti "Phyla" algali, come pure degli Apicomplexa (come il «Plasmodium»). I segni ellittici dentro agli organelli indicano l'origine batterica

Considerata la vastissima letteratura scientifica sul cloroplasto, credo che l'unico approccio utile sia quello di indicare quali siano oggi le principali novità circa le funzioni dell'organello e quali siano i fronti su cui si concentrano le attenzioni dei ricercatori, così come delineato in un recente e importante contributo di Armbruster et al. (2010).

### *Principali metodologie usate*

Grandi avanzamenti nella nostra conoscenza sono stati acquisiti tramite "forward genetics" (genetica diretta) isolando mutanti con fenotipi specifici e ricercandone la base genica; si sono, così, ampliate le basi molecolari delle

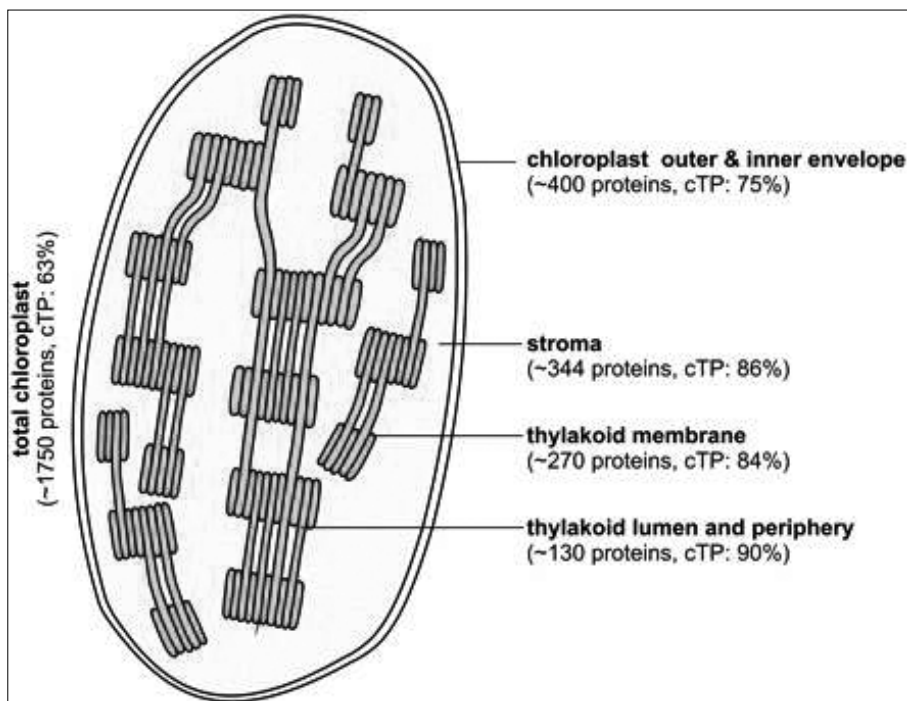
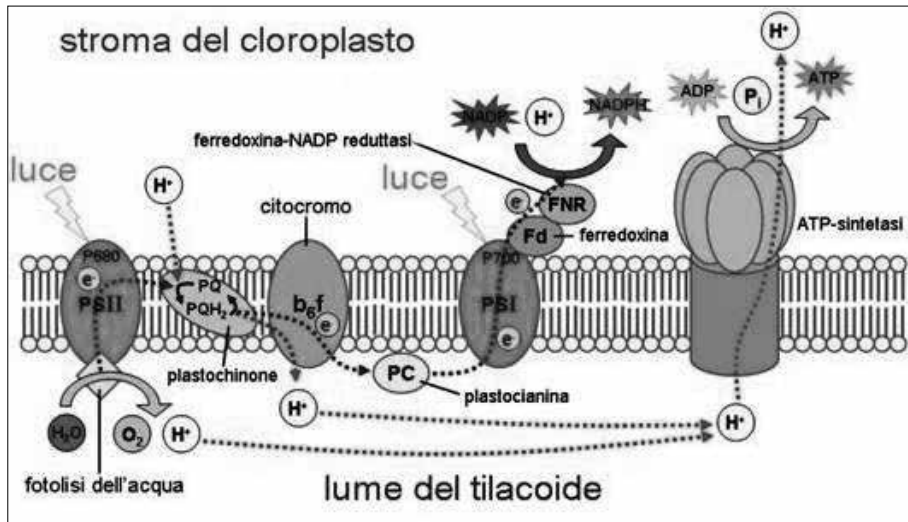
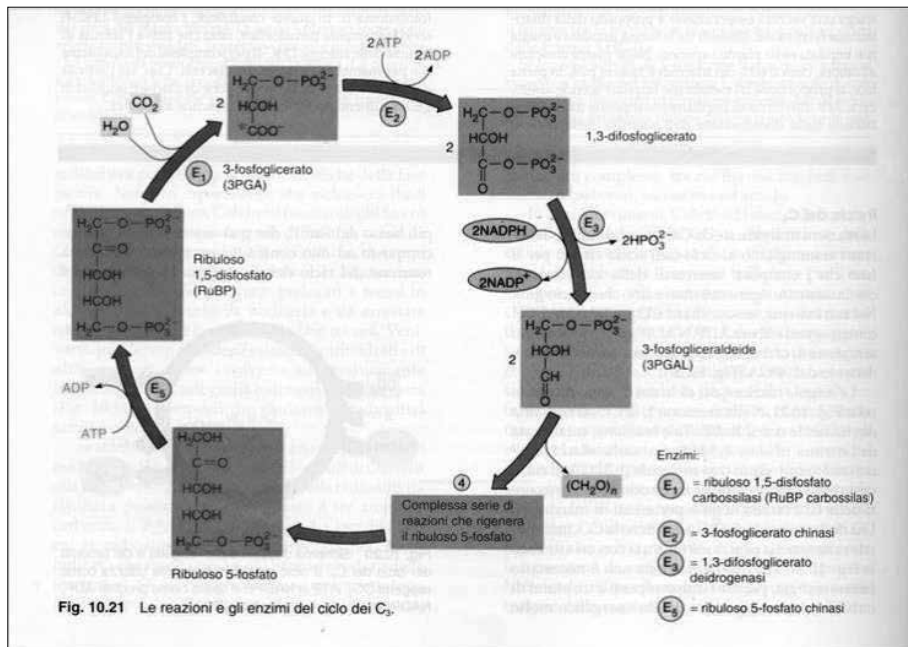


Fig. 3 *Proteine identificate del cloroplasto (Armbruster et al., 2011)*

diverse funzioni delle piante e ancora questo lavoro continua. Nel contempo il sequenziamento di genomi di vari organismi fotosintetici, l'ottenimento di grandi collezioni di mutanti inserzionali (T-DNA in *Arabidopsis thaliana* e trasposoni endogeni in *Zea mays*) hanno reso possibile lo studio delle funzioni delle piante a partire da un singolo gene di interesse (genetica inversa). È un fatto che molte funzioni del cloroplasto sono state chiarite tramite questa "reverse genetics".

La proteomica del cloroplasto ha condotto a una caratterizzazione delle proteine appartenenti all'organello e a una migliore comprensione della loro dinamica. Sono stati realizzati in anni recenti molti studi di proteomica (Rutschow et al., 2008; Zybailov et al., 2008; Ferro et al., 2010) del cloroplasto ivi inclusi le analisi dei subproteomi dell'organello (stroma, membrane tilacoidali, membrana organellare, lume tilacoidale, plastoglobuli). Si ritiene che siano state identificate, a oggi, circa 1750 proteine nel cloroplasto. Con un po' di approssimazione si può dire che queste proteine risultano equamente ripartite tra involucro plastidiale, membrana e lume tilacoidale, e stroma. La proteomica del cloroplasto è stata anche usata per caratterizzare modifi-

Fig. 4 *Complessi coinvolti nella fase luminosa della fotosintesi*Fig. 10.21 Le reazioni e gli enzimi del ciclo dei C<sub>3</sub>.Fig. 5 *Ciclo di Calvin-Benson*

che post-traduzionali; infatti si sono recentemente identificati i substrati, che erano rimasti sconosciuti per molto tempo, di chinasi e fosfatasi cloroplastiche, mediante le analisi del fosfoproteoma organellare (Reiland et al., 2009). Le analisi sulle proteine del cloroplasto sono state anche confrontate con le analisi dei proteomi di altri plastidi quali ezioplasti, cromoplasti e proplastidi. Previsioni computazionali hanno indicato la presenza di circa 2500-3000 proteine nel cloroplasto. La localizzazione sub-organellare di alcune proteine è ancora incerta, per cui siamo sicuri solo per 1144 proteine perché la loro appartenenza si è basata anche sul cTP (chloroplast transit peptide).

Anche l'esame comparato di molti genomi (tra piante e altri organismi) ha consentito di procedere nelle nostre conoscenze circa il cloroplasto; per esempio è stata possibile l'identificazione di geni, specifici degli organismi fotosintetici dotati di cloroplasti, detti "GreenCut"; essi sono presenti nelle alghe verdi e nelle piante, mentre sono assenti nei funghi e negli animali. Molti di questi geni codificano per proteine cloroplastiche anche se spesso con funzioni ignote; averli identificati è stato comunque il passo iniziale per capirne il ruolo. Così è accaduto per il complesso NDH (complesso NAD(P)H deidrogenasi del fotosistema 1, fondamentale per la risposta delle piante agli stress ambientali), derivato dai cianobatteri endosimbionti, che è presente in tutte le specie vegetali ma assente in *Chlamydomonas reinhardtii*; di alcune subunità di questo complesso deve essere ancora definito il ruolo biochimico-fisiologico (Sirpio et al., 2009).

### *Avanzamenti conoscitivi dei processi fisiologici del cloroplasto*

#### Ingresso nel cloroplasto senza "transit peptide"

Non tutte le proteine del cloroplasto possiedono un cTP (chloroplast transit peptide) che dovrà essere riconosciuto e poi eliminato; normalmente esse vengono sintetizzate nel citosol come precursori contenenti la presequenza che serve al trasporto post-traduzionale nell'organello, tramite l'azione dei trasloconi della membrana plastidiale (apparato Toc/Tic). Però talora, come accade per gran parte delle proteine della membrana esterna del cloroplasto, non esiste uno specifico cTP, ma la loro destinazione organellare è dovuta a informazione "intrinseca". In certi casi l'ingresso della proteina avviene diversamente: in *Arabidopsis* l'anidrasi carbonica (CAH1) contiene un peptide segnale N-terminale che dirige la proteina nello ER dove il polipeptide è N-glicosilato prima di essere indirizzato al cloroplasto. Questo meccanismo

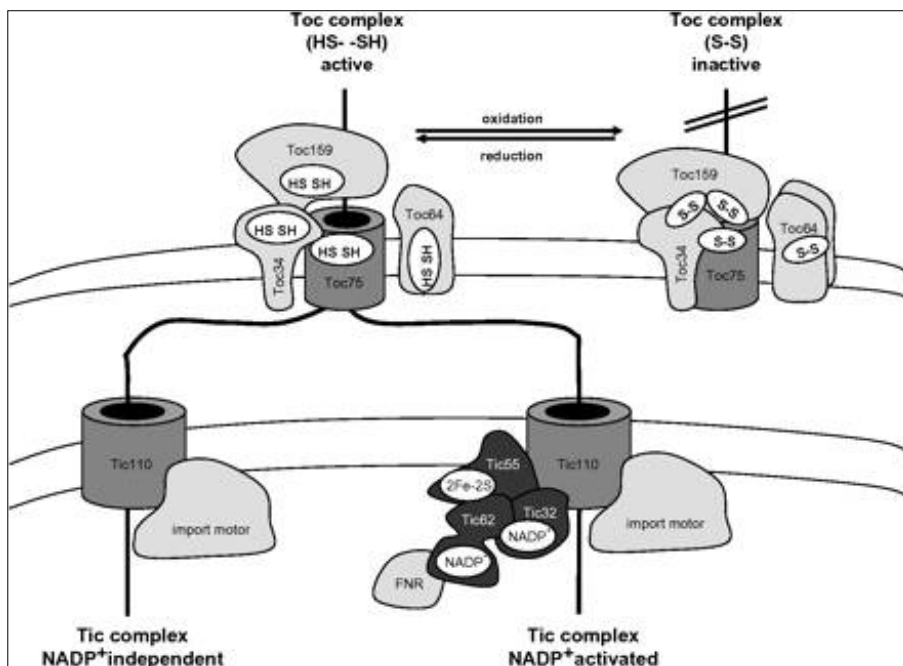


Fig. 6 *Regolazione redox del trasporto delle proteine nel cloroplasto (da: Stengel et al., 2009)*

viene considerato un residuo ancestrale, originatosi prima dell'evoluzione dell'attuale sistema dominante basato sui trasloconi Toc/Tic. Si stima che da un minimo di 10-15% a un massimo di 30%, le proteine del cloroplasto siano introdotte nell'organello tramite un sistema alternativo al meccanismo Toc/Tic (Armbruster et al., 2009).

### Espressione dei geni del cloroplasto

I geni organellari si esprimono tramite l'intervento di proteine regolatrici che sono codificate dal nucleo e quindi esercitano un controllo "anterogrado". L'espressione dei geni del cloroplasto richiede la partecipazione di diverse famiglie di proteine regolatrici "RNA-binding" codificate dal nucleo. Tra di esse si includono le PPR (pentatricopeptide repeat), ciascuna delle quali si legherebbe a pochissimi trascritti plastidiali variabili da uno a tre (Yu et al., 2009). In questo lavoro si conclude che tale proteina regola l'"editing" del trascritto cloroplastico accD, fondamentale per la sintesi della acetil-Co A carbossilasi, enzima della sintesi degli acidi grassi.

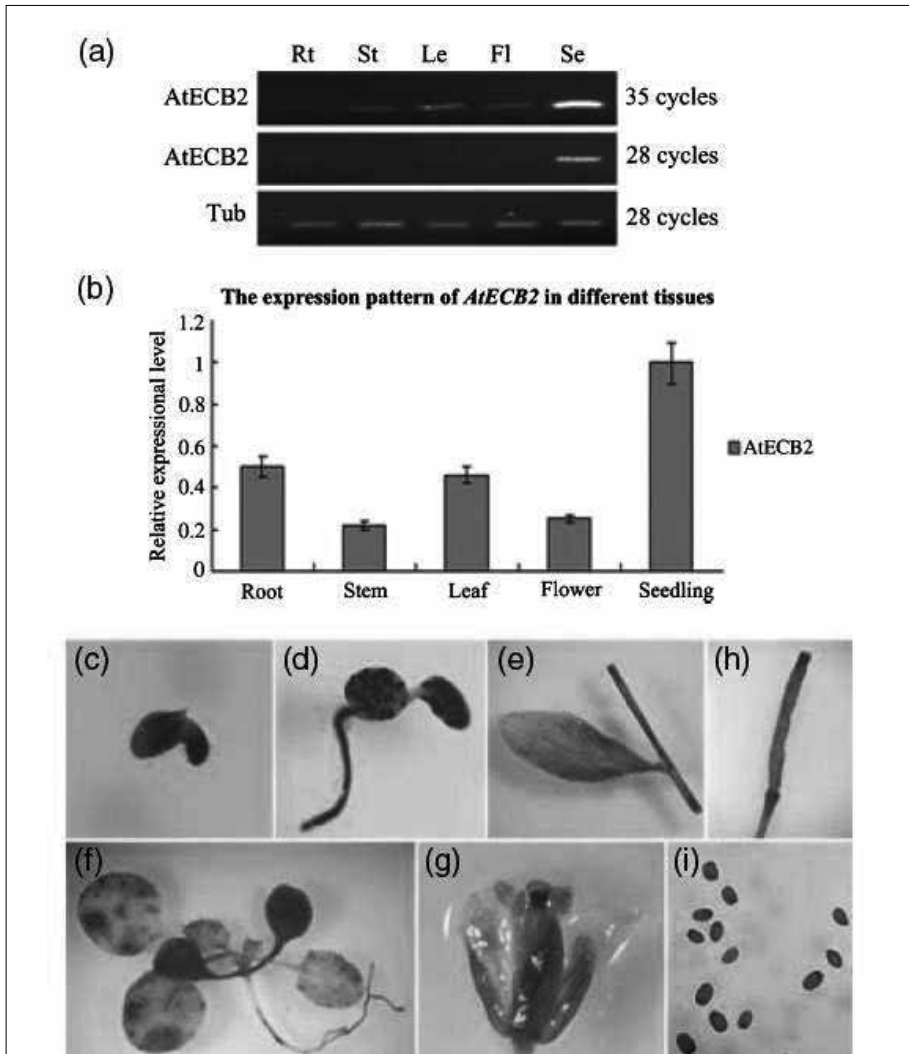


Fig. 7 Pattern di espressione dell'AtECB2 in differenti tessuti di *Arabidopsis* (Yu et al., 2009). La proteina pentatricopeptide nella biogenesi del cloroplasto

### Fotosintesi

#### Quenching non fotochimico

Le xantofille sono coinvolte nel “quenching” delle clorofille eccitate e delle ROS, proteggendo l'apparato fotosintetico dal danno ossidativo; pertanto

l'eccitazione energetica viene dissipata in maniera innocua sotto forma di calore. È il quenching non-fotochimico (NPQ) che viene misurato tramite la fluorescenza della clorofilla. Il ruolo delle xantofille è stato ulteriormente accertato tramite l'ottenimento di mutanti con ridotto NPQ; in tali mutanti sono state rinvenute modifiche negli enzimi del ciclo delle xantofille come la violaxantina deepossidasi e la zeaxantina epossidasi. In aggiunta alle xantofille anche la proteina PsbS (appartenente al gruppo delle proteine del LHC -light harvesting complex-) partecipa al NPQ nelle piante superiori (Li et al., 2000).

### *Novità nel metabolismo dei cloroplasti*

Molti passi avanti sono stati fatti nella conoscenza della regolazione dei processi metabolici organellari.

#### – Tetrapirroli e carotenoidi

Tutti i principali comparti del cloroplasto – membrana, tilacoide e stroma – sono coinvolti nella sintesi e degradazione delle clorofille. Tutte le reazioni che portano alla sintesi del protoporfirinogeno IX avvengono nello stroma, mentre le successive modifiche sono associate alle membrane del cloroplasto e del tilacoide. Confermerebbero questa distribuzione delle attività, alcune analisi proteomiche che hanno rinvenuto proteine della degradazione della clorofilla in tutti e tre i comparti.

Enzimi del ciclo delle xantofille, violaxantina deepossidasi (VDE) e zeaxantina epossidasi (ZEP), sono localizzati nel tilacoide. ZEP catalizza la sintesi di violaxantina che, oltre a funzionare da pigmento fotosintetico, serve come precursore  $C_{40}$  per la sintesi dell'acido abscissico; è interessante notare che la ZEP è localizzata anche nella membrana del cloroplasto (Joyard et al., 2009). Ciò implica che la sintesi delle xantofille e la sintesi dei precursori dell'ABA, a partire dalla zeaxantina, siano spazialmente separati e che, probabilmente, le due pathway non interagiscono. Conseguentemente potrebbe essere messa in discussione l'ipotesi che la sintesi dell'ABA sia regolata dalla disponibilità dei suoi precursori provenienti dal ciclo delle xantofille.

#### – Biosintesi dei galattolipidi

Le membrane plastidiali contengono elevati livelli di galattoglicerolipidi (monogalattosildiacilglicerolo-MGDG e digalattosildiacilglicerolo-

DGDG entrambi sintetizzati nel cloroplasto). Lo MGDG si forma per azione della MGDG sintasi, che trasferisce il galattosio dall'UDP galattosio al diacilglicerolo ed è localizzata nella membrana plastidiale; l'isoforma MGD1, la maggiore, è fondamentale per la biogenesi del tilacoide. Siccome recenti lavori hanno dimostrato che questo enzima è attivato allostericamente, da acido fosfatidico e da fosfatidilglicerolo, si ritiene che esso rappresenti un punto regolatorio chiave tra la sintesi dei fosfolipidi e dei galattolipidi nelle piante. Nella membrana ci sono anche due DGDG sintasi; i mutanti *mgd1* e *dgd1* sono caratterizzati da livelli fotosintetici molto bassi. Una funzione dei MGDG nel processo della fotosintesi è stato recentemente scoperto: promuovrebbero la de-epossidazione della xantofilla violaxantina che rappresenta un passaggio fondamentale della protezione da eccesso di energia luminosa (Schaller et al., 2010).

– Biosintesi e degradazione dell'amido

La sintesi dell'amido comincia con la conversione del glucosio-1-fosfato in ADP-glucosio, catalizzata dall'enzima AGPasi (ADP-glucosio pirofosforilasi); l'ADP-glucosio viene quindi usato sia dall'amido sintasi che dall'enzima ramificante per allungare le catene di glucano (polimeri di glucosio) nel granulo di amido. È ormai chiaro che l'attività dell'AGPasi è accoppiata allo stato redox del cloroplasto, principalmente determinato dalle tioredossine. Infatti sin dal 2000 si sapeva che le tioredossine f e m sono capaci di attivare la AGPasi; nel 2005 Geigenberger ha confermato che questa azione si effettua tramite la riduzione dei ponti disolfuro secondo il seguente schema: si riduce la ferredossina, quindi i gruppi riducenti vengono trasferiti mediante la ferredossina:tioredossina riduttasi alle tioredossine f e m che reagiscono con i loro target. Sempre in quel periodo si è visto che l'AGPasi viene regolata dalla NADP-tioredossina riduttasi C, un enzima scoperto in *Arabidopsis thaliana* e nel riso (Serrato et al., 2004) e, sorprendentemente, localizzato nel cloroplasto. Questo enzima può utilizzare il NADPH, generato dal metabolismo, anziché la ferredossina fotoridotta, per la riduzione di proteine target. Pertanto la modulazione dell'AGPasi da parte della NTRC può rappresentare un mezzo di regolazione di sintesi dell'amido nell'amiloplasto, organello non-fotosintetico. Durante la degradazione dell'amido, l'amilopectina verrebbe attaccata da varie glucano-idrolasi. Se si interviene con mutazioni sul trasportatore del maltosio, originato dalla degradazione, o sull'enzima disproporzionante, che trasferisce unità di maltosio tra glucani diversi, si ottiene un accumulo di maltosio e di maltosio-oligosaccaridi (maltotriosio) all'interno del clo-



roplasto. Questo accumulo è interpretato come un segnale “retrogrado” (dall’organello al nucleo) che fa iniziare la degradazione del cloroplasto tramite un processo autofagico (Stettler, 2009).

### *Segnali dal plastidio al nucleo*

Il cloroplasto contiene molte proteine che, a larga maggioranza, sono codificate nel nucleo; il fatto comporta un dialogo continuo tra organello e nucleo. L’acertamento dell’esistenza di “retrograde signalling” (segnale in direzione contraria) sosterebbe l’ipotesi che si possa regolare l’espressione dei geni nucleari a seconda della necessità del plastidio, per esempio per assicurare un efficiente assemblaggio dei complessi multiproteici fatti da subunità plastidiali e nucleari. Tali segnali si pensa che provengano da vari processi quali: a) biosintesi dei tetrapirroli b) espressione di geni plastidiali c) stato redox organellare 4) ROS.

#### – Il caso della Mg-protoporfirina IX

Alcuni studi sul “signalling” plastidiale sono stati fatti su mutanti di *Arabidopsis* detti “*genomes uncoupled*” (*gun*). In questi mutanti, anche se i cloroplasti sono “photobleached” tramite il trattamento con l’erbicida “norflurazone”, continua l’espressione dei geni nucleari codificanti per proteine cloroplastiche come Lhcb1 o la sub-unità piccola della Rubisco, contrariamente a quanto avviene nel tipo selvatico. Più recentemente (Moulin et al., 2008) si è concluso che nei mutanti *gun*, difettosi nella sintesi del tetrapirrolo come ad es. la Mg-proto IX, si ottiene un aumento nella capacità di espressione di certi geni cloroplastici, se trattati con norflurazone. Di questo fatto non c’è una precisa spiegazione, ma si potrebbe supporre che la diminuita sintesi di clorofilla possa rendere questi mutanti più resistenti allo stress foto-ossidativo e ciò potrebbe portare a una modifica del signaling plastidiale.

#### – Cosa accade nel nucleo?

Il concetto di signaling plastidiale comporta che a seguito del segnale “retrogrado” avverrebbe una profonda modifica dell’espressione dei geni nucleari. Le analisi trascrittomiche fatte in *A. thaliana* confermerebbero il controllo sui geni nucleari codificanti proteine plastidiali, inclusa la presenza di un “interruttore principale” (master switch) che agirebbe in modo binario, inducendo o reprimendo un gruppo elevato di geni. Di tale interruttore farebbe parte il fattore di trascrizione ABI4, appartenente al tipo AP-2; ABI4 e GUN1 agirebbero nella stessa pathway di signaling.

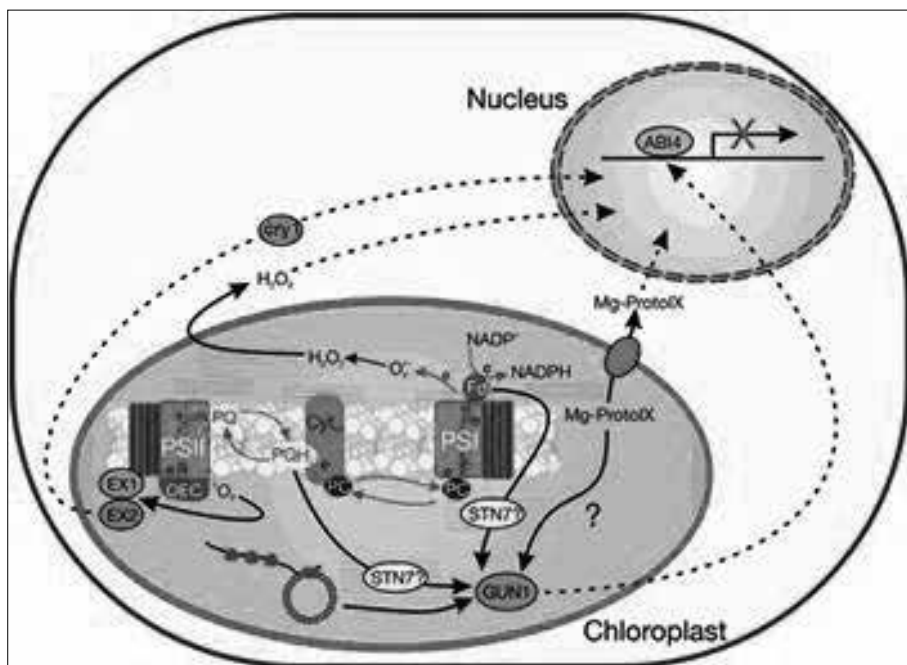


Fig. 8 *Segnale retrogrado* (Strand, 2011)

### *Alcune nuove tendenze della ricerca nel cloroplasto*

#### Regolazione redox

Una promettente area di ricerca, nella quale si sono concentrate molte attenzioni, riguarda la regolazione redox delle funzioni del cloroplasto, rendendo necessaria l'individuazione di "marker" redox e di sensori *in vivo* nel cloroplasto (Dietz, 2008).

#### – Modificazioni post-traduzionali

Le modifiche post-traduzionali di proteine del tilacoide basate sulla fosforilazione sono ben caratterizzate nei cloroplasti (Pesaresi et al., 2010); negli ultimi anni è emerso come meccanismo rilevante la S-nitrosilazione delle proteine; esso è anche un meccanismo per la trasduzione della bioattività dell'ossido nitrico. Più recentemente si è accertata la S-glutathionilazione come forma principale di S-tiolazione nelle cellule; essa risulterebbe dalla combinazione di un SH della proteina con un glutatione. Questo evento si riscontra negli stress ossidativi per proteggere i residui cisteinici, modulan-

do le attività proteiche. molte proteine del cloroplasto sono glutathionilate, inclusa la tioredossina f durante il signaling redox. Analisi proteomiche in *Chlamydomonas reinhardtii* hanno portato alla identificazione di 25 target della glutathionilazione, soprattutto all'interno del cloroplasto; si conclude che questa modifica post-traduzionale interviene nella regolazione di molti processi (Michelet et al., 2005). Pertanto molte novità ci si possono attendere da studi condotti sulla S-nitrosilazione e sulla glutathionilazione delle proteine cloroplastiche.

#### – Cloroplasti modificati

Un processo importante del cloroplasto e che può essere modificato è la fotorespirazione che deriva dalla reazione ossigenasica della Rubisco; si completa attraverso reazioni che interessano i cloroplasti, i perossisomi e i mitocondri. Nei cloroplasti di *A. thaliana* è stata introdotta la via catabolica del glicolato ottenuta da *Escherichia coli* (Kebeish et al., 2007) per ridurre le perdite di carbonio e di azoto fissato, come accade tipicamente nelle  $C_3$  a seguito dell'uso fotorespiratorio del fosfoglicolato. L'intervento transgenico ha condotto a una maggior biomassa; pertanto il risultato incoraggia la manipolazione di fotorespirazione e fotosintesi per aumentare la produzione di molte piante coltivate.

### CROMOPLASTO

I cromoplasti sintetizzano caroteni (pigmenti di colore arancione) e xantofille (di colore giallo) e diversi altri pigmenti anche di colore rosso. Comunque nei cromoplasti i pigmenti sono sempre rappresentati da carotenoidi mentre nei vacuoli si rinvencono antocianine e altri flavonoidi. Questi organelli sono funzionalmente diversi dai gerontoplasti tipici delle foglie senescenti e derivati dai cloroplasti, ma nei quali non avviene sintesi *ex-novo* di carotenoidi, ma semplicemente il loro mantenimento. Inizialmente i plastidi "senescenti" furono chiamati da Matile "gerontosomi" e furono caratterizzati anche per la forte perdita di DNA plastidiale (Matile, 2000). Il colore di molti frutti e fiori, ma anche di qualche radice (carota) e tubero (patata dolce) è dovuto all'accumulo nei loro tessuti di carotenoidi, idrocarburi con 40 atomi di carbonio. La pigmentazione giallo-arancio tipica dei fiori del narciso, della scorza degli agrumi o della carota, è dovuta a essi, ma è un carotenoide anche il licopene responsabile della colorazione rossa del frutto del pomodoro e del peperone. Questi colori, anche molto accesi e brillanti, si pensa che siano indispensabili

per richiamare animali e, quindi, favorire l'impollinazione e la dispersione dei semi. I cromoplasti possiedono DNA, ma i geni che presiedono alla sintesi dei pigmenti risiedono nel nucleo. Una volta sintetizzati, i pigmenti si depositano, in forma di minutissime gocce, nello stroma plastidiale; si possono comunque rinvenire sotto forma di inclusioni cristalline. I cromoplasti contengono i plastoglobuli; quest'ultimi possono contenere i pigmenti e anche i chinoni.

In virtù del fatto che contengono i pigmenti responsabili del colore di fiori e frutti, i cromoplasti sono i plastidi non fotosintetici che maggiormente hanno suscitato l'interesse nei ricercatori. Siccome i carotenoidi rappresentano la maggioranza dei pigmenti organellari, molti studi di biochimica e biologia molecolare del cromoplasto sono dedicati alla loro formazione. La funzione di questi organelli risulta comunque complessa e non solo dovuta alla presenza dei carotenoidi; recenti approcci proteomici e trascrittomici ne hanno dato ampia conferma (Siddique et al., 2006). Mentre i cloroplasti utilizzano l'energia fornita dalla reazione luminosa della fotosintesi per sintetizzare gli zuccheri fosfati, i cromoplasti – non fotosintetici – importano dal citosol questi stessi zuccheri e l'ATP necessari per il loro metabolismo. Comunque le funzioni metaboliche dei vari plastidi non sono del tutto accertate. Vari studi del passato hanno chiarito eventi biochimici e strutturali durante la differenziazione del cromoplasto, ma solo recentemente si sono ottenute nuove informazioni mediante l'uso delle tecniche "highthroughput"; un metodo che può aiutare in questa direzione è l'approccio proteomico che, nei plastidi non fotosintetici è addirittura favorito. Infatti in essi non si trova la massiccia presenza delle proteine fotosintetiche tipica dei cloroplasti e quindi l'analisi proteomica può portare più facilmente alla identificazione di proteine caratterizzanti specifiche attività organellari.

Uno dei più recenti "updating" circa lo stato attuale delle conoscenze sul cromoplasto è offerto dall'articolo di Egea et al. (2010). La morfologia del cromoplasto è molto variabile soprattutto per la varietà di strutture contenenti i carotenoidi. Si ritrovano "corpi" globulari, tubulari, reticolo-globulari, membranosi e cristallini. Per fare solo alcuni esempi si possono citare quei cromoplasti che accumulano carotenoidi, sotto forma di grossi cristalli, all'interno dei "lumen" di strutture tilacoide-simili (come accade nelle radici di carota); oppure, come si osserva nei frutti di peperone rosso, i cromoplasti contengono un elevato numero di globuli ed estensioni fibrillari contenenti carotenoidi e tocoferoli circondati da uno strato di lipidi polari a loro volta racchiusi da una plastoglobulina chiamata fibrillina.

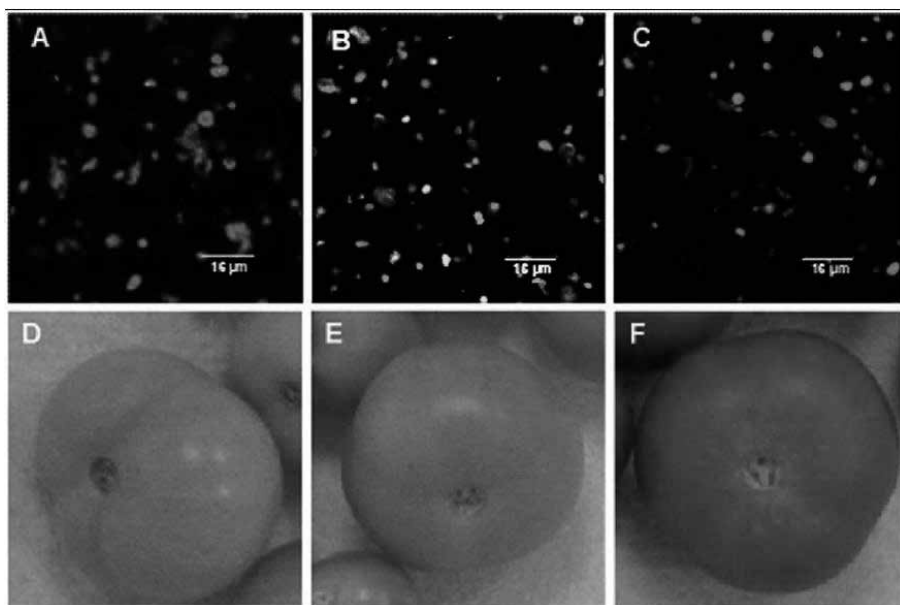


Fig. 9 Immagini confocali di cloroplasti (A), di cloroplasti che iniziano la transizione (B) e cromoplasti maturi (C) (Egea et al., 2010)

È accertata un'origine dei cromoplasti dai cloroplasti; tramite impiego del microscopio confocale e della GFP (green-fluorescent protein) si è potuto osservare che i cromoplasti sono più piccoli dei cloroplasti dai quali derivano.

D'altra parte è noto che alcune forme plastidiali possano generarsi da plastidi pre-esistenti. La conversione più nota è il passaggio da proplastidi a cloroplasti che avviene sotto il controllo della luce; anche i cromoplasti possono originarsi dai proplastidi (come avviene nelle radici di carota), dai cloroplasti (nei frutti in via di maturazione) o dagli amiloplasti (nei fiori di zafferano). Vari studi di microscopia elettronica hanno, già da tempo, messo in evidenza come, nel frutto del peperone rosso, avvenisse una profonda "ristrutturazione" del sistema di membrane interne del cloroplasto durante la formazione del cromoplasto, avente origine con la lisi dei grana e dei tilacoidi intergranali. Nel contempo si osservava la formazione di nuove membrane e, dati recenti, confermano che su queste membrane si accumulano i cristalli dei carotenoidi; le nuove membrane non derivano dai tilacoidi, ma da vescicole generate dalle membrane interne. Un dato interessante, ottenuto studiando la maturazione del frutto di pomodoro, è la forte riduzione della proteina MFP1 (thylakoid-associated DNA-binding protein) di cui si suppone la partecipazione nello sviluppo della membrana tilacoidale.

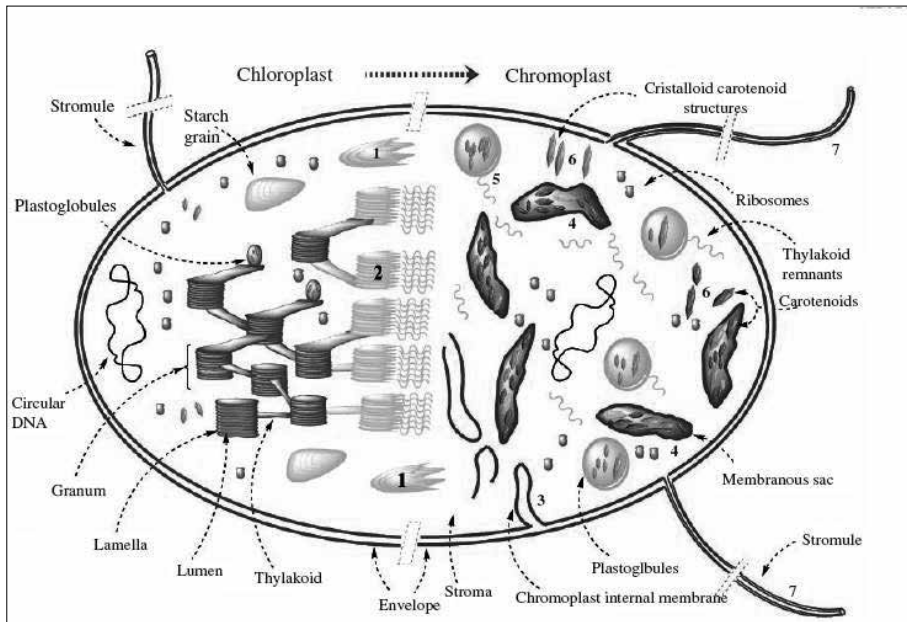


Fig. 10 *Rappresentazione schematica della transizione cloroplasto/cromoplasto (Egea et al., 2010). Si osserva la degradazione dei grani di amido (1), dei grana e del tilacoide (2); la sintesi di nuove invaginazioni della membrana interna dell'involucro plastidiale (3) che conduce alla formazione di sacche membranose arricchite in carotenoidi; l'aumento in numero e dimensione dei plastoglobuli; la comparsa di cristalloidi contenenti carotenoidi; l'aumento delle estroflessioni tubulari dell'involucro, dette stromuli*

Comunque, nonostante che l'ipotesi dell'origine del cromoplasto dal cloroplasto sia stata formulata da tempo, non era mai stata presentata una chiara dimostrazione, in un plastidio in transizione, della fluorescenza della clorofilla e dei carotenoidi rilevata mediante microscopio confocale. Questo dato mancante è stato ottenuto recentemente dallo stesso gruppo di ricercatori (Egea et al., 2011).

#### *Ruolo dei plastoglobuli nell'accumulo dei carotenoidi*

Durante la transizione cloroplasto-cromoplasto si osserva generalmente un aumento in dimensione e numero dei plastoglobuli. Le plastoglobuline (fibrilline) – proteine strutturali conosciute come proteine associate ai lipidi del plastidio – ricoprono, insieme agli enzimi del metabolismo lipidico, i plastoglobuli; esse partecipano anche al sequestro dei carotenoidi e alla biogenesi

del cromoplasto. Infatti i plastoglobuli non sono solo corpi contenenti lipidi, ma partecipano ad alcune vie metaboliche: il proteoma dei plastoglobuli di peperone rosso contiene diverse proteine coinvolte nella sintesi dei carotenoidi (zeta-carotene desaturasi; licopene beta-ciclastasi, beta-carotene beta-idrossilasi). La zeta-carotene desaturasi è stata rinvenuta anche in cromoplasti di pomodoro.

#### *Variazione nella morfologia degli “stromuli” durante la genesi del cromoplasto*

Gli stromuli sono protrusioni della membrana del plastidio nel citoplasma. Nel pomodoro, durante la maturazione del frutto, il numero e la lunghezza degli stromuli aumenta, almeno nelle parti più interne del mesocarpo, probabilmente per favorire un più elevato trasporto di proteine per la sintesi dei carotenoidi e per il differenziamento del cromoplasto.

#### *Caratteristiche e stabilità del genoma plastidiale durante il differenziamento in cromoplasti*

L'analisi comparata, realizzata mediante enzimi di restrizione, su DNA di cloroplasti fogliari e di cromoplasti di frutto in pomodoro, hanno rivelato l'assenza di importanti modifiche; si sono ipotizzate piccole variazioni del DNA, come l'aumento di metilazione nella citosina, ma le evidenze sperimentali sono state contraddittorie e quindi il loro ruolo nella transizione plastidiale rimane incerto.

#### *Importanza dell'attività trascrizionale e traduzionale durante il differenziamento del plastidio*

Il “pattern” di espressione di geni localizzati nel plastidio è stato studiato durante la formazione del cromoplasto con il risultato che, mentre i geni coinvolti in attività fotosintetiche apparivano “down-regolati”, i geni coinvolti nella biosintesi dei carotenoidi – tipo la licopene-beta-ciclastasi (CYC-B) – sembrerebbero up-regolati (dato confermato in frutti di agrumi e di papaya, in radice di carota, ecc.). Però studi comparativi rigorosi, condotti mediante tecnica trascrittomica, non hanno manifestato grandi variazioni tra cloroplasto e cromoplasto (Kahlau e Bock, 2008). D'altra parte la larga maggioranza

delle proteine presenti nel plastidio è codificata da geni nucleari per cui oltre all'attività trascrizionale del nucleo ci deve essere un successivo trasporto delle proteine nel plastidio, dove viene organizzata l'attività metabolica del cromoplasto. Infatti nel proteoma del cromoplasto sono rinvenute proteine per la sintesi di zuccheri, di amido, degli acidi grassi, degli aminoacidi, dei carotenoidi, delle vitamine (riboflavina, acido folico, tocoferoli), di ormoni e di sostanze aromatiche volatili.

*Geni coinvolti nel differenziamento dei cromoplasti  
e nello sviluppo di strutture per l'accumulo di carotenoidi*

Nella pubblicazione di Lu et al. (2006) c'è la prima dimostrazione di un gene coinvolto nel differenziamento del cromoplasto; si tratta del gene *Or* del cavolfiore. La mutazione Orange (*Or*) conferisce l'accumulo di alti livelli di beta-carotene in vari tessuti normalmente privi di tale pigmento. Il ruolo funzionale di *Or* sarebbe associato a processi cellulari che attivano il differenziamento dei proplastidi in cromoplasti. Quando il gene *Or* è stato trasferito, come transgene, nella patata, ha indotto nel tubero un forte accumulo di carotenoidi, ma senza influenzare l'espressione dei geni codificanti per la biosintesi dei carotenoidi; pertanto il suo ruolo sarebbe quello di creare un "sink" metabolico (il cromoplasto) nel quale si accumulano i carotenoidi.

*Attività metabolica dei cromoplasti*

Nella transizione cloroplasto-cromoplasto si assiste alla flessione della clorofilla, delle attività fotosintetiche e all'accumulo di carotenoidi, ma, come già detto, nel cromoplasto si svolgono comunque attività metaboliche. Per quanto concerne gli zuccheri necessari alle attività biosintetiche l'origine può essere duplice: possono derivare dall'interno del plastidio oppure, e soprattutto, dal citosol, grazie a un trasportatore plastidiale del glucosio. Le proteine per la sintesi e la degradazione dell'amido sono state rinvenute nei cromoplasti dei frutti di pomodoro e quindi rimarrebbero durante la transizione. Molti enzimi del ciclo di Calvin sono presenti e attivi.

In essi c'è anche un sistema antiossidante molto attivo. Infatti in cromoplasti isolati di peperone si è rilevato una elevata quantità di glutatione e di ascorbato e alti livelli di enzimi del ciclo ascorbato-glutatione e della superossido dismutasi. Questa alta attività del sistema antiossidante potrebbe funzio-



nare sia per proteggere contro l'ossidazione componenti come i carotenoidi, ma anche nella mediazione del "signalling" tra cromoplasti e nucleo. Le ROS generate nei plastidi up-regolerebbero la trascrizione dei geni di biosintesi dei carotenoidi (Bouvier et al., 1998).

### *Differenziamento reversibile dei cromoplasti*

Sono conosciute varie situazioni nelle quali tessuti colorati tornano a essere verdi come conseguenza del differenziamento dei gerontoplasti, ezioplasti e cromoplasti in cloroplasti. Nel caso dei cromoplasti il miglior esempio è offerto dai frutti degli agrumi, ma si conosce il fenomeno anche nelle cucurbitacee (Preberg et al., 2008). Mentre i frutti si inverdono nuovamente, nei cromoplasti spariscono molti plastoglobuli e si formano nuovi tilacoidi da vescicole preesistenti e da invaginazioni della membrana interna, ricostituendo una normale struttura cloroplastica e ripristinando l'attività fotosintetica. Il fattore ambientale che, probabilmente, ha un ruolo preponderante in questo processo, è la luce, ma anche il livello nutrizionale (azoto) può avere una influenza. Anche le temperature più elevate o le gibberelline possono favorire il re-inverdimento della scorza (esocarpo o flavedo dell'esperidio) del frutto degli agrumi, mentre un'abbondanza di saccarosio tende a inibire questo processo. Sul re-inverdimento non c'è accurata descrizione biochimica, ma si sa che l'acido gibberellico riduce l'espressione dei geni per la biosintesi dei carotenoidi (fitoene sintasi, fitoene desaturasi ecc.) e anche l'espressione di geni che presiedono alla degradazione della clorofilla (feoformidi a ossigenasi). Scarsa informazione, al momento, è disponibile circa gli effetti sull'espressione dei geni per la biosintesi dei fotosistemi e della clorofilla.

### *Mutanti per la formazione del cromoplasto*

La scoperta del mutante *or* del cavolfiore ha consentito l'isolamento di un gene che controlla il differenziamento del cromoplasto. Anche alcuni mutanti di pomodoro consentono di identificare le componenti molecolari coinvolte nella biogenesi del cromoplasto. È il caso dei mutanti *hp1*, *hp2* e *suffulta*. Anche gli ormoni giocano un ruolo importante nel controllo della transizione cloroplasto/cromoplasto; è ben noto che in mutanti o linee trasgeniche, danneggiate in elementi della trasduzione del segnale dell'etilene, come nel caso del mutante *never-ripe*, la pigmentazione risulta modificata.

Queste e molte altre mutazioni, indicano che la formazione del cromoplasto è un evento complesso che coinvolge non solo fattori espressi durante la maturazione, ma anche fattori che riguardano più in generale lo sviluppo e gli ormoni come auxine, citochinine, ABA ed etilene.

### *Prospettive*

In virtù di analisi quanti-qualitative, tramite tecnologie di spettrometria di massa, si è arrivati ad assegnare al cromoplasto un numero di proteine comparabile a quello del cloroplasto.

Per la ricerca futura sembra di particolare importanza la descrizione della fosforilazione, come di altri tipi di modificazione proteica, possibile tramite approccio proteomico, che può fornire indicazioni circa la regolazione di attività metaboliche plastidiali durante la transizione cloroplasto/cromoplasto.

Un'altra area di incertezza è rappresentata dal ruolo degli ormoni nella regolazione del differenziamento plastidiale il cui meccanismo di base rimane poco chiaro, incluso il cross-talk ormonale.

È generalmente condiviso il concetto che l'espressione di molti geni, codificanti proteine destinate al plastidio, sia regolata attraverso un "dialogo" tra nucleo e plastidio. I segnali ambientali (come luce, temperatura ecc.) o di sviluppo, comprenderebbero le ROS, i carotenoidi, i carboidrati, gli ormoni. D'altra parte che esista un dialogo nucleo-plastidio è dimostrato dall'uso della "tagetitoxin", specifico inibitore della RNA polimerasi plastidiale, e della lincomicina, inibitore specifico della peptidil-transferasi plastidiale, nei cloroplasti con il risultato della riduzione dell'accumulo dei trascritti nucleari destinati al plastidio.

Rimane da accertare se questi segnali siano attivi in plastidi non fotosintetici, come i cromoplasti. Finché questo risultato non sarà ottenuto, il controllo da parte nostra dei processi di sviluppo come formazione del fiore e maturazione dei frutti, rimarrà assai problematico.

### AMILOPLASTO

Gran parte delle considerazioni che vengono fatte di seguito sugli amiloplasti, derivano da una interessante rassegna che su questo argomento è stata pubblicata qualche anno fa (Balmer et al., 2006b). Sebbene questi organelli siano ritenuti, da diversi decenni, la sede della sintesi e di accumulo di amido nei

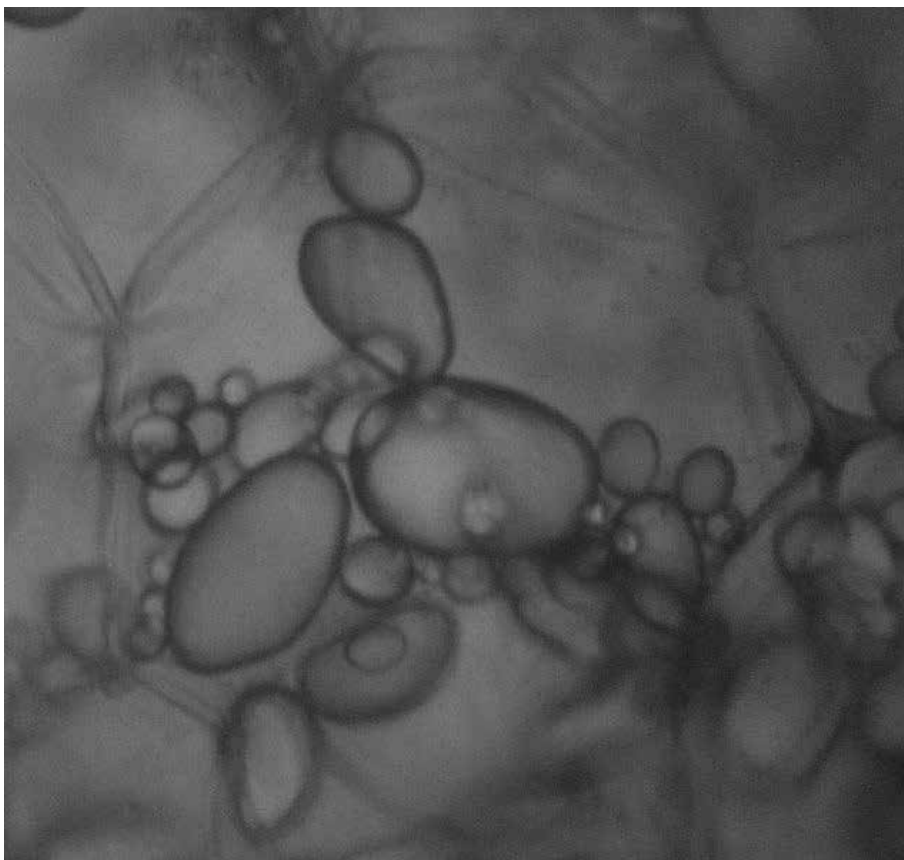


Fig. 11 *Amyloplasti di patata «Solanum tuberosum»*

tessuti eterotrofi delle piante, le nostre conoscenze su di essi rimangono frammentarie; cioè, oltre alla sintesi e degradazione dell'amido, tutte le altre attività biochimiche sono poco conosciute. D'altra parte, mentre nel cloroplasto l'amido è prodotto transitoriamente durante il giorno e degradato durante la notte, l'amiloplasto è la sede di accumulo di enormi quantità di questo carboidrato di riserva.

Gli studi di proteomica del cloroplasto sono molto progrediti, come detto, mentre la stessa cosa non si può dire per gli amiloplasti; il motivo principale per questa carenza di informazioni risiede nella particolare fragilità di questo organello difficile da isolare, perché i densi grani di amido tendono a forare la membrana organellare durante la procedura di isolamento. Come per tutti i plastidi, anche per l'amiloplasto la larga maggioranza delle sue proteine sono codificate dal nucleo e importate dal nucleo nell'organello tramite il ricono-

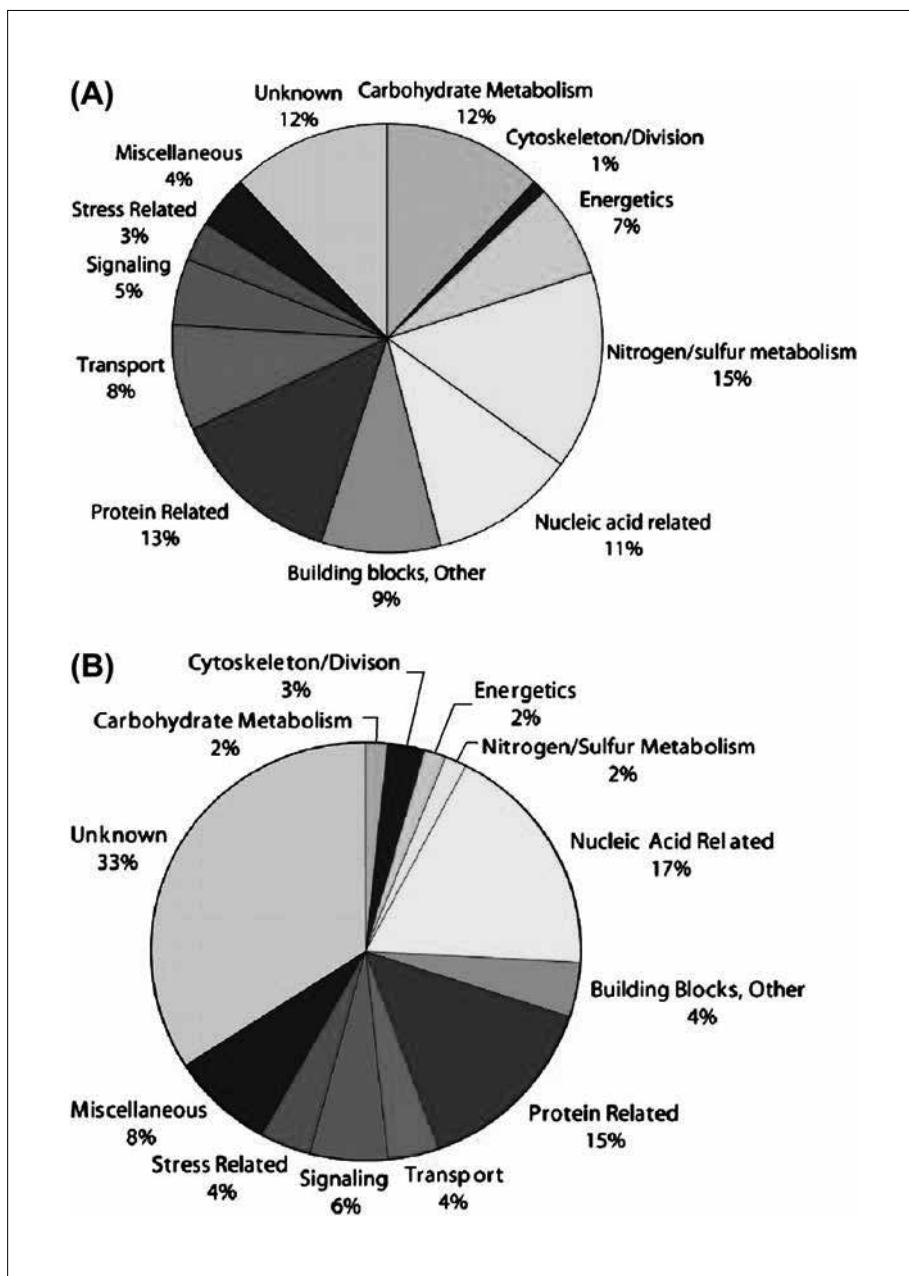


Fig. 12 Distribuzione funzionale di proteine in (A) amiloplasti di endosperma di grano (Balmer et al., 2006) e in (B) cloroplasti di «*A. thaliana* e *Zea mays*» (Friso et al., 2004)

scimento del “transit peptide”. Tuttavia potrebbero esserci delle differenze tra cloroplasto e amiloplasto; ad esempio nell’amiloplasto dovrebbe essere assente il tilacoide, ma nel suo stroma sono presenti varie vescicole e altre strutture membranose, per entrare nelle quali non si conosce il tipo di segnale di riconoscimento (Stensballe et al., 2008).

In un lavoro di analisi proteomica dell’amiloplasto di giovani cariossidi di frumento (Andon et al., 2002) si riportava che il 24% delle proteine rinvenute appartenevano alla sintesi e accumulo dell’amido, 23% al metabolismo energetico, il 14% a fattori di trascrizione, recettori, proteine del “signaling”, proteine correlate alla difesa, ma ben 39% risultavano sconosciute su di un totale di 171 proteine identificate. Dovuto anche alle analogie con il cloroplasto si è pensato che le funzioni metaboliche di questo plastidio fossero più ampie di quanto descritto. Pertanto è stata effettuata una nuova indagine proteomica, riportata nella pubblicazione di Balmer et. al. precedentemente citata, e che descrive 289 proteine identificate da amiloplasti isolati; il 50 % di esse appartiene a funzioni metaboliche varie o fa parte del novero delle proteine di risposta allo stress. Molte proteine hanno attività enzimatica riportabile al metabolismo degli aminoacidi, degli acidi nucleici e dello zolfo. Le proteine sono state raggruppate nelle seguenti 10 maggiori categorie, a loro volta ulteriormente suddivisibili, come riportato: metabolismo dei carboidrati (amido, glicolisi, via del pentoso fosfato, ciclo dell’acido citrico), citoscheletro, metabolismo energetico (ATP/PP sintesi/trasformazione, trasporto elettronico), metabolismo dell’azoto/zolfo (amminoacidi, assimilazione dello zolfo), proteine correlate agli acidi nucleici (DNA/RNA, biosintesi nucleotidi), signaling (ormoni, fosforilazione, GTP), metabolismo proteico (folding, turnover, accumulo), proteine dello stress (legate a gruppi tiolici, legate ad acido ascorbico), proteine delle principali vie metaboliche (isoprenoidi, tetrapirroli, vitamine/cofattori, metabolismo lipidico), miscellanea e sconosciute.

### *Metabolismo dei carboidrati*

Tra tutte le attività biochimiche dell’amiloplasto, la biosintesi dell’amido è in genere considerata l’attività principale, poiché il grano di amido finisce per occupare gran parte del volume organellare; coerentemente gli enzimi della biosintesi dell’amido sono stati identificati all’interno di esso. Semmai la sorpresa è stata l’identificazione di enzimi che presiedono alla degradazione e al riarrangiamento dell’amido, come l’alfa-1,4 glucano fosforilasi, oppure gli enzimi glicolitici, quelli della via del pentoso fosfato o della “malate valve”. Ciò suggerisce che una parte significativa del carbonio importato dall’amiloplasto viene

indirizzata alla produzione di potere riducente e di ATP per dare supporto alle numerose attività di biosintesi che hanno luogo nell'organello. Quindi, quanto meno nelle giovani cariossidi analizzate in questo studio (10 giorni dopo l'an-tesi), i plastidi catalizzano, oltre alla biosintesi dell'amido, molti altri processi.

### *Citoscheletro*

Il meccanismo molecolare di divisione dei plastidi è derivato dai batteri endosimbionti; comunque, mentre nei batteri il processo di divisione cellulare è descritto in molti dettagli, così non si può dire per il plastidio, anche se alcune sue molecole di base sono state identificate e risultano sia di provenienza eucariotica che procariotica. Tra di esse figurano le proteine FtsZ, codificate nel nucleo, ma indirizzate al cloroplasto; queste proteine sono essenziali per la divisione del cloroplasto e si posizionano ad anello nella parte mediana del plastidio prima della divisione. I mutanti *arc* di *Arabidopsis*, manifestano varie anomalie nella forma, dimensione e numero dei cloroplasti e possono essere un ottimo strumento per individuare i geni della divisione plastidiale nelle piante. L'analisi genetica del mutante *arc* ha rivelato almeno 12 loci coinvolti nella replicazione plastidiale; analizzando specificatamente il mutante *arc6* si è trovato che nel tipo selvaggio la proteina ARC6 è una proteina indirizzata al plastidio del tipo "DNA-J like protein" (Vitha et al., 2003). Nel loro lavoro gli Autori ottengono dati a sostegno della funzione di ARC6 nella costruzione dell'anello Ftsz nei cloroplasti.

D'altra parte ci sono evidenze che amiloplasti di endosperma si dividono attivamente.

### *Bioenergetica*

Negli amiloplasti sono state rinvenute proteine coinvolte nel trasporto degli elettroni e nella sintesi e modifica dell'ATP. La presenza di classici componenti del cloroplasto, come la "OEE protein" o la "chlorophyll a/b-binding protein", non ha spiegazione, ma la presenza di isoforme di ferredossina e di ferredossina/NADP riduttasi specifiche per i plastidi non fotosintetici, serve al trasferimento inverso di equivalenti riducenti dal NADPH alla ferredossina, utile per sostenere i processi che nel cloroplasto avvengono alla luce. Il rinvenimento iniziale negli amiloplasti della ferredossina/tiorredossina riduttasi suggeriva che in questo organello fosse presente il sistema ferredossina/tiorredossina descritto nei cloroplasti. Balmer et al. (2006a) hanno confermato la presenza della tiorredossina nell'amiloplasto.

### *Metabolismo azoto/zolfo*

La scoperta nell'amiloplasto di un vasto gruppo di proteine (39) attive nella sintesi degli amminoacidi, è funzionale sia alla definizione dei plastidi non fotosintetici come siti di sintesi di questi "building blocks", ma anche alla centralità della loro funzione per l'assimilazione dell'azoto e dello zolfo. D'altra parte gli amminoacidi servono sia alla sintesi di enzimi che di proteine di riserva.

### *Proteine correlate agli acidi nucleici*

A questa categoria appartengono due gruppi: un primo legato alla sintesi di DNA e RNA, alla trascrizione e alla traduzione. È da osservare che non è mai stata trovata la presenza di sub-unità dei ribosomi 70S; ciò è un'ulteriore conferma che gran parte delle proteine dell'amiloplasto è codificata dal nucleo e quindi la sintesi proteica *in organello* è assai limitata. L'altro gruppo è rappresentato dagli enzimi per la sintesi dei nucleotidi (purina e pirimidina); sembra proprio che nelle piante gran parte di queste reazioni sia localizzata nei plastidi.

### *Attività metaboliche varie*

Nella fase iniziale di sviluppo gli amiloplasti sono organelli molto versatili che partecipano, come riportato sopra, alla sintesi di molte molecole fondamentali. È stato chiarito da tempo che le piante posseggono due vie di biosintesi per gli isoprenoidi, una citosolica e una plastidiale. Per la sintesi dei tetrapirroli anche gli amiloplasti sono attivi; occorre comunque tenere presente che gli amiloplasti non richiedono pigmenti fotosintetici; d'altra parte gli enzimi per la sintesi delle clorofille sono tutti sotto stretto controllo della luce. Infine sono stati identificati diversi enzimi della sintesi *de novo* degli acidi grassi che conferma l'importanza del plastidio per soddisfare le richieste della cellula anche per queste sostanze.

Quindi, nei primi stadi di sviluppo del seme, gli amiloplasti funzionano per produrre metaboliti essenziali per la pianta madre.

### *Modifiche proteiche*

Questa è una delle categorie proteiche più presenti nell'amiloplasto, comprendendo proteine attive nel folding, nell'assemblaggio, nel turn-over e

nell'accumulo di specie proteiche. D'altra parte sia l'elevato numero di proteasi identificate che l'analogo numero di "chaperones" suggerirebbero un rapido turn-over delle proteine plastidiali che, tra l'altro è coerente con quanto rinvenuto negli endospermi di grano (Vensel et al., 2005).

### *Trasporto*

I trasportatori di membrana dell'amiloplasto sono rilevanti sia per importare metaboliti, ma anche per trasferirli all'interno della cellula. Oltre al traslocatore dell'ADP-glucosio, che importa l'ADP-glucosio fatto nel citosol, sono state scoperte altre 18 proteine attive nel trasporto. Ciò sottolinea quanto sia complessa l'attività dell'involucro plastidiale. Di elevato interesse è anche il movimento di ioni attraverso il plastidio.

### *Signaling*

Sono proteine collegate agli ormoni, alla fosforilazione, al GTP e a varie pathway del signaling. In tutto sono state identificate 16 proteine probabilmente collegate alla regolazione dello sviluppo del plastidio e forse anche alla ripartizione del carbonio tra le diverse pathway. Si ritiene che l'amiloplasto sia connesso alla complessa rete di signaling per il suo importante ruolo nello sviluppo dell'endosperma dei cereali.

### *Proteine correlate allo stress*

Sono state identificate catalasi e SOD (funzionali alla rimozione delle ROS), ma anche proteine collegate alla produzione di gruppi tiolici (perossiredossine ed enzimi della sintesi del glutatione) o all'ascorbato (con azione detossificante sulle ROS).

### *Conclusioni*

Gli amiloplasti, organelli che accumulano amido in tessuti eterotrofi, mostrano una ampia capacità biosintetica che, probabilmente, non è richiesta solo per la crescita e lo sviluppo del plastidio, ma anche per l'intera cellula che



lo ospita. Molte delle attività biochimiche che avvengono nei cloroplasti, si ritrovano anche nell'amiloplasto (sintesi di amminoacidi, di isoprenoidi, di acidi grassi, di tetrapirroli, ecc.).

Mediante un confronto tra le proteine del cloroplasto, benché più conosciute e numerose, e dell'amiloplasto, si osserva che percentualmente l'amiloplasto ha più proteine per metabolismo dei carboidrati, per quello dell'N/S e per la bioenergetica. Nel cloroplasto sono maggiori le proteine dal significato sconosciuto. In entrambi i tipi di plastidio si rinvenivano attività fondamentali per costruire molecole di base ("building blocks") e quindi indipendentemente dal tipo di cellula che li ospita che può essere sia fotosintetica come eterotrofa. Rimane un interrogativo di fondo riguardante la regolazione: se nel cloroplasto molte attività biochimiche sono modulate dalla luce, come viene regolata l'attività dell'amiloplasto? Questo è l'aspetto sul quale le informazioni sono ancora frammentarie.

A conclusioni diverse si è giunti lavorando sui giovani tuberi di patata. In questi amiloplasti l'enzima dominante risulta l'amido fosforilasi L-1, ma insieme a questa erano presenti varie proteine del metabolismo dell'amido e del saccarosio, della via del pentoso fosfato, della glicolisi, del metabolismo amino acidico e infine altre proteine come, ad esempio, le chaperonine. Molte di queste proteine erano certamente entrate nell'organello tramite il transit peptide, ma alcune, come l'amido fosforilasi H non avevano tale TP. Oltre a questo fatto si è anche osservato che tutte le polifenolo ossidasi, le enolasi, una trasketolasi, la sulfito riduttasi e altre ancora possedevano una sequenza Sec (secretoria) che normalmente indirizza alle strutture tilacoide-simili. Siccome erano presenti anche proteine con le sequenze Tat (twin-arginine translocation) gli autori concludono che sia opportuna una rivalutazione delle funzioni metaboliche di varie proteine plastidiali e della loro localizzazione nell'amiloplasto (Stensballe et al., 2008).

#### BIBLIOGRAFIA

- ANDON N.L., HOLLINGWORTH S., KOLLER A., GREENLAND A.J., YATES 3RD J.R., HAYNES P.A. (2002): *Proteomic characterization of wheat amyloplasts using identification of proteins by tandem mass spectrometry*, «Proteomics», 2, pp. 1156-1168.
- ARMBRUSTER U., HERTLE A., MAKARENKO E., ZÜHLKE J., PRIBIL M., DIETZMANN A., SCHLIEBNER I., ASEEEVA E., FENINO E., SCHARFENBERG M., VOIGT C., LEISTER D. (2009): *Chloroplast Proteins without Cleavable Transit Peptides: Rare Exceptions or a Major Constituent of the Chloroplast Proteome?*, «Mol Plant», 2, pp. 1325-1335.

- ARMBRUSTER U., PESARESI P., PRIBIL M., HERTLE A., LEISTER D. (2011): *Update on Chloroplast Research: New Tools, New Topics, and New Trends*, «Mol Plant», 4, pp. 1-16.
- BALMER Y., VENSEL W.H., CAI N., MANIERI W., SCHURMANN P., HURKMAN W.J., BUCHANAN B.B. (2006a): *A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental processes in amyloplasts*, «PNAS», 103, pp. 2988-2993.
- BALMER Y., VENSEL W.H., DUPONT F.M., BUCHANAN B.B., HURKMAN W.J. (2006b): *Proteome of amyloplasts isolated from developing wheat endosperm presents evidence of broad metabolic capability*, «J Exp Bot.», 57, pp. 1591-1602.
- BAIER M., DIETZ K.-J. (2005): *Chloroplasts as source and target of cellular redox regulation: a discussion on chloroplast redox signals in the context of plant physiology*, «J. Exp. Bot.», 56, pp. 1449-1462.
- BOUVIER F., BACKHAUS R.A., CAMARA B. (1998): *Induction and control of chloroplast-specific carotenoid genes by oxidative stress*, «J. Biol. Chem.», 273, pp. 30651-30659.
- DIETZ K.J. (2008): *Redox signal integration: from stimulus to networks and genes*, «Physiol. Plant.», 133, pp. 2123-2137.
- EGEA I., BARSAN C., BIAN W., PURGATTO E., LATCHÉ A., CHERVIN C., BOUZAYEN M., PECH J.-C. (2010): *Chromoplast Differentiation: Current Status and Perspectives*, «Plant Cell Physiol.», 51, pp. 1601-1611.
- EGEA I., BIAN W., BARSAN C., JAUNEAU A., PECH J.-C., LATCHÉ A., LI Z., CHERVIN C. (2011): *Chloroplast to chromoplast transition in tomato fruit: spectral confocal microscopy analyses of carotenoids and chlorophylls in isolated plastids and time-lapse recording on intact live tissue*, «Annals of Botany», 108, pp. 291-297.
- FERRO M., BRUGIÈRE S., SALVI D., SEIGNEURIN-BERNY D., COURT M., MOYET L., RAMUS C., MIRAS S., MELLAL M., LE GALL S., KIEFFER-JAQUINOD S., BRULEY C., GARIN J., JOYARD J., MASSELON C., ROLLAND N. (2010): *AT\_CHLORO: a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins*, «Mol. Cell Proteomics», 9, pp. 1063-1084.
- GEIGENBERGER P., KOLBE A., TIESSEN A. (2005): *Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars*, «J. Exp. Bot.», 56, pp. 1469-1479.
- JOYARD J., FERRO M., MASSELON C., SEIGNEURIN-BERNY D., SALVI D., GARIN J., ROLLAND N. (2009): *Chloroplast Proteomics and the Compartmentation of Plastidial Isoprenoid Biosynthetic Pathways*, «Mol. Plant», 2, pp. 1154-1180.
- KAHLAU S., BOCK R. (2008): *Plastid transcriptomics and translaticomics of tomato fruit development and chloroplast-to-chromoplast differentiation: chromoplast gene expression largely serves the production of a single protein*, «The Plant Cell», 20, pp. 856-887.
- KEBEISH R., NIESSEN M., THIRUVEEDHI K., BARI R., HIRSCH H.J., ROSENKRANZ R., STÄBLER N., SCHÖNFELD B., KREUZALER F., PETERHÄNSEL C. (2007): *Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in Arabidopsis thaliana*, «Nat Biotechnol.», 25, pp. 593-599.
- LI X.-P., BJÖRKMAN O., SHIH C., GROSSMAN A.R., ROSENQUIST M., JANSSON S., NIYOGI K.K. (2000): *A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting*, «Nature», 403, pp. 391-395.
- LU S., VAN ECK J., ZHOU, LOPEZ A.B., O'HALLORAN D.M., COSMAN K.M., CONLIN B. J., PAOLILLO D. J., GARVIN D.F., VREBALOV J., KOCHIAN L. V., KÜPPER H., EARLE E.D., CAO J., LI L. (2006): *The cauliflower Or gene encodes a DnaJ cysteine-rich do-*

- main-containing protein that mediates high levels of  $\beta$ -carotene accumulation, «Plant Cell», 18, pp. 3594-3605.
- MATILE P. (2000): *Biochemistry of indian summer: physiology of autumnal leaf coloration*, «Exp. Gerontol.», 35, pp. 145-158.
- MICHELET L., ZAFFAGNINI M., MARCHAND C., COLLIN V., DECOTTIGNIES P., TSAN P., LANCELIN J-M., TROST, P., MIGINIAC-MASLOW M., NOCTOR G., LEMAIRE S.D. (2005): *Glutathionylation of Chloroplast Thioredoxin f Is a Redox Signaling Mechanism in Plants*, «PNAS», 102, pp. 16478-16483.
- MOULIN M., MCCORMAC A.C., TERRY M.J., SMITH A.G. (2008): *Tetrapyrrole profiling in Arabidopsis seedlings reveals that retrograde plastid nuclear signaling is not due to Mg-protoporphyrin IX accumulation*, «Proc. Natl Acad. Sci. U S A», 105, pp. 15178-15183.
- PESARESI P., PRIBIL M., WUNDER T., LEISTER D. (2011): *Dynamics of reversible protein phosphorylation in thylakoids of flowering plants: the roles of STN7, STN8 and TAP38*, «Biochim. Biophys. Acta. Bioenergetics», 8, pp. 887-96.
- PREBERG T., WRISHER M., FULGOSI H., LJUBESIC N. (2008): *Ultrastructural characterization of the reversible differentiation of chloroplasts in cucumber fruit*, «J. Plant Physiol.», 51, pp. 122-131.
- REILAND S., MESSERLI G., BAERENFALLER K., GERRITS B., ENDLER A., GROSSMANN J., GRUISSEM W., BAGINSKY S. (2009): *Large-scale Arabidopsis phosphoproteome profiling reveals novel chloroplast kinase substrates and phosphorylation networks*, «Plant Physiol.», 150, pp. 889-903.
- RUTSCHOW H., YTTERBERG A.J., FRISO G., NILSSON R., VAN WIJK K.J. (2008): *Quantitative proteomics of a chloroplast SRP54 sorting mutant and its genetic interactions with CLPC1 in Arabidopsis*, «Plant Physiol.», 148, pp. 156-175.
- SCHALLER S., LATOWSKI D., JEMIOŁA-RZEMIŃSKA M., WILHELM C., STRZAŁKA K., GOSS R. (2010): *The main thylakoid membrane lipid monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) promotes the de-epoxidation of violaxanthin associated with the light-harvesting complex of photosystem II (LHCII)*, «Biochim Biophys Acta», 1797, pp. 414-424.
- SERRATO A.J., PÉREZ-RUIZ J.M., SPÍNOLA M.C., CEJUDO F.J. (2004): *A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in Arabidopsis thaliana*, «J. Biol. Chem.», 279, pp. 43821-43827.
- SIDDIQUE M.A., GROSSMANN J., GRUISSEM W., BAGINSKI S. (2006): *Proteome analysis of bell pepper (Capsicum annuum L.) chromoplasts*, «Plant and Cell Physiology», 47, pp. 1663-1673.
- SIRPIÖ S., ALLAHVERDIYEVA Y., HOLMSTRÖM M., KHROUCHTCHOVA A., HALDRUP A., BATTCHIKOVA N., ARO E.M. (2009): *Novel nuclear-encoded subunits of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex*, «J. Biol. Chem.», 284, pp. 905-912.
- STENSALLE A., HALD S., BAUW G., BLENNOW A., WELINDER K.G. (2008): *The amyloplast proteome of potato tuber*, «FEBS Journal», 275, pp. 1723-1741.
- STETTTLER M., EICKE S., METTLER T., MESSERLI G., HÖRTENSTEINER S., ZEEMAN S.C. (2009): *Blocking the metabolism of starch breakdown products in Arabidopsis leaves triggers chloroplast degradation*, «Mol. Plant.», 2, pp. 1233-1246.
- VENSEL W.H., TANAKA C.K., CAI N., WONG J.H., BUCHANAN B.B., HURKMAN W.J. (2005): *Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm*, «Proteomics», 5, pp. 1594-1611.

- VITHA S., FROEHLICH J.E., KOKSHAROVA O., PYKE K.A., VAN ERP H., OSTERYOUNG K.W. (2003): *ARC6 is a J-domain plastid division protein and an evolutionary descendant of the cyanobacterial cell division protein Ftn2*, «Plant Cell», 15, pp. 1918-1933.
- YU Q-B., JIANG Y., CHONG K., YAN Z-N. (2009): *AtECB2, a pentatricopeptide repeat protein, is required for chloroplast transcript accD RNA editing and early chloroplast biogenesis in Arabidopsis thaliana*, «The Plant Journal», 59, pp. 1011-1023.
- ZYBAILOV B., RUTSCHOW H., FRISO G., RUDELLA A., EMANUELSSON O., SUN Q., VAN WIJK K.J. (2008): *Sorting Signals, N-Terminal Modifications and Abundance of the Chloroplast Proteome*, «PLoS ONE» 3, e1994.

## Cibo ed energia dalle microalghe: realtà o illusione che si rinnova?

### I. LE MICROALGHE: RUOLO AMBIENTALE

Le microalghe, includendo nella definizione anche i cianobatteri che con le microalghe condividono il metabolismo bioenergetico (la fotosintesi ossigenica), ma ne differiscono per la struttura cellulare (eucariotica nelle prime, procariotica nei secondi), sono direttamente responsabili di circa il 50% della fotosintesi sulla terra. Tuttavia, se si considera che secondo la teoria dell'endosimbiosi i cianobatteri sotto forma di cloroplasti sono presenti nelle microalghe, così come nei vegetali inferiori e superiori, in realtà tutta la fotosintesi ossigenica sulla terra, e quindi tutto l'ossigeno prodotto per via biologica, è opera di questi antichi microrganismi procariotici (fig. 1).

Le microalghe sono i produttori primari negli ambienti acquatici, cioè costituiscono il primo anello della catena trofica, garantendo non solo l'ossigeno per la respirazione aerobica, ma anche il flusso di materia organica e di energia per la crescita della maggior parte degli organismi superiori negli ecosistemi marini e nelle acque dolci. Purtroppo, questi preziosi microrganismi sono anche causa d'inquinamento quando, in presenza di elevate quantità di nutrienti (in particolare azoto e fosforo), danno origine ai *bloom*, ovvero proliferazioni abnormi di una o poche specie algali che alterano pesantemente la chimica delle acque, spesso anche con produzione di tossine. I *bloom* stanno assumendo dimensioni sempre più estese per effetto combinato dell'attività antropica e dei cambiamenti climatici, con pesanti ripercussioni di carattere ambientale, sanitario ed economico (fig. 2).

\* Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agroalimentari e dell'Ambiente, Università di Firenze

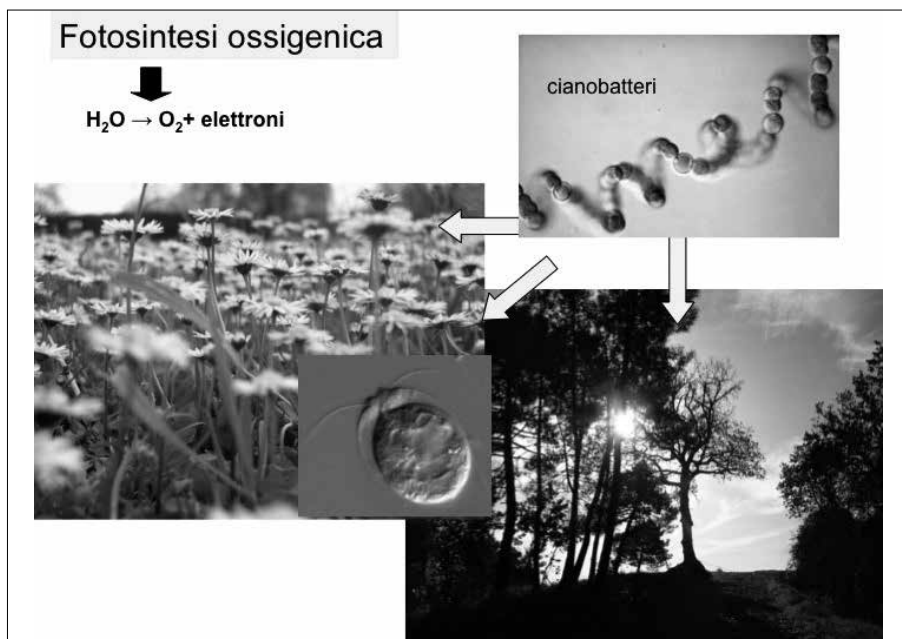


Fig. 1 *I cianobatteri: i primi organismi fotosintetici ossigenici*

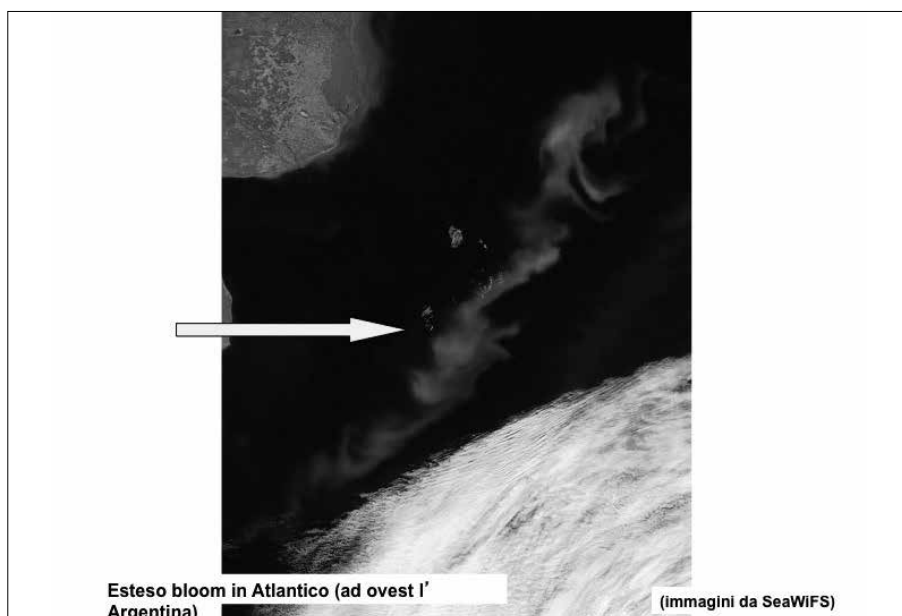


Fig. 2 *Bloom algale ripreso dallo spazio*

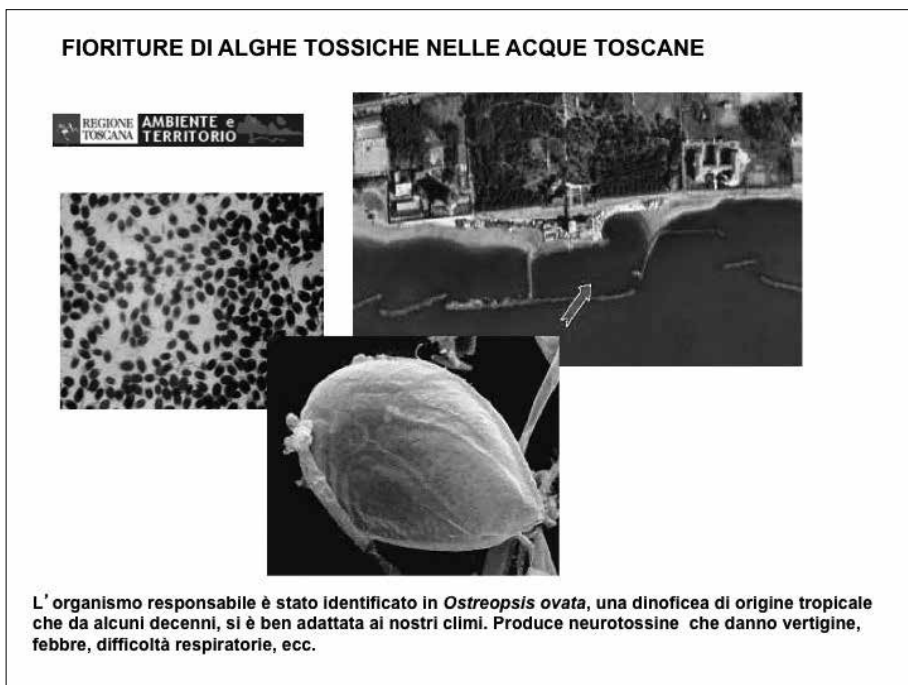


Fig. 3 «*Ostreopsis ovata*», dinoflagellato responsabile di bloom tossici nei mari di Toscana e Liguria

In Italia, il fenomeno colpisce spesso le coste toscane e liguri dove si verificano fioriture di *Ostreopsis ovata*, un'alga di origine tropicale che si è ben adattata al nostro clima e produce sostanze tossiche che veicolate dall'aerosol marino aggrediscono le vie respiratorie causando malori e vertigini (fig. 3).

## 2. LE MICROALGHE: APPLICAZIONI COMMERCIALI

L'utilizzo delle microalghe per scopi alimentari non è recente. Anche se ridotti in numero ed entità rispetto a quelli dannosi, non mancano i casi di *bloom* algali sfruttati dall'uomo. Ad esempio, in Ciad le popolazioni Kanembu sfruttano da secoli le fioriture naturali di *Arthrospira platensis* (comunemente nota come spirulina) a scopo alimentare (fig. 4). In Oregon (USA) le fioriture di *Aphanizomenon flos-aquae*, che si formano spontaneamente nel lago Klamath, vengono raccolte e se ne ottengono integratori alimentari (le alghe AFA) di largo consumo negli USA e in Europa, sebbene siano motivo

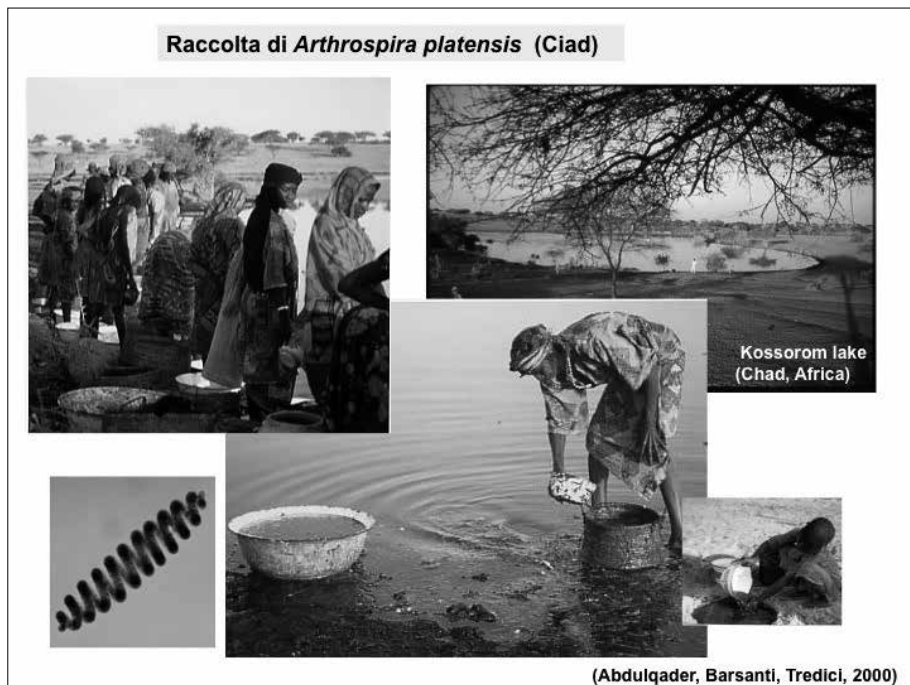


Fig. 4 Raccolta di «*Arthrospira platensis*» da un «bloom» naturale (Abdulqader et al., 2000)

di qualche preoccupazione a causa della loro potenziale tossicità (Biondi ed al., 2008).

Oggi assistiamo a un crescente interesse per le colture algali, principalmente volto a un loro sfruttamento a scopi energetici (soprattutto olio per biodiesel), anche se la produzione industriale è limitata ai soli mercati di nicchia come quello degli integratori alimentari e dei cosmetici. Gli impianti commerciali per la produzione di biomassa algale si basano soprattutto su sistemi aperti, di cui il tipo più diffuso sono le vasche «*raceway*»: bacini a corsie, profondi 15-20 cm, costruiti in cemento oppure scavati nel terreno e rivestiti con membrane plastiche, dove la sospensione algale scorre tenuta in movimento mediante pale rotanti o *paddle wheel* (fig. 5). Tra gli impianti maggiori vi è quello della Earthrise (California, USA) per la produzione commerciale di *Arthrospira* in vasche *raceway* di dimensioni comprese tra 1000 e 3000 m<sup>2</sup> (fig. 5).

Lagune naturali di decine di ettari vengono invece usate in Australia per la coltivazione estensiva di *Dunaliella salina*, alga verde alotollerante ricca in  $\beta$ -carotene. Le alghe del genere *Dunaliella* crescono in presenza di elevata salinità che le protegge dai contaminanti. Data la vasta dimensione dei bacini di coltura non si usano dispositivi di rimescolamento, essendo sufficienti l'azione



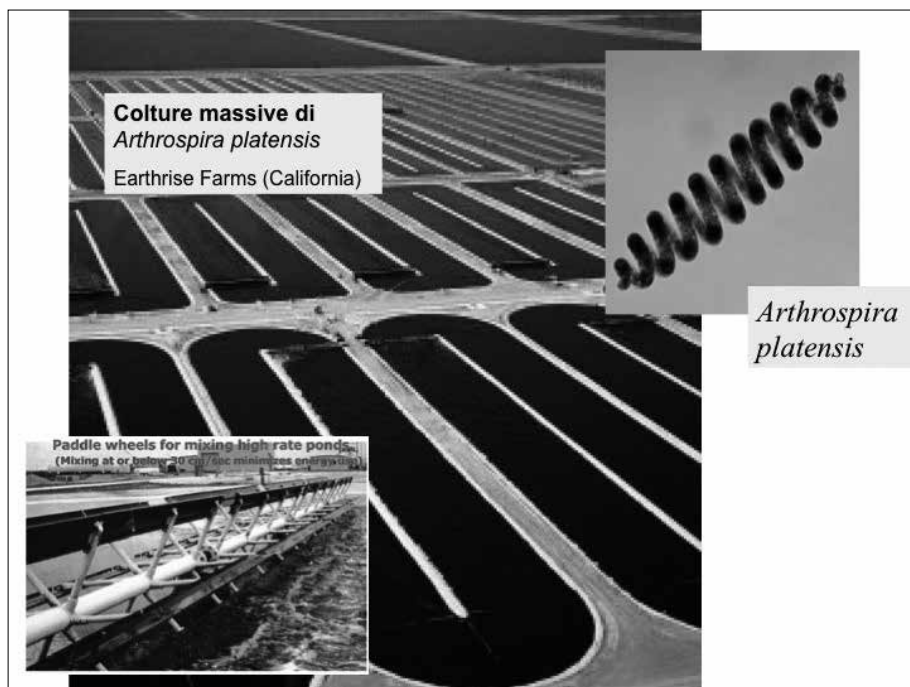


Fig. 5 Coltura massiva di «*Arthrospira platensis*» in vasche «raceway»

del vento e le correnti convettive all'interno del liquido (fig. 6). Le produttività di questi bacini naturali rimangono comunque di gran lunga inferiori a quelle ottenute nelle vasche *raceway*.

Sebbene siano state sviluppate numerose tipologie di fotobioreattori chiusi (FBR) per la coltivazione delle microalghe, pochissimi sono quelli a oggi impiegati nella produzione commerciale. In questi impianti si coltivano microalghe per ottenere prodotti ad alto valore che giustificano gli alti costi di capitale e operativi tipici dei sistemi di coltura chiusi. I principali impianti commerciali a FBR a oggi attivi sono:

*Bioprodukte Prof. Steinberg GmbH* (Klötze, Germania). Di proprietà della francese Roquette Freres è l'impianto chiuso di maggiori dimensioni (occupa una serra di 12.000 m<sup>2</sup>) finora costruito per la produzione di microalghe. Consiste di 20 moduli costruiti con tubi di vetro che sviluppano una lunghezza totale di 500 km e un volume complessivo di 700 m<sup>3</sup> (fig. 7). L'impianto è usato per la produzione di *Chlorella* destinata al settore alimentare/nutraceutico.

*Algatechnologies Ltd.* (Israele) L'impianto è costituito da reattori tubolari

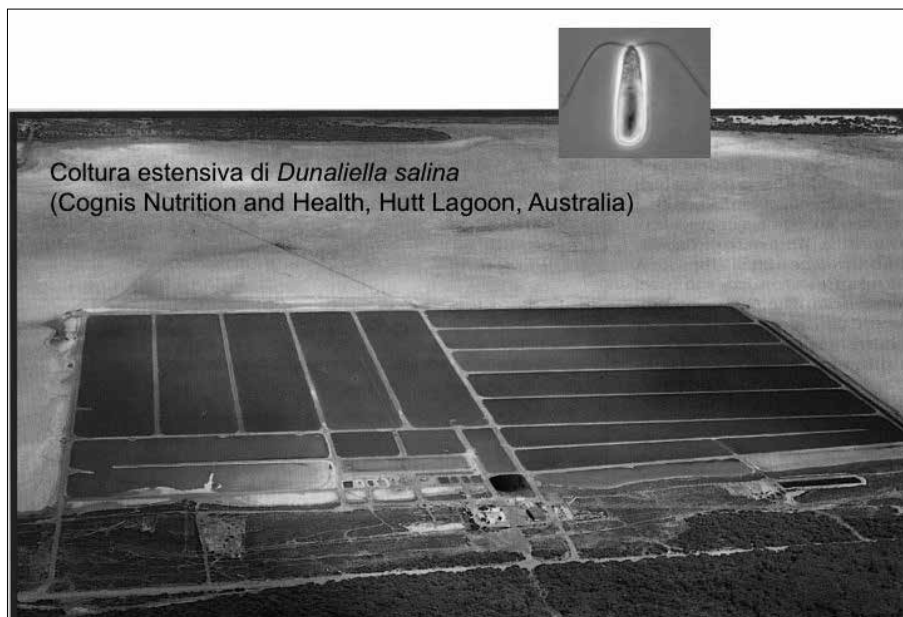


Fig. 6 Lagune naturali per la produzione di «*D. salina*» (Australia)

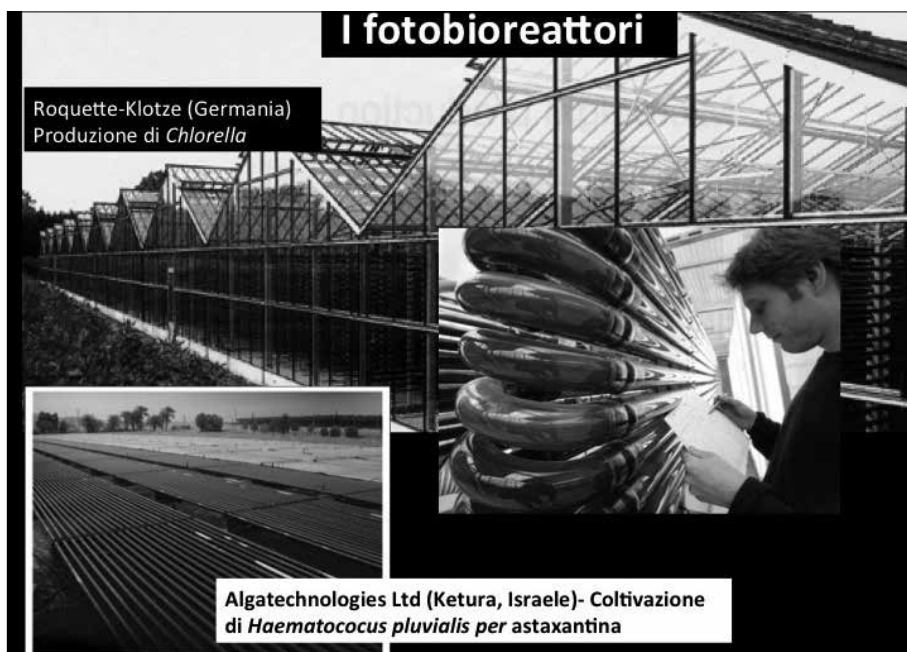


Fig. 7 Fotobioreattori commerciali

## II GREEN WALL PANEL



MICROALGHE CAMPOROSSO S.r.l.

(Imperia – Italia)

Produzione di microalghe per l'acquacoltura e la  
cosmeceutica

Impianto su tecnologia di Fotosintetica & Microbiologica S.r.l.  
(spin-off dell'Università di Firenze)

Fig. 8 Impianto della Microalghe Camporosso S.r.l. (Imperia) con reattori GWP della Fotosintetica & Microbiologica S.r.l. (Firenze)

a *manifold*. La compagnia commercializza prodotti derivati dalle microalghe per il settore cosmetico e dei nutraceuticals, in particolare astaxantina da *Haematococcus pluvialis* (fig. 7).

In Italia la Microalghe Camporosso S.r.l. produce biomasse di *Arthrospira*, *Nannochloropsis*, *Tetraselmis*, *Isochrysis* e *Phaeodactylum* per i mercati dell'acquacoltura e della cosmeceutica utilizzando reattori Green Wall Panel (GWP) della Fotosintetica & Microbiologica S.r.l. (fig. 8).

Nonostante le numerose applicazioni, la produzione mondiale di biomassa microalgale non supera le 20.000 tonnellate per anno ed è essenzialmente destinata a mercati di “nicchia” con impiego di non oltre una dozzina di specie algali (tab. 1).

### 3. LA COLTURA DELLE MICROALGHE: I LIMITI

I principali limiti allo sviluppo della tecnologia delle microalghe si trovano nel passaggio a scala commerciale. La coltura delle microalghe, che può essere

PRODOTTO/PROCESSO	SPECIE E QUANTITÀ PRODOTTA PER ANNO	STATUS E SISTEMA DI CULTURA
Integratori alimentari, mangimi	<i>Arthrospira</i> (3000 t); <i>Chlorella</i> (2000 t); <i>Dunaliella</i> (1200 t); <i>Aphanizomenon</i> (500 t); <i>Haematococcus</i> (300 t)	Commerciale (vasche "raceway", vasche circolari, lagune, fotobioreattori)
Pigmenti (carotenoidi, ficobili-proteine)	<i>Dunaliella</i> ; <i>Arthrospira</i> ; <i>Haematococcus</i>	Commerciale (come sopra)
Acidi grassi polinsaturi $\omega$ 3 (DHA)	<i>Schizochytrium</i> (10 t olio); <i>Cryptocodinium</i> (240 t olio)	Commerciale (fermentatori da 10-100 m <sup>3</sup> )
Diagnostica (fluorocromi)	<i>Arthrospira</i> ; <i>Anabaena</i> ; <i>Anacystis</i>	Commerciale (piccoli fotobioreattori)
Composti marcati (isotopi stabili)		
Enzimi di restrizione		
Acquacoltura	Varie spp. (1000 t)	Commerciale (cilindri, sacchi, serbatoi)
Polisaccaridi		Ricerca
Biofertilizzanti		Ricerca
Molecole bioattive (biopesticidi, probiotici, farmaci, biosensori, cosmetici)		Ricerca
Biorisanamento (sostanze chimiche, metalli pesanti)		Ricerca
Biofissazione della CO <sub>2</sub>		Ricerca
Energia (biodiesel, H <sub>2</sub> )		Ricerca

Tab. 1 Applicazioni commerciali e potenziali delle microalghe

semplice in piccoli sistemi di laboratorio, diventa estremamente complessa su larga scala in quanto non si avvale di sistemi axenici (ovvero costituiti da un unico organismo) come nel caso delle fermentazioni industriali condotte con lieviti e batteri, ma di consorzi di microalghe e batteri le cui interazioni sono regolate da numerosi fattori (fig. 9), alcuni dei quali (ad esempio luce e temperatura) variano nell'arco della giornata.

Un altro pesante limite alla tecnologia algale è la bassa produttività delle colture all'aperto conseguente la bassa efficienza della fotosintesi nel convertire l'energia dei fotoni (energia radiante) in energia chimica (biomassa).

Le limitazioni fondamentali al conseguimento di elevate efficienze all'aperto sono:

1 - la radiazione fotosinteticamente attiva (PAR) – ovvero la frazione di radiazione solare utilizzabile (fig. 10);

2 - i meccanismi biochimici grazie ai quali l'apparato fotosintetico converte l'energia luminosa della PAR in energia chimica.

Solo il 43-45% della radiazione solare totale, quella con lunghezza d'onda tra 400 e 700 nm, è utilizzabile per la fotosintesi ossigenica (fig. 10). Di

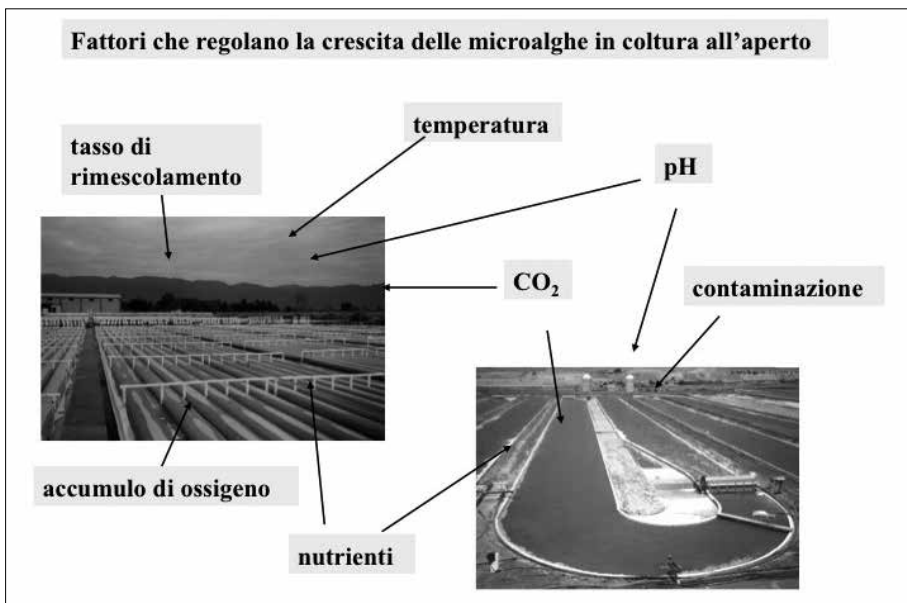


Fig. 9 Principali fattori che regolano la crescita delle microalghe all'aperto

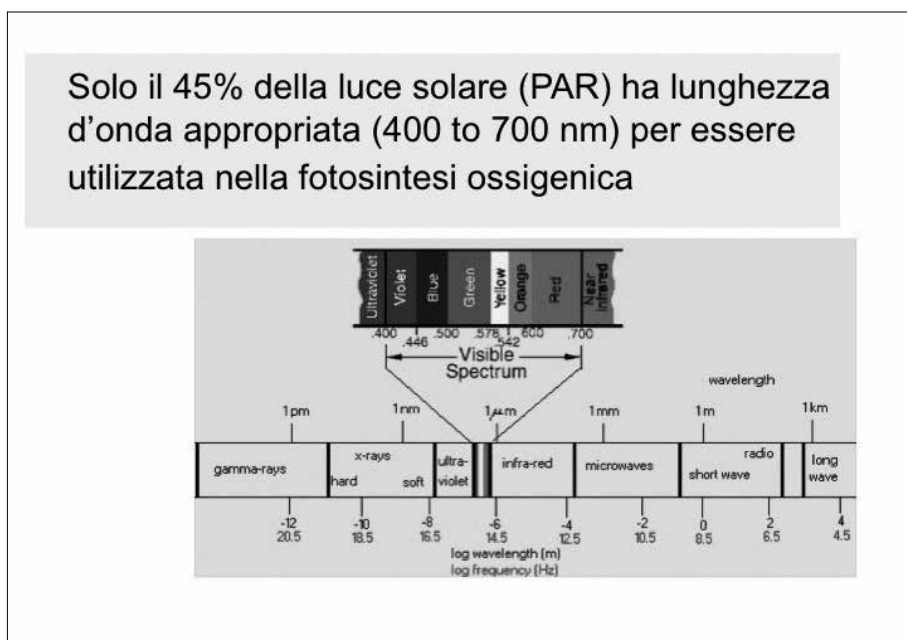


Fig. 10 Spettro della radiazione solare visibile che coincide con quella fotosinteticamente utilizzabile (detto PAR da Photosynthetically Active Radiation)

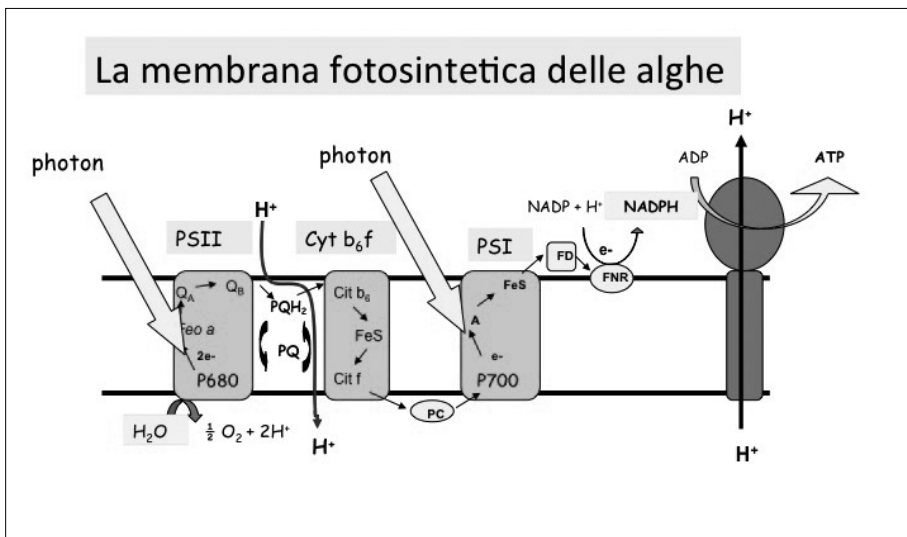
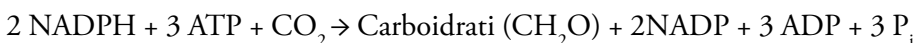


Fig. 11 *Membrana fotosintetica degli organismi fototrofi ossigenici*

conseguenza oltre la metà della radiazione solare disponibile viene sprecata perché non ha la lunghezza d'onda giusta per essere assorbita dai pigmenti fotosintetici.

L'altro limite è di carattere biochimico. Le microalghe fissano l'anidride carbonica con il "Ciclo di Calvin", lo stesso utilizzato dalle piante superiori.

Per fissare una molecola di  $\text{CO}_2$  nel ciclo di Calvin



Nel Ciclo di Calvin, per fissare una molecola di  $\text{CO}_2$  sono necessarie due molecole di NADPH e tre molecole di ATP. Per ottenere due NADPH (a partire dalla forma ossidata NADP) servono 4 elettroni con adeguato potenziale di ossidoriduzione. Visto che nella fotosintesi ossigenica si richiedono due fotoni per strappare un elettrone (dall'acqua), dotarlo di un adeguato potenziale riducente e trasferirlo al NADP, in totale sono necessari non meno di 8 fotoni per fissare una molecola di  $\text{CO}_2$ . La figura 11 schematizza la membrana fotosintetica con i due fotosistemi e la catena di trasporto degli elettroni dall' $\text{H}_2\text{O}$  al NADP.

Per un corretto calcolo dell'efficienza della fotosintesi, bisogna ricordare che:

- sono necessari 8 fotoni per ridurre una molecola di  $\text{CO}_2$ ;
- i fotoni del PAR hanno un contenuto energetico medio di 217 kJ per mole;
- l'energia di una mole di  $\text{CO}_2$  fissata sotto forma di carboidrato è pari a 475 kJ (1/6 di quella del glucosio).

Di conseguenza, il massimo teorico di efficienza di conversione della luce solare in carboidrati è  $475 \text{ kJ} / (217 \text{ kJ} \times 8) = 27\%$ . Poiché il PAR rappresenta soltanto il 45% della radiazione totale, il valore massimo di conversione dell'energia luminosa si riduce a circa il 12% (cioè il 27% di 45%). Considerate le altre inevitabili perdite di energia durante il processo di fotosintesi, è ragionevole ritenere che il massimo teorico di efficienza della fotosintesi per la luce solare non superi il 10%. Nella realtà, un'efficienza fotosintetica del 10% può essere ottenuta soltanto in condizioni di laboratorio o con basse intensità luminose. All'aperto, le microalghe ricevono una quantità di luce troppo elevata che non solo viene sprecata (fotosaturazione), ma è causa di fotoinibizione e conseguente danno cellulare. A causa del necessario rimescolamento della coltura, le microalghe passano continuamente da una situazione di forte illuminazione (negli strati superficiali) a una di buio sostanziale (negli strati profondi), sono cioè esposte a una continua alternanza luce-buio che ne modifica la tipica curva di risposta fotosintetica alla luce diminuendo l'efficienza di utilizzo dell'energia luminosa. Le cellule algali nelle colture massive sono molto pigmentate (cioè fotoacclimatate a bassa luce) perché crescono in una coltura densa e quindi in condizioni medie di scarsa illuminazione. Queste cellule, quando arrivano in superficie, catturano fotoni in largo eccesso rispetto alla velocità con la quale possono utilizzarli nelle reazioni di fissazione della  $\text{CO}_2$ . L'eccesso di energia assorbita viene dissipato in varie forme (tra cui fluorescenza e calore), ma non senza causare danni (fotoinibizione). Il danno è soprattutto a carico dei sistemi di trasporto elettronico e va a diminuire ulteriormente l'efficienza del processo fotosintetico.

In tabella 2 viene raffrontata l'efficienza fotosintetica delle piante C3 e C4 con quella delle microalghe. Nei tre gruppi, partendo dal totale della luce solare incidente (100%) e considerando le perdite minime dovute a 1) radiazione non utile perché fuori dal PAR (55%), 2) degradazione dei fotoni PAR assorbiti all'energia di eccitazione a 700 nm (21%) e 3) alla conversione di quest'ultimi nell'energia chimica del glucosio (65% nelle C3 e nelle alghe; 77% nelle C4), si arriva a un valore massimo teorico di efficienza fotosintetica pari al 12,4% nelle C3 e nelle microalghe e del 8,2% nelle C4. Dopo un'ulteriore perdita minima comune del 10% per fenomeni di riflessione, in ogni gruppo si perde efficienza per fattori

PERDITE ENERGETICHE MINIME	ENERGIA RESIDUA		
	PIANTE C3	PIANTE C4	MICROALGHE
Radiazione solare incidente	100%	100%	100%
Radiazione fuori dal PAR (55%)	45%	45%	45%
Degradazione dei fotoni PAR assorbiti all'energia di eccitazione a 700 nm (21%)	35,6%	35,6%	35,6%
Conversione dell'energia di eccitazione a 700 nm in energia chimica del glucosio (65% nelle piante C3 e nelle microalghe; 77% nelle piante C4)	12,4%	8,2%	12,4%
Riflessione (10%)	11,2%	7,4%	11,2%
Fotorespirazione (40% nelle piante C3, nessuna nelle piante C4 e nelle microalghe)	6,7%	7,4%	11,2%
Respirazione (20%)	5,4%	5,9%	9,0%
Fotosaturazione e fotoinibizione (20% nelle piante C3, 10% nelle C4; 40% nelle microalghe)	4,3%	5,3%	5,4%

Tab. 2 *Perdite dell'energia della radiazione totale incidente nelle piante e nelle microalghe (Tredici, 2010)*

diversi (ad es. fotorespirazione) o in diversa entità (ad es. fotosaturazione e fotoinibizione). Come mostrato in tabella, l'unico gruppo che mantiene un valore di conversione piuttosto alto (~ 9%) anche dopo le perdite per respirazione sono le microalghe. Tuttavia, quando si considerano i fenomeni di fotosaturazione e fotoinibizione tipici delle colture algali all'aperto, anche nelle microalghe l'efficienza di conversione si riduce a circa il 5%, valore simile a quello delle piante C4. Sulla base di questo dato è possibile calcolare, attraverso una mappa di distribuzione della radiazione solare a terra (fig. 12), quanta biomassa microalgale sia possibile produrre, in condizioni non limitate da altri fattori (ad esempio temperature non ottimali o carenze nutrizionali) nelle varie zone climatiche della terra (fig. 13).

Esistono zone privilegiate, come il deserto del Sahara, dove con il 5% di efficienza fotosintetica è possibile produrre 240 tonnellate di biomassa secca per ettaro e per anno (considerando un contenuto energetico medio della biomassa algale di 20 MJ/kg). Altre zone sono molto meno favorite. Non necessariamente le zone equatoriali e tropicali sono quelle a maggiore produttività in quanto la copertura nuvolosa può in queste aree diminuire drasticamente la radiazione a terra.

La miglior produttività areale ottenuta in Toscana (Firenze e Livorno) dal nostro gruppo è stata di poco meno di 40 g/m<sup>2</sup> al giorno con un'efficienza fotosintetica pari al 4,5%. Su base annua e su larga scala è tuttavia difficile raggiungere nelle regioni mediterranee una produttività media giornaliera supe-



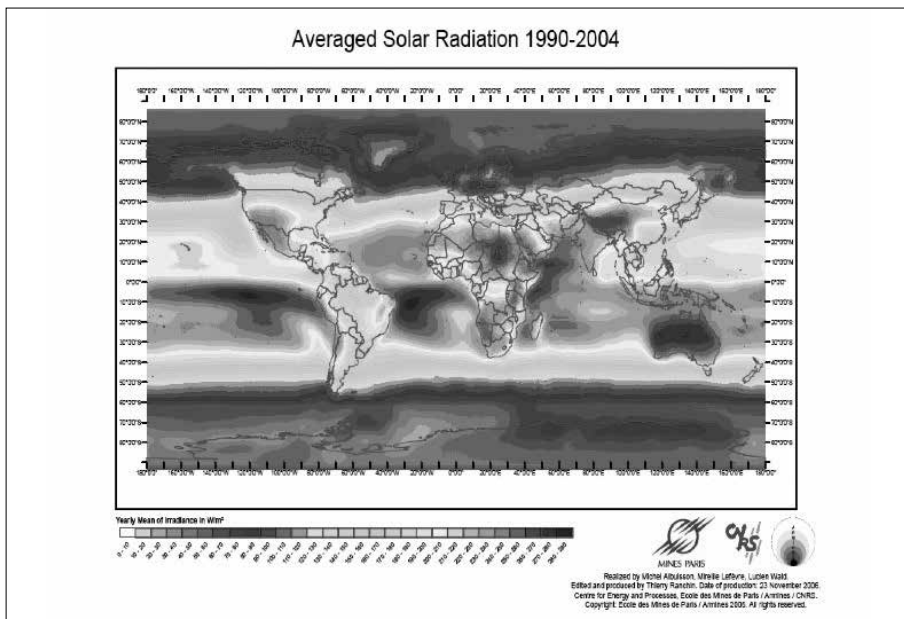


Fig. 12 *Mappa della radiazione solare disponibile sulla terra (media degli anni 1990-2004)*

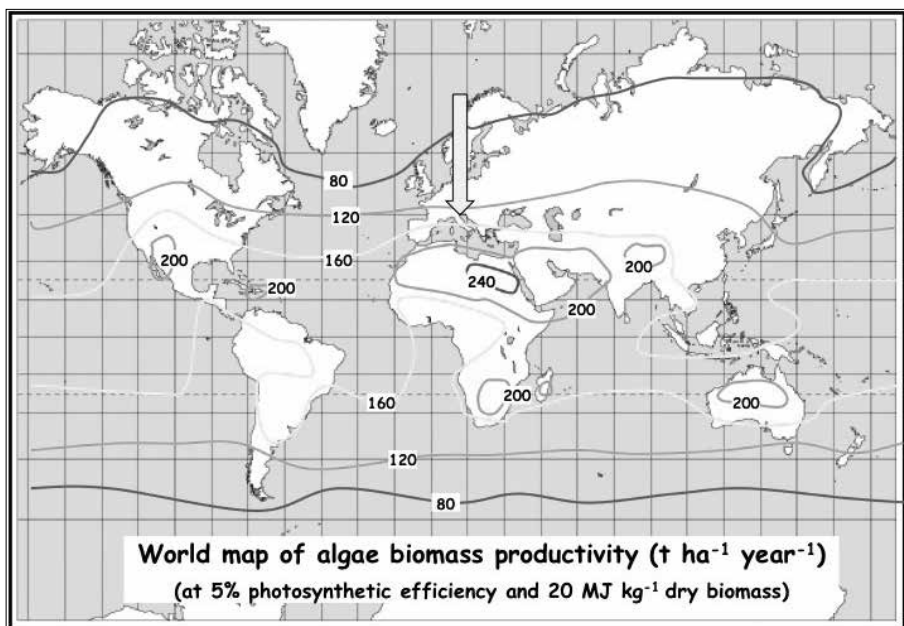


Fig. 13 *Mappa della produttività algale ottenibile nelle diverse aree del globo con una efficienza fotosintetica del 5% sulla radiazione solare disponibile a terra (Tredici, 2010)*

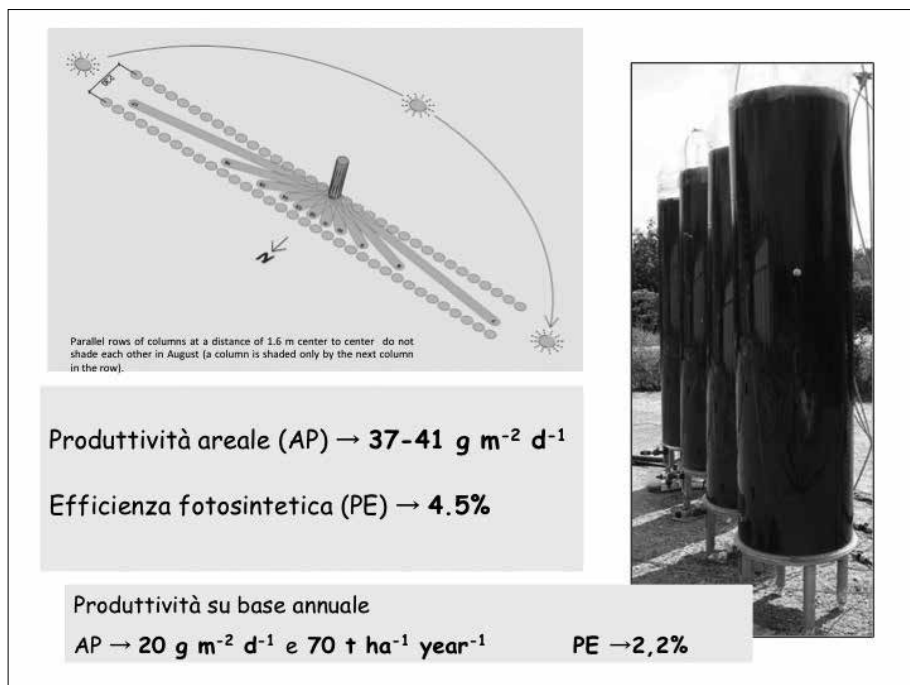


Fig. 14 *Produttività areale ed efficienza fotosintetica (PE) di colture algali nelle condizioni climatiche dell'Italia centrale (Chini Zittelli ed al., 2006)*




riore ai 20 g/m<sup>2</sup>, pari a circa 70 tonnellate per ettaro per anno e una efficienza fotosintetica del 2,2% (fig. 14).

Facendo un confronto con dati di massima produttività potenziale di altre colture, si può notare come la resa su base annua delle microalghe sia tra le migliori, seppure non la più alta in assoluto. Alcune piante C<sub>4</sub> come il sorgo e la canna da zucchero possono toccare, e talvolta superare, le 90 tonnellate per ettaro per anno (tab. 3).

Un altro pesante limite allo sfruttamento energetico delle biotecnologie basate sulla coltura massiva di microalghe è quello del bilancio energetico netto (NER o EROI). Il nostro gruppo ha sperimentato la coltura all'aperto della microalga marina *Tetraselmis* in tre diversi dispositivi (vasche aperte, reattori tubolari e reattori a pannello del tipo Green Wall Panel - GWP). Come mostrato in tabella 4, la produttività è aumentata da 50 (in vasca aperta nei primi anni '80) a 70 (nei GWP) tonnellate di biomassa secca per ettaro e per anno, portando l'output energetico da 1.150 a 1.600 GJ per ettaro per anno (considerando per l'alga un valore energetico medio di 23 MJ/Kg).

TIPO DI BIOMASSA	LUOGO	PRODUZIONE (T P.S. HA <sup>-1</sup> ANNO <sup>-1</sup> )	EFFICIENZA FOTOSINTETICA (%)
Pioppo ( <i>Populus spp.</i> ) (C3)	Minnesota	8 - 11	0,3 - 0,4
Giacinto d'acqua ( <i>Eichornia crassipes</i> )	Missisipi	11 - 33 (>150)	0,3 - 0,9
Switchgrass ( <i>Panicum virgatum</i> ) (C4)	Texas	8 - 20	0,2 - 0,6
Sorgo dolce ( <i>Sorghum bicolor</i> ) (C4)	Texas-California	22 - 47	0,6 - 1,0
Foresta di conifere	Inghilterra	34	1,8
Granoturco ( <i>Zea mays</i> ) (C4)	Israele	34	0,8
Piantagione arborea mista	Congo	36	1,0
Foresta tropicale	India occidentale	60	1,6
Alghe	Diversi luoghi	70	2 - 2,5
Canna da zucchero ( <i>Saccharum officinarum</i> )	Hawaii-Java	64 - 87	1,8 - 2,6
<i>Pennisetum purpureum</i>	Hawaii, Porto Rico	85 - 106	2,2 - 2,8

Tab. 3 *Produttività massima ed efficienza fotosintetica di differenti colture e delle microalghe*

	VASCHE APERTE (CALABRIA, 1983)	REATTORI TUBOLARI (TOSCANA E LAZIO, 1998-2005)	REATTORI GWP (TOSCANA, 2006)
			
Produttività (ton ha <sup>-1</sup> anno <sup>-1</sup> )	~50	57- 60	~ 70
Output energetico (GJ ha <sup>-1</sup> anno <sup>-1</sup> )	1150	1350	1600 (~ 40% > rispetto alle vasche)

Tab. 4 *Produttività e output energetico (con Tetraselmis) in diverse tipologie di sistemi colturali*

Tuttavia è da notare come l’input energetico richiesto per il rimescolamento della coltura nelle vasche sia relativamente contenuto (circa 30 GJ per ettaro per anno, ovvero il 2,6% dell’energia immagazzinata nella biomassa), mentre nel reattore GWP, a seconda dell’alga coltivata e del flusso d’aria prescelto, sono necessari da 470-670 GJ per ettaro per anno, cioè tra il 30 e il 42% dell’energia fissata nella biomassa.

Ci sono numerose altre spese energetiche che spesso non vengono considerate, basti pensare all’energia dei materiali (*embodied energy*) necessari a costruire la vasca o il reattore o all’energia necessaria per il raffreddamento della coltura nel fotobioreattore e che portano a un bilancio energetico (NER) inferiore a uno, cioè l’energia fossile impiegata nella coltivazione supera l’energia chimica immagazzinata nella biomassa nonostante l’apporto (non considerato nel calcolo del NER) dell’energia solare. Per le vasche il costo energetico dei

materiali è di circa 120 GJ per ettaro per anno (~10% del valore energetico della biomassa), mentre nel reattore GWP si sale a oltre 600 GJ per ettaro per anno (quasi il 40% del contenuto energetico della biomassa prodotta). Non trascurabile è poi il costo di raccolta, che in questo caso penalizza le vasche a causa della minore concentrazione della coltura alla raccolta rispetto ai fotobioreattori.

Attualmente il costo di produzione in vasche della biomassa algale oscilla tra 3 e 30 €/kg (peso secco). Il valore più basso è relativo a impianti realizzati in Cina e India che si avvantaggiano di bassi costi della manodopera e delle materie prime. Nei fotobioreattori invece si superano in genere di gran lunga i 30 €/Kg. Gli elevati costi della biomassa algale rendono attualmente non economico l'utilizzo di questi microrganismi come fonte di biocombustibili e molto rimane da fare per colmare il divario tra il costo attuale e il costo di produzione necessario per rendere un biocombustibile da alghe competitivo (< 0.3 €/kg di biomassa secca).

Negli ultimi anni sono stati fatti ingenti investimenti in questo settore, specie negli Stati Uniti. Anche in Europa il settore è in rapida espansione grazie a finanziamenti comunitari e contributi nazionali, sia pubblici che privati. Si vedano ad esempio i progetti MAMBO, finanziato da alcune aziende italiane produttrici di biodiesel e i progetti del 7° programma quadro della UE AQUAFUELS, BIOFAT e GIAVAP ai quali il gruppo fiorentino partecipa.

Il recente interesse per i combustibili da alghe deriva dal fatto che si ritengono ottenibili con le colture algali 150-250 tonnellate di olio per ettaro e per anno. In realtà, come si è visto, tali rese non sono possibili. I motivi per cui si sovrastima il potenziale delle colture algali sono molteplici e non sempre facili da individuare. Tra questi vi è la pratica comune, e concettualmente errata, di estrapolare le potenzialità produttive delle colture massive all'aperto da dati ottenuti in laboratorio a bassa intensità luminosa. Come si è detto, all'aperto, le efficienze fotosintetiche tipiche del laboratorio non sono ottenibili perché le colture algali sprecano gran parte della radiazione solare disponibile.

Inoltre, spesso si confonde il tasso di crescita con la produttività della coltura. È vero che le microalghe possono crescere "velocemente" e in certe condizioni raddoppiare di numero e massa in meno di un giorno. Tuttavia la velocità di crescita nelle colture algali massive, a differenza di quelle microbiche non fotosintetiche, non è direttamente correlata con la produttività. Per avere colture di alghe a rapida crescita, queste devono essere "fotosaturate" o vicine alla fotosaturazione e quindi molto diluite, condizioni nelle quali una grossa frazione della radiazione luminosa incidente attraversa la coltura e non viene



Fig. 15 Il progetto della ENALG e dell'Autorità Portuale a Venezia (da il Messaggero, 31.03.2009)

assorbita. L'obiettivo primo di una coltura algale è invece massimizzare l'intercettazione e l'uso della radiazione solare che la raggiunge. Per assorbire tutti i fotoni che le colpiscono, le colture devono essere adeguatamente dense e in tali condizioni le cellule si ombreggiano reciprocamente tanto che la singola cellula risulta fotolimitata e, per definizione, non può ottenere elevati tassi di crescita.

Un caso che ben illustra di quanto si possa sovrastimare il potenziale delle microalghe è il progetto della ENALG S.r.l. che intende dotare la città di Venezia di un impianto da 50-60 megawatt mediante conversione con torcia al plasma di 100.000 tonnellate/anno di biomassa algale. La produzione dell'alga avverrebbe su un'area di 10-12 ettari in una zona costiera della laguna veneta, utilizzando i fotobioreattori verticali della Biofuel System SL. Si prevedevano, nel marzo 2009, tempi di realizzazione dell'impianto di 18-24 mesi (fig. 15). Visto che la radiazione solare media disponibile nella zona è di circa 1300 kWh/m<sup>2</sup> per anno, equivalenti a 47 milioni di MJ/ettaro, considerando una efficienza teorica di conversione delle energia in biomassa del 10% e un potere calorico della biomassa algale pari a 20 MJ/kg, la produzione massima ottenibile nella zona è di 235 t/ha per anno. Il

progetto con 10.000 ton/ettaro anno si pone quindi come obiettivo una produzione pari a 40 volte il massimo teorico e una efficienza di conversione dell'energia solare in energia chimica di oltre il 300% (vedi "La Bolla delle Alghe" su Nova del 9 aprile 2009).

#### 4. VANTAGGI E POTENZIALE DELLE COLTURE ALGALI

Se vogliamo seriamente promuovere la biotecnologia algale è necessario partire dalla ovvia considerazione che anche le microalghe, in quanto sistemi biologici di trasformazione di energia, soffrono di limiti invalicabili e, soprattutto, per convertire la luce (energia radiante) in biomassa (energia chimica) devono fare i conti con le reazioni chimiche, poco efficienti in realtà, proprie della fotosintesi ossigenica. Merita citare a questo proposito le enormi aspettative suscitate nel maggio 2010 dall'annuncio che la Synthetic Genomics aveva ottenuto la prima cellula microbica di sintesi. Le scoperte nel campo dei "genomi artificiali" del gruppo guidato da Craig Venter e dal premio Nobel Hamilton Smith, se applicate alle microalghe, potrebbero avere un impatto enorme sulla tecnologia, perché si potranno combinare nello stesso organismo proprietà utili (come ad esempio elevata produttività, robustezza, alto tenore di olio, filtrabilità, ecc.) che oggi troviamo disperse in specie differenti. Tuttavia, i tempi per tali applicazioni saranno inevitabilmente lunghi e abbiamo elementi per ritenere che anche per la nuova "*super microalga sintetica*" varranno sempre i limiti tecnici e metabolici che oggi penalizzano la coltura massiva all'aperto.

Nonostante le poco incoraggiati premesse non possiamo negare che questi microrganismi abbiano comunque una forte attrattiva e un enorme potenziale. In particolare risulta molto promettente la coltura di specie marine, i principali vantaggi delle quali sono:

- non necessitano di terreni fertili;
- non richiedono acqua dolce;
- la loro coltura può essere abbinata al trattamento delle acque reflue;
- possono usare CO<sub>2</sub> da fumi di combustione o fermentazione come fonte di carbonio;
- la loro coltura non richiede pesticidi o erbicidi;
- la loro coltura può usare i fertilizzanti con un'efficienza vicino al 100%;
- non producono sostanze tossiche (con ceppi adeguatamente selezionati);
- la coltura può (e deve) essere abbinata alla produzione di alimenti;
- nei nostri climi possono produrre 10-20 volte più olio delle colture di oleaginose tradizionali.

MICROALGHE	PRODUTTIVITÀ IN BIOMASSA (g l <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup> )	CONTENUTO DI LIPIDI (% BIOMASS)	PRODUTTIVITÀ IN LIPIDI (mg l <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup> )
<i>Porphyridium cruentum</i>	0.37	9.5	34.8
<i>Tetraselmis suecica</i> F&M-M33 (OR)	0.32	8.5	27.0
<i>Tetraselmis</i> sp. F&M-M34	0.30	14.7	43.4
<i>Tetraselmis suecica</i> F&M-M35	0.28	12.9	36.4
<i>Chlorococcum</i> sp. UMACC 112	0.28	19.3	53.7
<i>Scenedesmus</i> sp. DM	0.26	21.1	53.9
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> F&M-M40	0.24	18.7	44.8
<i>Chlorella sorokiniana</i> IAM-212	0.23	19.3	44.7
<i>Chlorella</i> sp. F&M-M48	0.23	18.7	42.1
<i>Scenedesmus</i> sp. F&M-M19	0.21	19.6	40.8
<i>Nannochloropsis</i> sp. F&M-M26	0.21	29.6	61.0
<i>Chlorella vulgaris</i> F&M-M49	0.20	18.4	36.9
<i>Nannochloropsis</i> sp. F&M-M27	0.20	24.4	48.2
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	0.19	18.4	35.1
<i>Monodus subterraneus</i> UTEX 151	0.19	16.1	30.4
<i>Nannochloropsis</i> sp. F&M-M24	0.18	30.9	54.8
<i>Nannochloropsis</i> sp. F&M-M28	0.17	35.7	60.9
<i>Nannochloropsis</i> CS 246	0.17	29.2	49.7
<i>Ellipsoidion</i> sp. F&M-M31	0.17	27.4	47.3
<i>Isochrysis</i> sp. (T-ISO) CS 177	0.17	22.4	37.7
<i>Nannochloropsis</i> sp. F&M-M29	0.17	21.6	37.6
<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/11b	0.17	19.2	32.6
<i>Pavlova salina</i> CS 49	0.16	30.9	49.4
<i>Pavlova lutheri</i> CS 182	0.14	35.5	50.2
<i>Isochrysis</i> sp. F&M-M37	0.14	27.4	37.8
<i>Skeletonema</i> sp. CS 252	0.09	31.8	27.3
<i>Thalassiosira pseudonana</i> CS 173	0.08	20.6	17.4
<i>Skeletonema costatum</i> CS 181	0.08	21.1	17.4
<i>Chaetoceros muelleri</i> F&M-M43	0.07	33.6	21.8
<i>Chaetoceros calcitrans</i> CS 178	0.04	39.8	17.6

Tab. 5 Produttività in lipidi e biomassa di 30 ceppi di microalghe (Da Rodolfi et al., 2009)

Un vantaggio che fa emergere nettamente le colture algali rispetto alle colture agrarie è la produttività in olio. Il nostro gruppo ha condotto uno screening su 30 ceppi di microalghe per valutarne la produttività e il tenore in olio. Iniziando dai dati di laboratorio (tab. 5), appare subito evidente come, purtroppo, i ceppi più produttivi in termini di biomassa (ad esempio *Porphyridium cruentum* e *Tetraselmis suecica*) siano quelli a minor contenuto in lipidi, mentre altri con un ottimo contenuto lipidico di base (ad esempio *Chaetoceros calcitrans*) non siano buoni in termini di crescita e produttività. Parte della ragione di ciò sta nel costo energetico elevato della sintesi lipidica

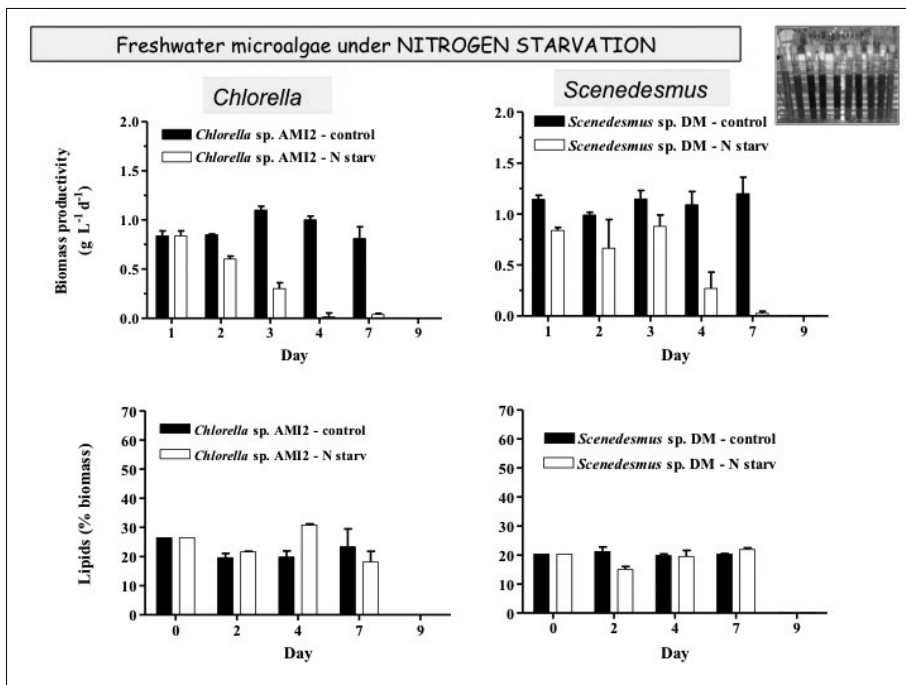


Fig. 16 Crescita e accumulo di lipidi in due microalghe di acqua dolce («*Chlorella*» sp. F&M-M48 e «*Scenedesmus*» sp. DM) in carenza di azoto

rispetto alle altre frazioni costituenti la biomassa. Tuttavia vari ceppi interessanti sono stati individuati (evidenziati in tab. 7) e alcuni di essi sono stati testati in carenza di azoto (*nitrogen starvation*) che, come noto, in alcune microalghe stimola la biosintesi di lipidi (di olio in particolare) (Rodolfi et al., 2009).

In figura 16 sono riportati la produttività in biomassa e l'accumulo di lipidi in seguito a *nitrogen starvation* in due microalghe d'acqua dolce: *Chlorella* sp. F&M-M48 (qui indicata come *Chlorella* AMI 2) e *Scenedesmus* sp. DM. Gli istogrammi neri rappresentano la produttività o il contenuto in lipidi in condizioni nutritive normali (coltura di controllo), mentre quelli bianchi si riferiscono alle colture tenute in azoto-carenza. Come si può vedere in entrambe le microalghe, in assenza di azoto si ha un crollo della produttività che si azzerà in poco più di quattro giorni, mentre il tenore lipidico si modifica di poco.

Diverso è il comportamento della microalga marina del genere *Tetraselmis* (fig. 17). Anche in questo caso, la produttività crolla in seguito a *nitrogen starvation*, ma di fronte a un aumento del tenore in lipidi. Purtroppo il grosso



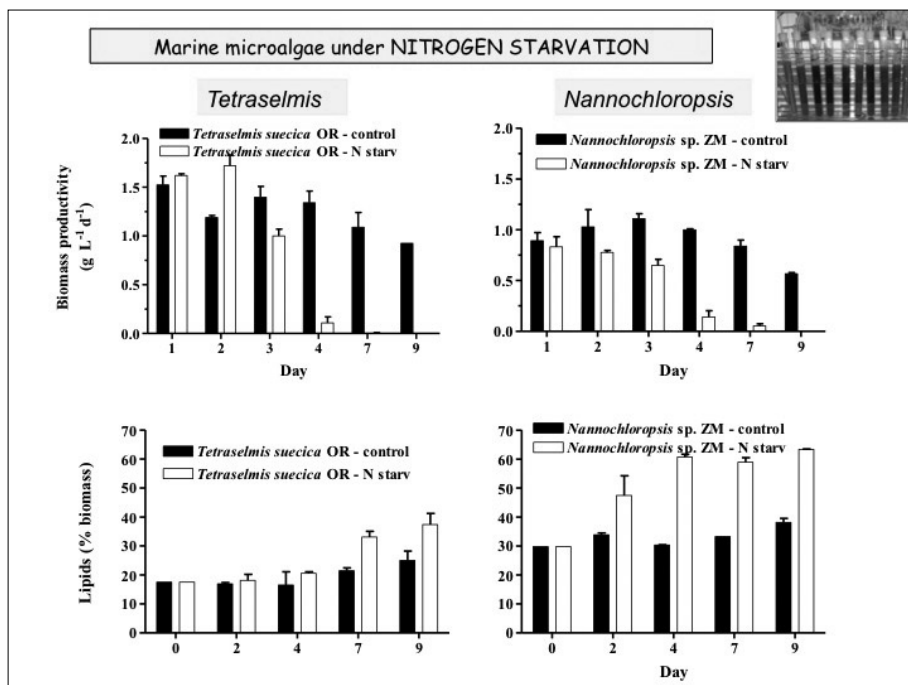


Fig. 17 Crescita e accumulo di lipidi in due microalghe marine («*Tetraselmis suecica*» F&M-M33 e «*Nannochloropsis*» sp. F&M-M24) in assenza di azoto

dell'aumento in lipidi si ha solo dopo una settimana di azoto-carenza e cioè quando la coltura non è più in attiva crescita e di conseguenza non si ha un forte incremento nella sintesi dei lipidi rispetto al controllo.

Molto più interessante il caso di *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 (qui indicata come ceppo ZM). Anche qui la produttività diminuisce in assenza di azoto, ma il contenuto in lipidi raddoppia (dal 30 al 60%) in soli 3 giorni e quindi mentre la coltura sta ancora crescendo (più corretto è dire “aumentando di peso”) (fig. 17). Combinando i due fatti (accumulo di lipidi e crescita) ne risulta un produttività in lipidi fortemente aumentata.

I risultati illustrati nelle figure 16 e 17 sono stati ottenuti in esperimenti di laboratorio e perciò non adeguati a valutare il potenziale della coltura di alghe all'aperto. Questa valutazione è stata fatta successivamente con la sola *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 in reattori Green Wall Panel (GWP) e in carenza di azoto o di fosforo. Le prove hanno confermato come in azoto-carenza anche all'aperto si riesce ad aumentare significativamente il tenore lipidico (in soli tre giorni dal 30 a oltre il 60%) e raddoppiare la produttività netta di lipidi (fig. 18). Analisi successive (Bondioli et al., 2010) hanno evidenziato come i

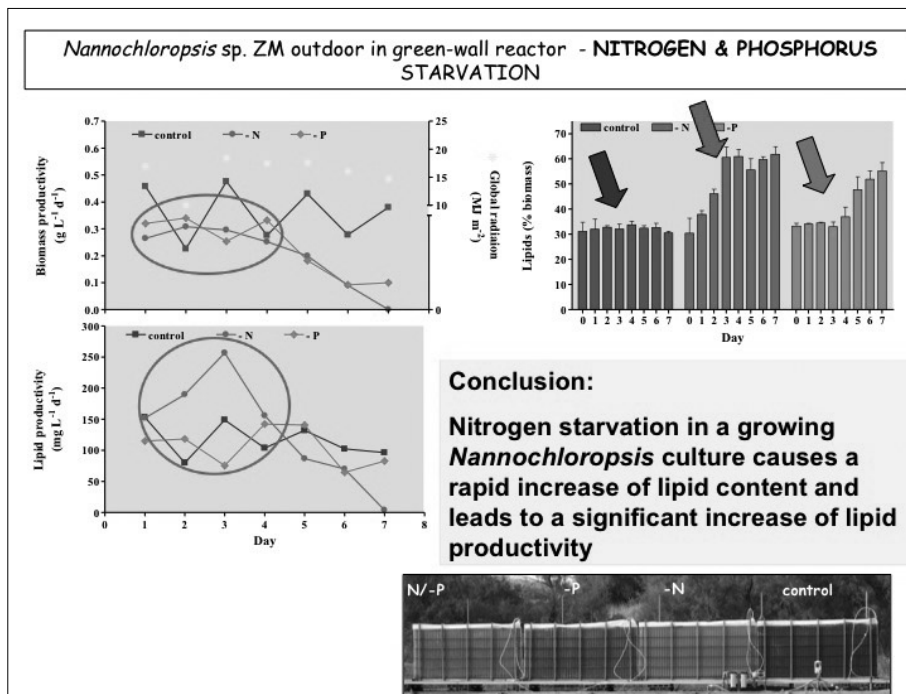


Fig. 18 *Produttività ed accumulo di lipidi in «Nannochloropsis» sp. F&M-M24 coltivata all'aperto in carenza di azoto o fosforo*

lipidi accumulati dalla coltura mantenuta in assenza di azoto siano costituiti principalmente da trigliceridi ricchi in acidi grassi saturi e quindi utili per ottenere biodiesel.

Una successiva sperimentazione condotta dal nostro gruppo utilizzando fotobioreattori GWP in un impianto appositamente allestito per simulare le condizioni “full scale” (fig. 19), ha dimostrato che la microalga marina *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 è potenzialmente capace di produrre 20 tonnellate di lipidi per ettaro per anno nelle regioni del Mediterraneo e più di 30 tonnellate di lipidi per ettaro per anno in quelle tropicali a maggiore insolazione ( $> 20 \text{ MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ).

Recenti analisi economiche, tra cui una del nostro gruppo (Bassi e Tredici, 2010), prospettano per alghe prodotte in impianti ibridi (FBR + vasche raceway) da 400 ettari un costo di produzione della biomassa algale di circa 1,5 €/Kg qualora si acquistino sia i nutrienti che la  $\text{CO}_2$ , e di meno di 0,5 €/Kg se la  $\text{CO}_2$  e i nutrienti sono ottenuti da scarti o rifiuti. Ci sono quindi, al di là delle molte false promesse, elementi oggettivi che giustificano l'interesse

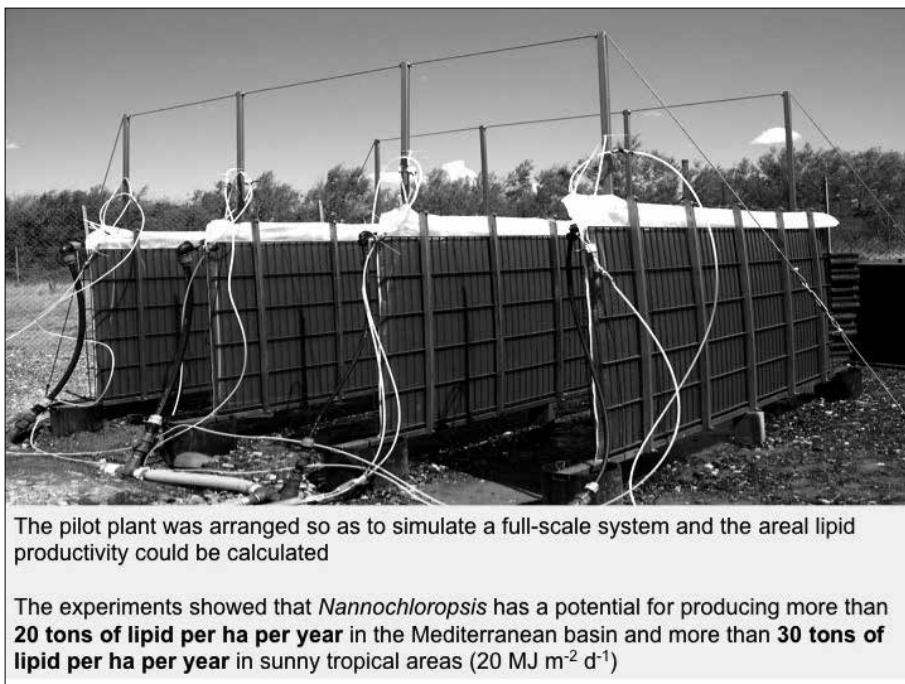


Fig. 19 Fotobioreattori GWP utilizzati nelle prove di produzione di lipidi all'aperto con «*Nannochloropsis*» sp. F&M-M24 in «nitrogen starvation»

verso questa biotecnologia e gli ingenti investimenti di cui recentemente il settore ha beneficiato. È utile ricordare tra i grandi finanziatori della ricerca su biocombustibili da colture algali Boeing, Continental Airlines, Bill Gates, Chevron, Shell, Exxon Mobil, BP, Enel, Eni, il Pentagono, la NASA, la Comunità Europea.

## 5. LA SECONDA RIVOLUZIONE VERDE

Per concludere questa rassegna non possiamo non soffermarci sull'urgente necessità di intervenire di fronte alle emergenze globali che affliggono l'umanità all'inizio del terzo millennio. Necessità urgente di dare soluzioni immediate e sostenibili all'incerto futuro ambientale e alimentare che ci attende. La popolazione mondiale nel 2050 si sarà accresciuta di altri due miliardi di abitanti che porteranno un'ulteriore pressione sulle già depauperate risorse del pianeta. Secondo la FAO, poco meno di un miliardo di persone già oggi non ha cibo a sufficienza e la più importante sfida dei prossimi decenni non



Fig. 20 *Sustaining food production is the global scientific challenge of our era, more urgent even than global warming (FAO, 2009)*

sarà adattarsi al cambiamento climatico, limitare la perdita di biodiversità o sostituire i biocombustibili fossili, bensì produrre cibo in quantità sufficiente ad assicurare la sopravvivenza delle popolazioni nelle regioni meno fortunate del pianeta ed evitare migrazioni catastrofiche di centinaia di milioni di persone in cerca del minimo per sopravvivere (fig. 20).

Molti sono convinti (o sperano) che ci verranno in soccorso le nuove tecnologie e, ancora una volta, potremo contare sui miracoli dell'agricoltura intensiva per evitare la catastrofe. Ma sono forti anche i timori delle conseguenze di un'ulteriore espansione dell'agricoltura. Metà delle acque italiane sono contaminate da pesticidi. L'allarme sull'aumento di veleni in fiumi, laghi, torrenti e nel sottosuolo viene dall'Ispra che avverte che "il rischio da esposizione potrebbe essere stato sottostimato" e che l'evoluzione della contaminazione a partire dal 2003 mostra un aumento della frequenza di pesticidi nell'ambiente. Ogni anno si perdono dai 5 ai 10 milioni di ettari di suolo agricolo a causa dell'erosione. Assieme alla lisciviazione di fertilizzanti e agli scarichi incontrollati di origine civile, agricola e industriale, l'erosione del suolo agricolo ha portato a un aumento impressionante in numero e dimensioni delle "ocean



Fig. 21 «Overfishing» & «bycatch» sono causa del depauperamento delle risorse ittiche marine

*dead zones*”, aree oceaniche vaste in qualche caso centinaia di chilometri in cui una rapida deossigenazione dell’acqua porta alla scomparsa di ogni forma di vita marina. L’ossigeno viene a mancare per effetto dei nutrienti che, lisciviati dai campi e dalle città verso i fiumi e i mari, alimentano la crescita incontrollata di macroalghe e microalghe. Alla loro morte, le biomasse algali vengono decomposte da microrganismi eterotrofi aerobi che consumano l’ossigeno disciolto e “soffocano” il mare. Il mare è già all’estremo e si prevede il collasso totale della pesca entro il 2050 se oltre alla eutrofizzazione continueranno gli attuali livelli di cattura e lo spreco di risorse ittiche a causa di prelievi “non intenzionali” (*bycatch*) di specie che dopo la cattura vengono rigettate in mare come rifiuti (fig. 21).

Come raddoppiare la produzione di alimenti in qualche decennio se manca l’acqua per irrigare i campi e la desertificazione avanza (fig. 22) proprio in quei paesi che maggiormente ne hanno bisogno? Come produrre più alimenti quando le fonti di energia fossile sono in via di esaurimento e sempre più costose e rischiose da sfruttare, come dimostra il disastro causato dall’esplosione della piattaforma petrolifera “Deepwater Horizon” nel Golfo del Messico (fig. 23)? In un contesto di forte riduzione delle risorse primarie (suolo, acqua,

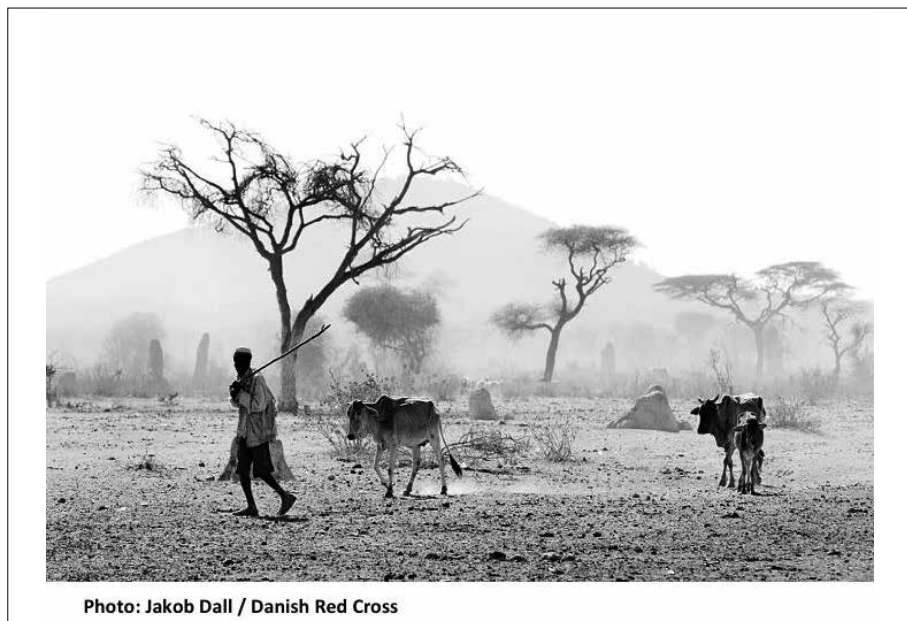


Fig. 22 La siccità colpisce la città di Dida Guchi (Etiopia) nella primavera 2008. Foto: Jakob Dall (Danish Red Cross)



Fig. 23 L'esplosione della «Deep Horizon» della BP. Da “What are we doing to the planet we call Home?” (Elanne Palcich – 2010)



Fig. 24 *Conseguenze, non prevedibili nella loro evoluzione, del cambiamento climatico*

energia) e sotto la minaccia del riscaldamento globale (fig. 24), di cui, sebbene se ne conoscano le cause principali, nessuno riesce a prevedere in maniera certa l'evoluzione, il problema centrale del secolo diviene come provvedere cibo e materie prime a una umanità in espansione senza devastare oltre il punto di non ritorno la qualità degli ecosistemi terrestri e acquatici sopravvissuti alla rivoluzione industriale.

Sono sempre più numerose le previsioni catastrofiche. *Beyond the Limits*, *World on the Edge*, *The Crash Course*, sono alcuni dei titoli di recenti pubblicazioni in cui gli autori sostengono che siamo su un treno che corre deciso verso l'abisso, rimane solo da definire la velocità della corsa e quanto tempo ci rimane prima del salto finale (fig. 25). Catastrofisti eccessivi? Può darsi, ma appare ormai chiaro anche ai più ottimisti che il teorema dello *sviluppo all'infinito* non funziona più. Non possiamo più permetterci gli sprechi del passato, non possiamo continuare a gettare nella pattumiera il 20% degli alimenti che acquistiamo, non saremo in grado garantire una vita degna sulla terra a 9 miliardi di abitanti, non stiamo facendo abbastanza per assicurare anche ai nostri figli un mondo vivibile.

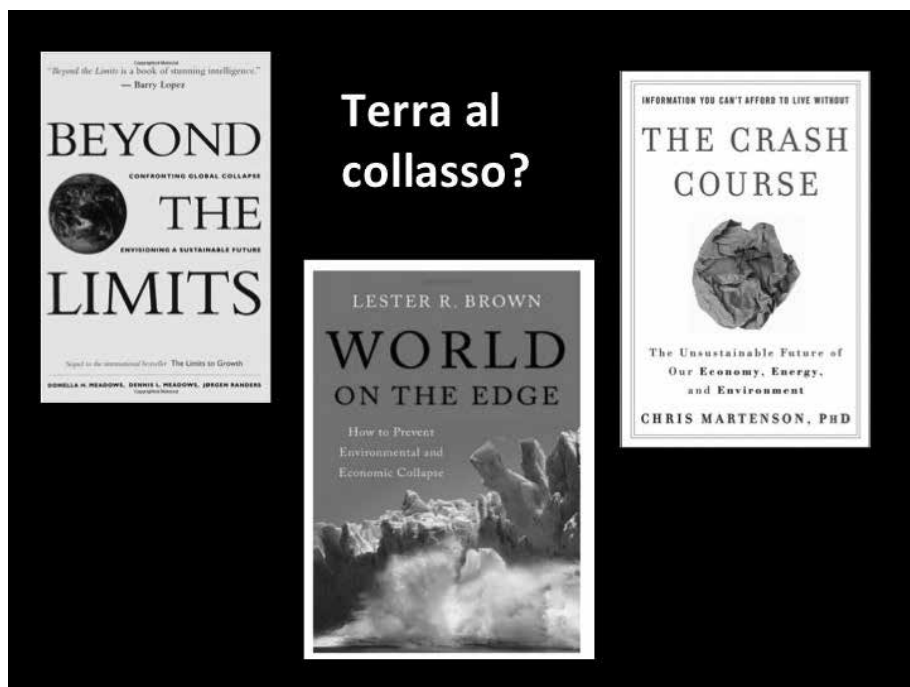


Fig. 25 Titoli di recenti pubblicazioni che prevedono il collasso dell'umanità

Solo una seconda rivoluzione verde può salvare l'umanità da un inesorabile declino. La prima rivoluzione verde, che nella metà del secolo scorso ha portato a enormi aumenti di produttività delle colture alla base dell'alimentazione umana (riso, grano, mais), è stata sostenuta da varietà selezionate per l'alta produttività, uso massiccio di fertilizzanti e pesticidi, meccanizzazione spinta e irrigazione. In sostanza la prima rivoluzione si è resa possibile solo grazie ad alti input di energia a basso costo sui quali la seconda, a venire, non potrà contare. Non sappiamo dire se la prossima necessaria rivoluzione si avvarrà di OGM o di nuove specie ibride o di tecniche agricole ancora in fase di studio. Molto probabilmente sarà sostenuta dalla integrazione di diverse tecnologie. Tra queste potrebbe trovare posto la coltura di microalghe marine.

Sulla base di dati scientifici più volte verificati, possiamo ragionevolmente ritenere che con le tecnologie e i ceppi in nostro possesso, e in attesa di un' "alga sintetica ad alta resa", sia oggi tecnicamente fattibile una coltura su larga scala (da qualche centinaio a migliaia di ettari) di una microalga marina selezionata, in grado di conseguire un'efficienza di conversione dell'energia solare intorno al 2% e di produrre quindi, in zone adeguate (vedi figura 13), 70





Fig. 26 *Reattore GWP della Fotosintetica & Microbiologica S.r.l.*

tonnellate di biomassa per ettaro e per anno, di cui 15-20 tonnellate di olio e 30-45 tonnellate di proteine. Già negli anni ottanta il nostro gruppo aveva sperimentato con successo nell'Italia meridionale (Lamezia Terme, Calabria) la coltura di microalghe marine con rese di oltre 50 tonnellate per ettaro e per anno di biomassa in coltura all'aperto. Oggi stiamo lavorando su diversi fronti, tra cui lo sviluppo di nuovi sistemi di coltura integrati con celle solari che forniscono tutta l'energia necessaria per la coltivazione e la raccolta (GWP di terza generazione) portando l'EROI del processo a 1,5 (fig. 26), la selezione di ceppi resistenti alle alte temperature, e le interazioni alghe-batteri per sfruttare a pieno le potenzialità dei consorzi microbici e assicurare non solo alte produttività ed economicità, ma anche la necessaria stabilità della coltura nel lungo periodo. L'anidride carbonica necessaria in grandi quantità dovrà essere di scarto (quindi provenire da gas di combustione o da fermentazioni), così come potrebbero esserlo, in certe condizioni, gli altri principali nutrienti (azoto e fosforo) che si dovranno comunque utilizzare con efficienze vicine al 100% per evitare gli sprechi e l'inquinamento del suolo, delle acque e della atmosfera che le colture agrarie tradizionali non riescono a ridurre se non marginalmente. Nuovi e più durevoli materiali plastici per la costruzione dei



Fig. 27 *L'umanità è sull'orlo dell'abisso. Le nuove tecnologie agrarie, tra cui la coltura di microalghe marine ci aiuteranno a conservare la terra che conosciamo?*

fotobioreattori e più efficienti tecniche di rimescolamento e di separazione della biomassa dal mezzo di coltura potranno infine assicurare un bilancio energetico, decisamente maggiore di uno (EROI di 3 o maggiore) e di conseguenza ridurre l'impatto ambientale.

Il successo della tecnologia delle alghe dipenderà infine dal fatto che la biomassa prodotta venga sfruttata secondo i concetti della bioraffineria, cioè di un sistema integrato che prende in considerazione non solo l'energia ma, tutti i componenti della biomassa algale (proteine, vitamine, acidi grassi, pigmenti, polimeri di parete e di riserva, ecc.) per ottenere oltre al biocombustibile anche alimenti, mangimi, bioplastiche, fibre, materie prime e prodotti derivati.

La vera innovazione, e quindi la sostanza della rivoluzione basata sulla tecnologia algale, starà nel fatto che le attività produttive (e possibilmente anche quelle di trasformazione) verranno condotte su terreni desertici o in aree marginali utilizzando come risorse primarie sole e acqua di mare o salmastra, senza competere con le colture agricole tradizionali per la produzione di alimenti.

## RIASSUNTO

Oggi assistiamo a un crescente interesse per le colture algali, principalmente volto al loro sfruttamento a scopi energetici. Purtroppo, al di là delle aspettative, la bassa efficienza fotosintetica e un bilancio energetico (EROI) non favorevole si traducono in costi di produzione della biomassa algale di oltre 3000 €/ton, incompatibili con l'uso energetico di questo *feedstock*. Tuttavia, il potenziale delle microalghe quali fonte di cibo e combustibili rimane molto elevato e così l'interesse del mondo della ricerca e dell'industria. La coltura delle microalghe non necessita di terreni fertili, non richiede acqua dolce, può usare CO<sub>2</sub> da fumi di combustione o fermentazioni come fonte di carbonio, non richiede pesticidi ed utilizza i fertilizzanti con un'efficienza vicina al 100% ed è, infine, in grado di conseguire produttività in termini di olio e proteine di oltre 15 e 30 tonnellate per ettaro all'anno. Tutto ciò si traduce in un'importante riduzione degli impatti sulle risorse primarie (suolo, acqua), sempre più scarse e degradate, che invece caratterizzano le colture agrarie tradizionali. Al fine di migliorare i bilanci energetici ed economici della produzione di biomassa algale, il nostro gruppo a Firenze sta sperimentando nuovi sistemi di coltura (fotobioreattori) integrati con celle fotovoltaiche in grado di portare l'EROI del processo oltre 1,5. Assieme all'isolamento e messa in coltura di nuovi ceppi termotolleranti e in grado di ottenere elevate produttività su acqua salmastra o di mare, questa tecnologia ha il potenziale per produrre in modo sostenibile biomassa algale per alimenti e, in un futuro più lontano, bio-energia.

## ABSTRACT

The interest in microalgae as a source of renewable fuels is still growing. However, the high capital and operating costs of microalgae farming and the non-sufficiently positive energy balance still prevent the development of algal fuels and algal food to commercial scale. Microalgae have several advantages and their potential as source of food, feed and fuels is very high. Microalgae can be cultivated in deserts or marginal lands (they do not need fertile soils) using brackish water or seawater. The efficiency in the use of fertilizers of algae cultures can reach 100% (with minimal pollution of water, soil and atmosphere). Their cultivation does not need pesticides. A suitable technology is however necessary to attain a positive EROI and produce cost-effective algal biomass. In the last years, the researches carried out by our group have been aimed to reduce the inputs for algae cultivation. A new reactor design that integrates photovoltaic elements has been developed and tested outdoors. The experiments have shown that, by intercepting with solar cells about 30% of the impinging photons, electricity can be generated in a quantity sufficient to cover all the operational energy needs of the system (including harvesting) without reducing algal productivity and bring the EROI over 1.5. Together with new strains able to grow at high temperatures at varying salinity, this technology has the potential to contribute to the sustainable production of algal biomass for food and fuels.

## BIBLIOGRAFIA PER APPROFONDIMENTI

- BIONDI N., RODOLFI L., TREDICI M.R. (2008): *Bioattività dei microrganismi fotosintetici*, in *Microbiologia Agroambientale*, Bruno Biavati & Claudia Sorlini, eds. Casa Editrice Ambrosiana, Milano, Italy, pp. 635-656.
- BROWN L. R. (2012): *Full planet, empty plates: The new geopolitics of food scarcity*, Earth Policy Institute.
- CRIB J. (2008): *The coming famine: The global food crisis and what we can do to avoid it*, University of California Press.
- RODOLFI L., CHINI ZITTELLI G., BASSI N., PADOVANI G., BIONDI N., BONINI G., TREDICI M.R. (2009): *Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor*, «Biotechnol. Bioeng.», 102, pp. 100-112.
- TREDICI M.R. (2008): *Colture massive di microalghe: Calamità o risorsa?*, in «Atti dell'Accademia dei Georgofili», Serie VIII, Vol. 3, Firenze, Italy, pp. 635-650.
- TREDICI M.R. (2010): *Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the next green revolution*, «Biofuels», 1 (1), pp. 143-162.
- TREDICI M.R., BIONDI N., CHINI ZITTELLI G., PONIS E., RODOLFI L. (2009): *Advances in microalgal culture for aquaculture and other uses*, in *New Technologies in Aquaculture: Improving production efficiency, quality and environmental management*, Gavin Burnell & Geoff Allan, eds. CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, pp. 610- 676.
- TREDICI M.R., RODOLFI L., CHINI ZITTELLI G. (2009): *Photobioreactors*, in *Wiley Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, Michael C. Flickinger & Stephanie Anderson eds. John Wiley & Sons, Inc. (NJ), USA.

ROBERTO BASSI\*, SILVIA BERTEOTTI\*, MATTEO BALLOTTARI\*,  
ALESSANDRO ALBORESI\*, NICO BETTERLE\*, LUCA DALL'OSTO\*

## Domesticazione delle alghe unicellulari per la produzione di biocombustibili in fotobioreattore

### I. IL PROBLEMA ENERGETICO E L'ENERGIA SOLARE

La società si trova attualmente di fronte a un grave problema energetico: la popolazione mondiale è cresciuta da 2,5 miliardi nel 1950 a 7 miliardi nel 2011, e si prevede che raggiungerà i 9 miliardi nel 2050, accompagnata da un aumento della domanda energetica: si stima che gli attuali 14 TW consumati annualmente per le attività antropiche, raddoppieranno nel 2050. Al momento, la domanda energetica globale è soddisfatta per l'80% da combustibili fossili come petrolio, carbone e gas naturale. Mentre le riserve di combustibili fossili di alta qualità si stanno esaurendo, il livello di composti inquinanti volatili come benzene, formaldeide e acetaldeide aumenta assieme alle concentrazioni atmosferiche dei gas a effetto serra: anidride carbonica ( $\text{CO}_2$ ), monossido di carbonio (CO), ossidi d'azoto ( $\text{NO}_x$ ) e di-ossidi di zolfo ( $\text{SO}_2$ ).

A causa sia della carenza in energia, che rischia di limitare lo sviluppo mondiale, sia dei problemi ambientali associati alla combustione del petrolio, è necessario trovare una o più fonti energetiche alternative ai combustibili fossili. Fonti disponibili con preferenza tra quelle " $\text{CO}_2$ -free", cioè la cui combustione non porti a un aumento di  $\text{CO}_2$  atmosferica.

Fra le fonti energetiche disponibili sulla superficie terrestre quella più abbondante è la luce solare, con i suoi 178000 TW per anno. La tecnologia attualmente disponibile per raccoglierla: pannelli solari termici o i fotovoltaici al silicio, è efficiente ma non è ancora abbastanza economica per competere con i combustibili fossili. Inoltre, produce calore o elettricità, energie subito

\* Dipartimento di Biotecnologie, Università di Verona

disponibili ma non facilmente accumulabili, né utilizzabili come combustibili per veicoli terrestri o aerei.

Altre fonti energetiche rinnovabili, come quella geotermica o l'eolica, riescono a soddisfare solo una piccola percentuale della richiesta energetica globale, dato che non sono presenti in modo costante nel tempo e/o in un'area precisa.

I paesi aderenti al Protocollo di Kyoto hanno fissato l'obiettivo di diminuire le proprie emissioni di CO<sub>2</sub> entro il 2020, adottando politiche di risparmio energetico e utilizzando alternative ai combustibili fossili.

Il 60% dei combustibili fossili oggi scoperti si sono formati 120-80 milioni di anni fa dalla decomposizione anaerobica di depositi di organismi fotosintetici, come alghe e piante superiori. La fotosintesi è dunque all'origine dei combustibili fossili, e può essere sfruttata tuttora per la produzione di biocombustibili "CO<sub>2</sub>-free". I biocombustibili sono una fonte energetica promettente. Oltre al legname, tuttora il biocombustibile più usato, il bioetanolo e il biodiesel, prodotti da colture agrarie, appartengono ai cosiddetti combustibili di prima generazione, e hanno già trovato una collocazione nel mercato dell'energia. Il Brasile è il primo produttore di bioetanolo (46.2% della produzione mondiale, con 28.2 milioni di tonnellate nel 2008), seguito dagli Stati Uniti (19.97 milioni di tonnellate nel 2008). Il bioetanolo è ricavato da piante con elevato contenuto di zuccheri solubili, come la barbabietola o la canna da zucchero, o da piante ricche in amido, come il mais. Gli zuccheri disponibili sono trasformati in etanolo durante il processo di fermentazione alcolica ad opera di lieviti. Il secondo biocombustibile, per livello di produzione su scala mondiale, è il bio-diesel di prima generazione, ottenuto da oli vegetali, principalmente di soia, palma e colza. L'Europa è il paese leader con 4,9 milioni di tonnellate prodotte nel 2008, pari al 58% della produzione mondiale.

Tuttavia, i biocombustibili di prima generazione non sono la chiave per risolvere il problema energetico: la questione "*fuel vs food*" riassume i rischi legati allo sfruttamento dei terreni agricoli per la produzione di biocombustibili, che avverrebbe a scapito della produzione alimentare. Infatti, la produzione di biocombustibili di prima generazione sfrutta terreni fertili altrimenti destinati all'agricoltura, diminuendo così la produzione globale di cibo. Per ottenere 49 miliardi di litri di bioetanolo è stato consumato circa il 40% del mais prodotto negli Stati Uniti, coltivato su 13 milioni di ettari di terreno, facendo di conseguenza lievitare i prezzi della granella di mais sui mercati internazionali. Il rialzo del costo della materia prima (grano e cereali) ha causato rincari dei prodotti derivati: +30% per la pasta, +15% per i dolci, +10% per i cereali, +5% per i prodotti lattiero-caseari, +3% per i prodotti ittici, +2% per i prodotti ortofrutticoli, +1% per i prodotti di origine animale.

pane, e un aumento del prezzo dei foraggi e della carne (Naik et al., 2010). Un'analoga considerazione può essere fatta per la produzione di biodiesel da soia e colza. In sostanza: trasformare il cibo in biocombustibili non è una strategia sostenibile.

La progressiva sostituzione dei derivati del petrolio o del carbone con forme alternative di energia garantirebbe la sostenibilità ambientale dei processi produttivi globali. In quest'ottica, il biodiesel di terza generazione da microalghe, rappresenta una promettente possibilità. Si tratta di un combustibile rinnovabile, biodegradabile, dal costo competitivo con i combustibili tradizionali, a zero emissioni di gas a effetto serra. Soprattutto, per la produzione di tale biomassa non vengono sfruttati terreni destinati all'alimentazione umana.

Affinché l'utilizzo di biodiesel di terza generazione possa estendersi su larga scala, è però necessario superare alcuni limiti produttivi. Lo scopo della ricerca biotecnologica in questo campo è sviluppare una tecnologia per la produzione di grandi quantità di biomassa algale minimizzando i costi di costruzione e gestione degli impianti per la coltivazione delle alghe, "i fotobioreattori". Le alghe unicellulari che si trovano nell'ambiente naturale si sono appunto evolute per vivere nei corpi acquosi nelle condizioni "naturali" cioè a luce bassa e a bassa densità cellulare. Le condizioni nei fotobioreattori sono opposte e rendono la crescita delle alghe molto inefficiente.

È necessario perciò domesticare le specie algali per (i) una migliore efficienza nell'uso della luce, e per (ii) incrementare la quantità in lipidi accumulati, al fine di abbattere i costi legati alla costruzione e gestione degli impianti fotobioreattori, e al trattamento della biomassa.

## 2. LE MICROALGHE COME RISORSA DI ENERGETICA ALTERNATIVA AL PETROLIO

Le alghe costituiscono un gruppo eterogeneo formato da più di 40.000 specie, aventi fenotipi molto variegati, e distribuite in tutti gli ecosistemi (fig. 1).

I biocombustibili ottenibili da alghe sono di diverse tipologie: bio-diesel, dall'estrazione delle riserve lipidiche cellulari; bio-etanolo, dalla fermentazione di idrolizzati algali; bio-gas dalla digestione anaerobica della biomassa; isoprene, dall'attività della isoprene sintasi di piante il cui gene può essere espresso nelle alghe (Schenk et al., 2007; Adams et al., 2008; Kim et al., 2011; Bruhn et al., 2011; Lindberg et al., 2010). In particolare, per biodiesel s'intende una miscela di esteri metilici di acidi grassi (FAME: *Fatty Acid*

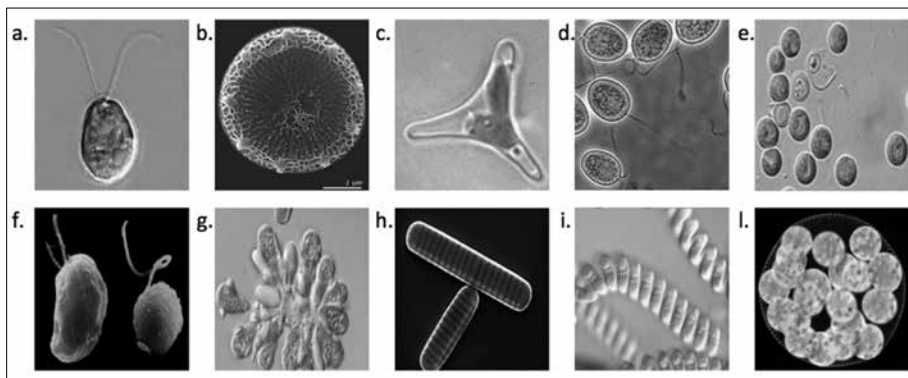


Fig. 1 Biodiversità nelle microalghe. a. *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophytes); b. *Thalassiosira pseudonana* (Diatoms); c. *Phaedactylum tricornutum* (Diatoms); d. *Dunaliella salina* (Chlorophyceae); e. *Chlorella vulgaris* (Chlorophytes); f. *Guillardia theta* e *Bigelowiella natans* (Cryptomonads); g. *Botryococcus brauni* (Chlorophyceae); h. *Fragilariopsis cylindrus* (Diatoms); i. *Arthrospira maxima* (Cyanophyceae); l. *Volvox carteri* (Chlorophytes).

<https://wiki.umn.edu/IBS8102/030410-Molnar>; <http://www.rbg Syd.nsw>; <http://genome.jgi-psf.org>; [http://www.cambia.org.au/daisy/eos/4274/version/default/part/AttachmentData/data/2i6cv9w2\(2\)](http://www.cambia.org.au/daisy/eos/4274/version/default/part/AttachmentData/data/2i6cv9w2(2)); Henrik Lange e Gerhard Dieckmann (Alfred-Wegener Institute for Polar and Marine Research, Germany); Charles University in Prague; Dr. Geoff McFadden (University of Melbourne, Australia)

*Methyl Ester*) ottenuta dalla reazione di trans-esterificazione di trigliceridi con metanolo, in presenza di un catalizzatore alcalino (KOH, NaOH o  $\text{CH}_3\text{O-Na}$ ). Come prodotto secondario della reazione si ottiene glicerina, che dopo raffinazione, può essere venduta all'industria farmaceutica e cosmetica, o essere riutilizzata nel bioreattore come fonte di carbonio per la crescita di nuova biomassa algale.

Le alghe, con la fotosintesi, sono in grado di convertire la luce solare in biomassa, una forma d'immagazzinamento di energia chimica di lunga durata. A seconda della specie algale, dal 30% all'70% della biomassa è costituita da oli e quindi da biodiesel per trans-esterificazione (Chisti, 2007; Hu et al., 2008). A parità di superficie di produzione, le microalghe permetterebbero di produrre 20-300 volte più biodiesel rispetto alle colture vegetali tradizionali. Il concetto è ancora più chiaro se si confrontano questi dati: il biodiesel prodotto dalla soia ha una resa di circa 450 litri/ettaro/anno, da girasole la resa sale a 952 litri/ettaro/anno, quantità nettamente inferiori rispetto a quelle ottenibili da alghe: 45,000 ai 137,000 litri/ettaro/anno. Basterebbe quindi un decimo dell'area oggi occupata dalle colture di soia, per soddisfare l'intera domanda di carburanti degli Stati Uniti. In



conclusione, le alghe unicellulari sono la fonte più promettente di biomassa a lungo termine (Chisti, 2007).

Produrre biocombustibili da alghe presenta molteplici vantaggi rispetto alle “*energy crops*” vegetali:

- I. La coltivazione algale non compete con le colture alimentari. Le alghe possono crescere in aree incolte, non fertili, marginali e anche in strutture galleggianti su specchi d'acqua.
- II. La coltivazione di alghe non comporta la dispersione nell'ambiente né di pesticidi, né di fertilizzanti. Si evita così la contaminazione del suolo e l'eutrofizzazione dei corpi idrici.
- III. Le microalghe possono vivere in acqua di mare, acque salmastre o reflui di scarto agricoli, industriali e civili. Dal punto di vista ambientale, la coltivazione estensiva di alghe è molto più sostenibile rispetto a quella delle colture alimentari convenzionali.
- IV. La durata del ciclo vitale delle alghe (ore) è molto breve se confrontata con quello delle specie agrarie (tipicamente un anno solare). Le alghe si riproducono durante tutto l'anno, permettendo un veloce *turn-over* e un'elevata resa in biomassa.
- V. Molte alghe sono mixotrofe, in grado cioè di sfruttare composti organici come fonte di carbonio e in questa maniera possono crescere anche al buio.
- VI. La maggior parte della biomassa cellulare algale è fotosinteticamente attiva. Nelle piante, invece, la fotosintesi avviene esclusivamente nelle foglie, che rappresentano solo il 10-40% dell'intera biomassa vegetale.
- VII. La fotosintesi delle alghe non è facilmente saturata dal livello di  $\text{CO}_2$ : aumenta, invece, con la concentrazione di  $\text{CO}_2$ . Le microalghe possono vivere a concentrazioni di  $\text{CO}_2$  fino al 18%, che possono acquisire sia dall'atmosfera, sia dall'acqua sotto forma di  $\text{HCO}_3^-$ . Le piante invece, che assorbono la  $\text{CO}_2$  dall'atmosfera, sono limitate nella sua captazione dal livello di apertura degli stomi i quali vengono tenuti tendenzialmente chiusi per evitare la disidratazione. È stato stimato che il livello di organizzazione della  $\text{CO}_2$  algale è circa 10 volte più alta di quella di una foresta in clima temperato (Otsuki, 2001).
- VIII. La  $\text{CO}_2$  può essere fornita anche da fumi di combustione, come quelli prodotti dalle centrali elettriche a carbone, che si caratterizzano per un elevato carico inquinante. Lo sfruttamento di questi fumi permetterebbe di accoppiare processi industriali inquinanti a bioreattori per la crescita di biomasse algali. La Seambiotic Ltd in Israele è la prima industria che ha messo appunto questo impianto, producendo additivi alimentari ad alto valore aggiunto (Omega-3 e altri acidi grassi), mangimi per pe-

scicoltura, e biodiesel ([www.seambiotic.com](http://www.seambiotic.com)). Altri impianti pilota sono in fase di sperimentazione in Giappone.

Considerando il progressivo impoverimento dei giacimenti di combustibili fossili e il conseguente aumento del prezzo dei combustibili tradizionali, l'utilizzo delle microalghe come fonte di biocarburanti sta diventando un'opzione sempre più promettente per investimenti industriali (Formighieri e Bassi, 2011).

### 3. PRODUTTIVITÀ ALGALE IN LABORATORIO E NEGLI IMPIANTI INDUSTRIALI

Le alghe convertono l'energia solare in energia chimica attraverso la fotosintesi. La produttività teorica massima in biomassa è di 77 g per m<sup>2</sup> per giorno (280 tonnellate per ettaro per anno) (Melis, 2009). Tale valore è 25 volte maggiore rispetto alla produttività teorica massima stimata per le piante vascolari. In laboratorio la resa reale in biomassa algale non è molto diversa dalla stima teorica.

Al momento i sistemi più utilizzati per la coltivazione di masse algali su larga scala sono le vasche aperte (*open ponds*), poiché facili da costruire, adatte a incrementi del volume di produzione, poco costose, aventi produttività massima in biomassa pari a 10-25 g per m<sup>2</sup> per giorno. Si tratta di stagni artificiali, nei quali alghe, acqua e sostanze nutritive circolano lungo un canale circolare, grazie a un sistema di pale che garantisce il flusso e la continua miscelazione della biomassa (fig. 2 A). Gli stagni sono solitamente poco profondi (15-20 cm) perché le alghe hanno bisogno di luce solare, la quale può però, penetrare nella coltura algale per una profondità molto limitata a causa dell'alta concentrazione dei pigmenti nelle cellule stesse. La coltura di alghe in vasche aperte procede *in continuo*: un flusso costante di biomassa algale è prelevato dal sistema e sostituito con mezzo di crescita fresco, in modo da stabilizzare il tasso di crescita e la resa del sistema.

Un diverso sistema colturale prevede il ricorso a fotobioreattori (fig. 2 B-D), sistemi chiusi, tubulari, di capienza variabile, in cui il rimescolamento della coltura è garantito da un flusso d'aria, arricchita in CO<sub>2</sub>, insufflato dal fondo del recipiente. Si tratta di sistemi sicuramente più costosi rispetto alle vasche aperte, che tuttavia presentano considerevoli vantaggi:

- permettono un migliore controllo delle condizioni di crescita (pH e temperatura); può essere regolata la concentrazione della CO<sub>2</sub> disponibile; è possibile il ricircolo della biomassa ed è minore la perdita d'acqua per evaporazione;
- è minore il rischio di contaminazione da microorganismi che interferiscono con la crescita algale: la crescita è più riproducibile;

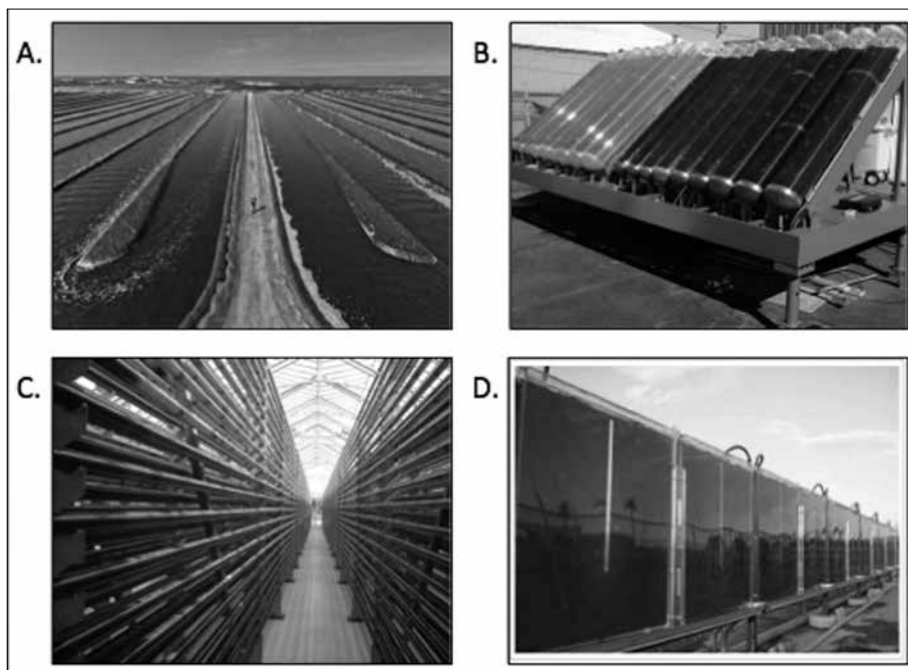


Fig. 2 Sistemi impiantistici per la coltivazione di microalghe: A. Open ponds; B. Fotobioreattori tubulari verticali; C. Fotobioreattori tubulari orizzontali. D. Fotobioreattori piatti a pannello. <http://www.algae.wur.nl/UK/>

- la biomassa raggiunge concentrazioni cellulari circa 30 volte più elevate rispetto alle vasche aperte, è pertanto minore il volume di mezzo colturale da processare per la raccolta della biomassa. Il risparmio è considerevole, poiché le fasi di centrifugazione o filtrazione, necessari per la raccolta delle alghe, sono fra i passaggi più costosi dell'intero processo produttivo;
- possono essere illuminati anche lateralmente, oltre che da sopra, assicurando un maggiore apporto di energia e di superficie illuminata rispetto al volume.

Nonostante gli indubbi vantaggi, gli elevati costi d'investimento di un fotobioreattore, possono essere giustificati solo se la produttività del sistema è molto alta. A questo può contribuire un intervento di *domesticazione* delle microalghe, al fine di individuare ceppi modificati e altamente produttivi.

Il sistema ottimale (come si vede nella figura 3, rappresentato in modo schematico) (Singh e Dhar, 2011) è quello di produrre in maniera integrata diversi biocombustibili, biomassa fertilizzante, e co-prodotti a elevato valore aggiunto ( $\beta$ -carotene, vitamina B, chetocarotenoidi come l'astaxantina). Per

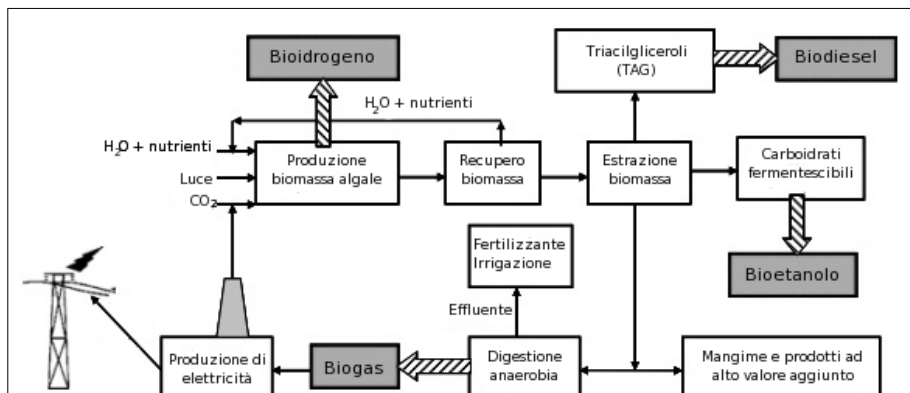


Fig. 3 Rappresentazione schematica della produzione integrata di biocombustibili, biomassa fertilizzante, e prodotti ad alto valore aggiunto (Singh e Dhar 2011)

arrivare a ciò è necessario superare alcuni punti critici, individuando metodi efficienti per la raccolta e la disidratazione della biomassa, legando la produzione al trattamento di reflui inquinanti, e selezionando ceppi efficienti, aventi elevate rese in biomassa e contenuto lipidico.

#### 4. LA DOMESTICAZIONE DELLE MICROALGHE

Da quanto esposto sopra sembrerebbe che la produzione di bioenergia da alghe unicellulari non sia un problema e che si tratti solo di sviluppare un sistema industriale adeguato. Sfortunatamente non è così: la produttività algale per volume d'impianto installato è tuttora molto bassa, inferiore a quella teoricamente attesa, tanto da rendere economicamente insostenibile la produzione industriale. Le ragioni appaiono complesse, la loro comprensione e il superamento degli attuali limiti del sistema richiedono un importante sforzo intellettuale e sperimentale. La posta in gioco è la possibilità di vivere usando energia pulita, eco-compatibile ed eco-sostenibile. È chiaro che le alghe unicellulari che si trovano nel nostro ambiente naturale sono, appunto, evolute per vivere nei corpi idrici nelle condizioni "naturali" cioè a luce bassa e a bassa densità cellulare. Le condizioni nei fotobioreattori (elevata densità cellulare ed elevate intensità luminose) sono opposte e rendono la crescita delle alghe molto inefficiente. Questo non è un problema nuovo: l'uomo già circa 10.500 anni fa cominciò a coltivare le piante trovate in natura. Per migliorare la resa, cominciò a selezionare cereali e legumi provvisti di tratti morfologici e nutrizionali migliori (Doebley et al., 2006).

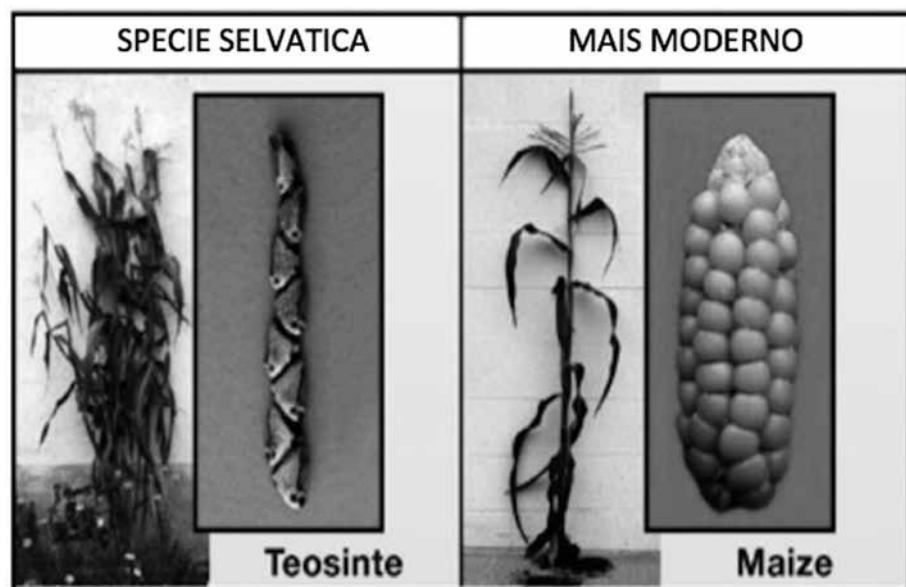


Fig. 4 Confronto fra mais moderno e la specie selvatica *Teosinte*; quest'ultima rappresenta il punto di partenza del processo di domesticazione che ha portato all'attuale granoturco (Doebley et al., 2006)

Le specie oggi coltivate sono il risultato di numerosi cicli di selezione fenotipica, incrocio, e mutagenesi. Ad esempio il mais è stato domesticato dalla specie selvatica *Teosinte*, processo che ha permesso di incrementare la densità di crescita e la resa in granella delle colture in campo (fig. 4). Per le microalghe oggi è necessario perseguire una nuova “rivoluzione verde”, una svolta analoga a quella avvenuta per le piante a interesse agronomico, che ha permesso di triplicare la produttività di mais e frumento, e quindi soddisfare il fabbisogno nutrizionale dei primi anni 30.

Lo stesso va fatto per le alghe, con la differenza che le loro dimensioni microscopiche le rendono inadatte a una selezione effettuata da agricoltori e richiedono uno studio in laboratorio da parte di genetisti e microbiologi.

La domesticazione delle alghe è quindi un processo necessario, per produrre biocombustibili su larga scala. Per individuare ceppi a elevata produttività in fotobioreattore, è necessario sia selezionare ceppi algali con caratteristiche peculiari, sia introdurre nuovi alleli con procedimenti di mutagenesi e di ingegneria genetica.

Il presupposto alla base della domesticazione delle specie algali è i) che esse siano facilmente coltivabili in laboratorio, e ii) che vi sia una buona

conoscenza della biologia dell'alga stessa, in particolare in termini di ciclo vitale, ecologia, fisiologia, biochimica e genetica. Per una rapida domesticazione è importante avere la possibilità di operare la segregazione di alleli diversi, attraverso la riproduzione sessuale, al fine di selezionare quelli più vantaggiosi. È necessario poi definire protocolli di trasformazione genetica, in modo da poter introdurre DNA esogeno nella cellula, e individuare sistemi marcatori efficienti per la selezione dei trasformanti. Su queste basi è evidente che ben poche specie algali soddisfano tutti questi requisiti: praticamente solo *Chlamydomonas reinhardtii* (Merchant et al., 2007), per cui è nota la procedura di induzione della gametogenesi, formazione di zigoti e segregazione. Per altre specie algali come *Nannochloropsis*, *Dunaliella salina*, *Hematococcus pluvialis* e *Clorella vulgaris*, sono conosciuti metodi d'inserimento di DNA esogeno e selezione dei trasformanti. È urgente che la biologia di base di molte specie algali sia approfondita con metodi genetici per rendere il processo di domesticazione più veloce ed efficiente.

La mutagenesi e la modificazione genetica delle alghe sono interventi necessari per rimuovere le limitazioni economiche e produttive che ancora gravano sulla produzione di biocarburanti. In particolare questi sono gli interventi che contribuiranno al miglioramento della produttività delle alghe unicellulari in fotobioreattore:

- aumento dell'efficienza fotosintetica nell'uso della luce, per permettere un maggiore accumulo di biomassa;
- aumento dell'efficienza nella cattura della CO<sub>2</sub>, per rimuovere la limitazione nella diffusione della CO<sub>2</sub> e per permettere un pieno utilizzo dell'energia luminosa assorbita;
- aumento del contenuto in olio della biomassa algale, e la modulazione della composizione in acidi grassi, per ottenere una migliore qualità di carburante;
- la produzione di composti ad alto valore aggiunto e proteine ricombinanti d'interesse chimico-farmaceutico, al fine di ammortizzare più velocemente i costi degli impianti.

Attualmente si possono manipolare geneticamente in modo efficace circa 25 specie, principalmente alghe verdi, rosse e diatomee (Hallmann, 2007). Fra queste vi sono membri del genere *Chlorella spp.* caratterizzati da una rapida crescita della biomassa (tempo di duplicazione di circa 5 ore); *Dunaliella spp.* la quale produce β-carotene, additivo utilizzato nella mangimistica e nell'industria alimentare; *Nannochloropsis spp.* caratterizzata da un contenuto in olio fra i più elevati (28-68% su peso secco (Campbell, 2008)).

## 5. EFFICIENZA DI UTILIZZO DELLA LUCE

Il maggior limite da superare per massimizzare la produttività algale riguarda l'efficienza nell'utilizzazione della luce: più dell'80% dei fotoni incidenti non sono utilizzati nella fotosintesi, poiché buona parte dell'energia assorbita è dissipata come calore (*Non Photochemical Quenching* - NPQ) e come fluorescenza. Tale fenomeno diventa tanto maggiore quanto più aumenta la densità cellulare nella coltura, allontanando la possibilità di raggiungere alte concentrazioni di biomassa, necessarie alla sostenibilità economica del sistema. Ciò è dovuto all'evoluzione delle alghe avvenuto nell'ambiente naturale, in cui vi è bassa densità cellulare, limitata disponibilità di luce e sostanze minerali. Le alghe possiedono un efficiente sistema antenna per la raccolta della luce solare, che contiene centinaia di molecole di clorofilla. Questo sistema di raccolta della luce, indispensabile per la crescita a profondità elevate, rappresenta una grande limitazione per la crescita in fotobioreattore, in quanto l'alta concentrazione di pigmenti (clorofilla e carotenoidi) conferisce un'elevata densità ottica alla coltura e causa un completo assorbimento della luce da parte degli strati superficiali della coltura. Il risultato è la presenza di un gradiente di luce all'interno del fotobioreattore: la maggior parte dell'energia luminosa incidente è assorbita dal primo strato superficiale di cellule, le quali non sono in grado di utilizzarla se non in minima parte per il loro metabolismo. L'eccesso di luce attiva meccanismi specifici per dissipare l'energia in eccesso in calore (dissipazione termica), in particolare si attiva un meccanismo chiamato *Non-Photochemical Quenching* (NPQ). Inoltre l'eccesso di energia provoca fotoinibizione, con conseguente perdita in produttività. Negli strati più profondi della coltura la luce è debole o assente, limitando la fotosintesi. Le cellule, peraltro respirano consumando composti organici, e quindi dissipano energia metabolica. Solo lo strato cellulare intermedio si trova in condizioni d'illuminazione ottimali per l'attività fotosintetica, e dà il massimo contributo alla produttività della coltura cellulare (fig. 5) (Formighieri e Bassi, 2011).

Una strategia di miglioramento dell'utilizzo della luce è diretta a combinare una riduzione del contenuto in pigmenti per cellula (per garantire una maggiore omogeneità dell'illuminazione nel fotobioreattore) e una diminuzione del livello di NPQ (per ridurre la frazione di energia assorbita dissipata in calore).

Da quanto sopra descritto, appare chiaro come sia necessario limitare la dissipazione termica dell'energia assorbita dalle alghe per migliorare l'efficienza di conversione della luce in biomassa. Tutti gli organismi fotosintetici possiedono un sistema molecolare capace di dissipare l'ener-

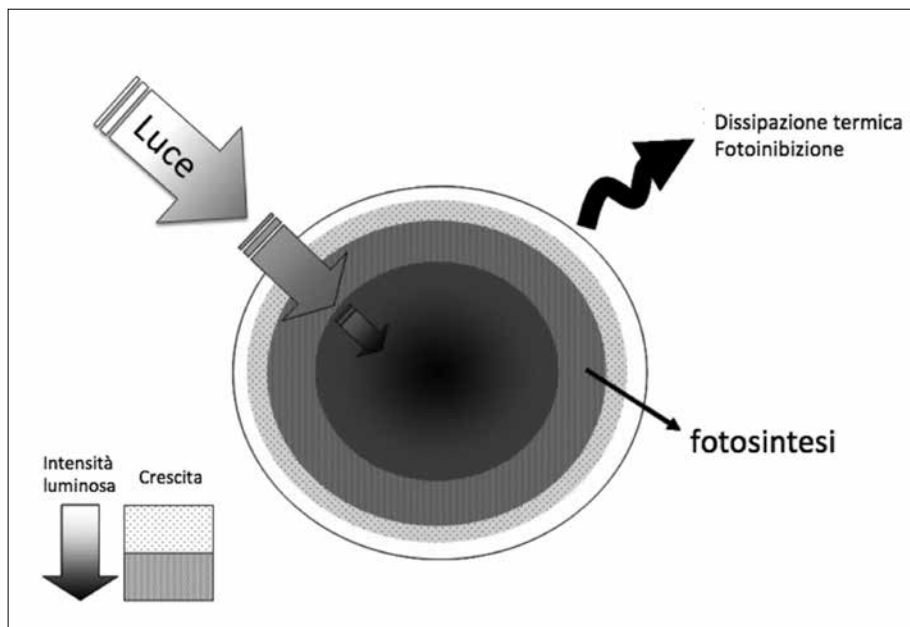


Fig. 5 Schema di fotobioreattore tubolare in sezione trasversale. Una coltura del ceppo selvatico (*wild-type*) assorbe la maggior parte della luce negli strati superficiali a causa dell'alto contenuto di pigmenti per cellula. La luce assorbita è in eccesso ed è dissipata termicamente dai meccanismi di fotoprotezione della cellula. Al centro della coltura la luce è debole o assente. Solo lo strato cellulare intermedio si trova in condizioni ottimali per l'attività fotosintetica, e dà il massimo contributo alla produttività della coltura cellulare

gia assorbita come calore (NPQ) (De Bianchi et al., 2010). La proteina LhcSR è deputata a questa funzione nelle alghe verdi e nelle diatomee (Peers et al., 2009).

Questa viene accumulata in risposta alle condizioni di luce a cui la cellula è stata esposta durante la crescita (Bonente et al., 2011) e una volta accumulata, catalizza la dissipazione termica (NPQ), anche a luci relativamente basse. Questa è una risposta delle alghe unicellulari alle condizioni naturali dove, per evitare la fotoinibizione, preferiscono bloccare la fotosintesi e migrare verso zone meno illuminate della colonna d'acqua. Normalmente la maggior parte delle specie algali si posizionano in zone in cui vi sono circa  $200 - 300 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$  quindi condizioni luminose al di sotto dell'intensità di saturazione della fotosintesi, mentre in una giornata soleggiata sono disponibili sulla superficie  $2000 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$  circa. Lo studio di NPQ e delle proteine che regolano questa funzione sarà d'importanza fondamentale nella domesticazione delle alghe per la produzione di biocombustibili.



## 6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

A tutt'oggi, i biocombustibili più usati a livello mondiale sono il bioetanolo e il biodiesel, derivati entrambi da biomasse vegetali. Queste fonti energetiche, dette "biocombustibili di prima generazione" gravano sulla filiera alimentare, poiché la loro produzione sottrae terreni destinati alle coltivazioni alimentari. Le biomasse algali consentirebbero di aggirare il problema, permettendo di ottenere biodiesel di terza generazione. Le alghe oggi utilizzate in ambito industriale sono ceppi selvatici (*wild-type*) provenienti dall'ambiente naturale. Le microalghe sono utilizzate come "*cell-factory*" per produrre composti ad alto valore aggiunto e proteine ricombinanti destinate all'industria farmaceutica. Il costo unitario di produzione è però eccessivo quando lo scopo principale è la produzione di biomassa, e quindi di biocombustibili rinnovabili ed eco-sostenibili. Affinché la coltivazione algale possa diventare una realtà economicamente competitiva, è necessaria la domesticazione, cioè la selezione di ceppi algali con peculiari caratteristiche e con nuovi tratti, introdotti attraverso approcci di mutagenesi e ingegneria genetica. I timori dell'opinione pubblica sulle questioni della biosicurezza potranno essere controbilanciati dagli indubbi vantaggi legati all'utilizzo di alghe transgeniche per la produzione di biocombustibili, considerando anche che tali organismi sono fatti crescere in ambienti chiusi e circoscritti, come i fotobioreattori. È inoltre facilmente dimostrabile che un'alga ingegnerizzata per crescere ottimamente in fotobioreattore, non potrà sopravvivere in ambiente naturale a causa dell'incapacità di assorbire abbastanza luce e di essere fotoprotetta per NPQ.

Oltre a quelle elencate sopra, ci sono altre strategie per aumentare ulteriormente la produttività delle colture algali. Una di queste consiste nello sfruttamento della caratteristica di molte alghe unicellulari di essere mixotrofe, in grado cioè di utilizzare composti organici come fonte di carbonio, riuscendo così a crescere anche al buio. In tal modo si avrebbe un incremento considerevole nella produzione di biomassa algale. Il carbonio organico da fornire alle microalghe potrebbe anche derivare dalla degradazione di materiale lignocellulosico. L'energia ricavabile dalla conversione della cellulosa è potenzialmente enorme, poiché si tratta di un materiale abbondante, a bassissimo costo, la cui produzione non interferisce con le coltivazioni a scopo alimentare. Tale materiale è una fonte alternativa di biomassa, e comprende gli scarti agricoli/industriali, i residui cartacei, i rifiuti solidi urbani derivanti dalla raccolta differenziata o le cosiddette *energy-crop*, ossia colture erbacee a basso costo di mantenimento, quali *Miscanthus sp.* Queste tipologie di biomasse lignocellulosiche vengono solitamente eliminate per combustione o compostaggio.

Per liberare gli zuccheri contenuti nella matrice lignocellulosica è necessario trovare un metodo efficiente e poco costoso per rompere le pareti cellulari dei vegetali. Lo scopo è liberare la cellulosa immersa nello scheletro polimerico della matrice vegetale, rendendola disponibile per enzimi o agenti chimici, ottenendo così una fonte di carbonio più facilmente utilizzabile dalle microalghe. Sono state proposte diverse strategie di pre-trattamento: processi fisici, come la triturazione meccanica; processi chimici, come l'idrolisi acida; processi fisico-chimici, come lo *steam explosion*. Quest'ultima è la tecnica più utilizzata e consiste in un trattamento idrotermico con vapore saturo ad alta pressione (160°C-260°C; 4,83 MPa) e un successivo abbassamento repentino di pressione. Grazie a questo pre-trattamento, le fibrille di cellulosa si estraggono dalla matrice emicellulosica, permettendo così di raggiungere circa il 90% di efficienza nella successiva fase idrolitica. Tuttavia i trattamenti appena descritti sono ancora troppo costosi, lenti, poco efficienti e/o portano alla formazione di sostanze inibitorie degli enzimi idrolitici quali i furani e alcuni composti fenolici.

Una tecnica alternativa di pretrattamento delle biomasse lignocellulosiche, che sta aprendo interessanti prospettive, prevede il ricorso a sistemi biologici. Numerosi funghi e microrganismi sono capaci di degradare i componenti della parete cellulare, convertendola in zuccheri. Alcuni batteri sono in grado di colonizzare una vasta gamma di nicchie ecologiche. Esistono ceppi cellulolitici in grado di resistere a condizioni ambientali estreme, come esempio temperature molto alte (specie ipertermofile) o molto basse (specie psicrofile), o elevate acidità (specie acidofile) (Maki et al., 2009). Non solo questi ceppi abitano ambienti con caratteristiche fisico-chimiche simili alle condizioni di un processo impiantistico, ma molto spesso sono in grado di produrre enzimi che offrono diversi vantaggi biotecnologici e industriali rispetto agli enzimi mesofili. In particolare, gli enzimi ipertermofili sono più facili da purificare tramite trattamento termico, e la loro termostabilità è spesso correlata a un'alta resistenza ai denaturanti chimici. Oltre a ciò, poter condurre reazioni enzimatiche ad alte temperature permette di evitare contaminazioni microbiche, di abbassare la viscosità del mezzo, e spesso di raggiungere rese più alte (Unsworth et al., 2007).

Sfruttando enzimi "estremofili" per la degradazione della parete cellulare, si potrebbe migliorare notevolmente il processo di pre-trattamento, combinando sistemi chimico-fisici e biologici. Diverse specie di batteri e archaea termoresistenti, in grado di utilizzare glucani per crescere, sono tutt'ora al centro di studi finalizzati all'utilizzo di queste specie nella produzione industriale. Tra questi figurano membri del regno degli Archaea, come *Thermococ-*

*cales*, *Sulfolobales*, ed eubatteri ipertermofili quali *Thermotogales* e *Clostridiales* (Haki, 2003).

La ricerca biotecnologica sull'utilizzo di enzimi termoresistenti per la degradazione della parete cellulare potrà contribuire all'eliminazione di alcuni punti critici della produzione di bioenergia a partire da residui ligno-cellulosici, e potrà contribuire allo sviluppo di filiere miste alimentari/bio-energetiche.

Concludendo, l'utilizzo di ceppi algali modificati per la produzione di biocombustibili rinnovabili e composti di alto valore aggiunto, rappresenta sicuramente una interessante e promettente prospettiva su cui investire risorse e ricavare uno stile di vita più pulito, rispettoso dell'ambiente e dotato di grandi risorse energetiche (Formighieri e Bassi, 2011).

#### RINGRAZIAMENTI

Gli studi commentati in questo articolo sono stati finanziati dalla comunità europea (Progetti “*Sunbiopaths*” e “*Harvest*”), dal ministero delle politiche agricole (Progetti “Idrobio” e “Biomassval”) e dalla Fondazione CARIVERO-NA (Progetto “Biomasse di oggi e di domani”).

#### RIASSUNTO

La società moderna si trova di fronte a un grave problema energetico: la popolazione mondiale è cresciuta da 2,5 miliardi nel 1950 a 7 miliardi nel 2011, e con essa è aumentata la domanda energetica, soddisfatta per 80% dai combustibili fossili. Per evitare una crisi energetica globale, è ormai evidente la necessità di incrementare l'uso di fonti energetiche alternative.

L'utilizzo di biomassa da microalghe per la produzione di biocarburanti, rinnovabili, biodegradabili, competitivi e zero emissioni di gas a effetto serra è un'interessante prospettiva, poiché la produzione di biomassa algale non compete per le terre coltivabili o per la domanda di cibo.

Il compito della ricerca biotecnologica in questo campo è la domesticazione di specie algali per una migliore efficienza d'uso della luce e per aumentare il contenuto di lipidi. Questo permetterà di ridurre i costi di costruzione e gestione degli impianti fotobioreattore e del trattamento della biomassa.

#### ABSTRACT

Modern society is facing a serious energy problem: the world's population has grown from 2.5 billion in 1950 to 7 billion in 2011, and with it increased energy demand,

satisfied by the use of fossil fuels for 80%, but they are rapidly running out. To avoid a global energy crisis, it is now a clear need to increase the use of alternative energy sources. The use of biomass of microalgae for the biofuels production, renewable, biodegradable, competitive and zero greenhouse gas emissions is a perspective shared since production with algae does not compete for arable land or for need for food.

The task of biotechnological research in this field is the domestication of algal species for better light-use efficiency and for increasing the lipid content. This will minimize the costs of construction and management of the photobioreactor installations and biomass treatment.

## BIBLIOGRAFIA

- ADAMS JM, GALLAGHER J A., DONNISON IS (2008): *Fermentation study on Saccharina latissima for bioethanol production considering variable pre-treatments*, «Journal of Applied Phycology», 21, pp. 569-574.
- BONENTE G., BALLOTTARI M., TRUONG T.B., MOROSINOTTO T., AHN T.K., FLEMING G.R., NIYOGI K.K., BASSI R. (2011): *Analysis of LhcSR3, a protein essential for feedback de-excitation in the green alga Chlamydomonas reinhardtii*, «PLoS biology», 9.
- BRUHN A., DAHL J., NIELSEN H.B., NIKOLAISEN L., RASMUSSEN M.B., MARKAGER S., OLESEN B., ARIAS C., JENSEN P.D. (2011): *Bioenergy potential of Ulva lactuca: biomass yield, methane production and combustion*, «Bioresource technology», 102, pp. 2595-604.
- CAMPBELL M.N. (2008): *Biodiesel: Algae as a Renewable Source for Liquid Fuel*, «Guelph Engineering Journal», 1, pp. 2-7.
- CHISTI Y. (2007): *Biodiesel from microalgae*, «Biotechnology advances», 25, pp. 294-306.
- DE BIANCHI S, BALLOTTARI M, DALL'OSTO L, BASSI R. (2010): *Regulation of plant light harvesting by thermal dissipation of excess energy*, «Biochemical Society Transactions», 38, pp. 651-660.
- DOEBLEY J.F., GAUT B.S., SMITH B.D. (2006): *Review The Molecular Genetics of Crop Domestication*, «Cell», 127, pp. 1309-1321.
- FORMIGHIERI C., BASSI R. (2011): *Algae as a new biomass resource – possibilities and constraints*, in *Encyclopedia of Sustainability Science and Technology (ESST)*, Springer Publishing.
- HAKI G. (2003): *Developments in industrially important thermostable enzymes: a review*, «Bioresource Technology», 89, pp. 17-34.
- HALLMANN A. (2007): *Algal Transgenics and Biotechnology*, «Transgenic Plant Journal», 1, pp. 81-98.
- HU Q., SOMMERFELD M., JARVIS E., GHIRARDI M., POSEWITZ M., SEIBERT M., DARZINS A. (2008): *Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances*, «The Plant journal: for cell and molecular biology», 54, pp. 621-39.
- KIM N.J., LI H., JUNG K., CHANG H.N., LEE P.C. (2011): *Ethanol production from marine algal hydrolysates using Escherichia coli KO11*, «Bioresource technology», 102, pp. 7466-9.
- MAKI M., LEUNG K.T., QIN W. (2009): *The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass*, «International journal of biological sciences», 5, pp. 500-16.
- MELIS A. (2009): *Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: Minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency*, «Plant Science», 177, pp. 272-280.

- LINDBERG P., PARK S., MELIS A. (2010): *Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using Synechocystis as the model organism*, «Metabolic Engineering», 12, pp. 70-79.
- MERCHANT S.S., PROCHNIK S.E., VALLON O., HARRIS E.H., KARPOWICZ S.J., WITMAN G.B., TERRY A., SALAMOV A., FRITZ-LAYLIN L.K., MARÉCHAL-DROUARD L., *et al.* (2007): *The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions*, «Science», 318, pp. 245-251.
- NAIK S.N., GOUD V.V., ROUT P.K., DALAI A.K. (2010): *Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review*, «Renewable and Sustainable Energy Reviews», 14, pp. 578-597.
- OTSUKI T. (2001): *A study for the biological CO<sub>2</sub> fixation and utilization system*, «The Science of the total environment», 277, pp. 21-5.
- PEERS G., TRUONG T.B., OSTENDORF E., BUSCH A., ELRAD D., GROSSMAN A.R., HIPPLER M., NIYOGI K.K. (2009): *An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis*, «Nature», 462, pp. 518-21.
- SCHENK P.M., KRUSE O., HANKAMER B. (2007): *Engineering photosynthetic light capture : impacts on improved solar energy to biomass conversion*, «Plant Biotechnology Journal», 5, pp. 802-814.
- SINGH N.K., DHAR D.W. (2011): *Microalgae as second generation biofuel. A review*, «Agronomy for Sustainable Development», 31, pp. 605-629.
- UNSWORTH L.D., VAN DER OOST J., KOUTSOPOULOS S. (2007): *Hyperthermophilic enzymes--stability, activity and implementation strategies for high temperature applications*, «The FEBS journal», 274, pp. 4044-56.



## L'importanza dell'efficienza fotosintetica per la produzione di biodiesel da alghe unicellulari

### LE ALGHE UNICELLULARI COME FONTE DI BIOCOMBUSTIBILI

Il possibile utilizzo degli organismi fotosintetici per la produzione di biocombustibili sta ricevendo un'attenzione crescente nell'ipotesi che questi possano, almeno parzialmente, sostituire i combustibili fossili (Chisti and Yan, 2011; Dismukes et al., 2008; Hannon et al., 2010; Hu et al., 2008; Malcata, 2011). Una delle possibilità più interessanti in questa direzione è la produzione di biodiesel a partire da fonti biologiche di trigliceridi. Attualmente la maggior parte del biodiesel presente sul mercato è prodotto a partire da semi di piante oleaginose quali il girasole o la soia. Utilizzare piante coltivate per questo scopo, tuttavia, presenta numerosi svantaggi il primo dei quali è una produttività limitata. Infatti, le riserve lipidiche all'interno dei semi utilizzabili per la produzione di biodiesel rappresentano soltanto il 5% dell'intera biomassa (Chisti, 2007; Jeong et al., 2004). Un'altra contro-indicazione molto importante è il fatto che l'utilizzo di piante coltivate per la produzione di biocombustibili sottrae terreno coltivabile al più tradizionale utilizzo per la produzione alimentare, sollevando molte comprensibili critiche di tipo etico (Singh et al., 2011).

Un'alternativa interessante che potenzialmente può permettere di superare queste limitazioni è lo sfruttamento di un altro gruppo di organismi fotosintetici, le microalghe. Alcune specie appartenenti a questo gruppo, infatti, hanno la capacità di accumulare grandi quantità di lipidi che possono essere estratti, processati e raffinati in combustibili liquidi quali il biodiesel direttamente utilizzabile dalle attuali infrastrutture dell'industria dei trasporti. Alcune specie

\* *Dipartimento di Biologia, Università di Padova*

di alghe sono in grado di accumulare oltre il 50% della loro biomassa sotto forma di lipidi e hanno una produttività potenziale di 10-20 volte superiore alle piante (Chisti and Yan, 2011; Hannon et al., 2010; Rodolfi et al., 2009). Una delle ragioni di questa maggiore produttività è il fatto che l'intera biomassa algale è fotosinteticamente attiva, a differenza delle piante dove alcuni tessuti come le radici e il fusto sono invece consumatori dei prodotti della fotosintesi. Le alghe, inoltre, non risentono della stagionalità tipica delle piante superiori nelle zone temperate e possono sostenere una produzione continua di biomassa per tutto l'anno. Inoltre, le alghe sono in grado di fissare l'anidride carbonica in modo molto più efficiente rispetto alle piante superiori ed è stato ipotizzato di associare la coltivazione di alghe ad impianti che producono grandi quantità di CO<sub>2</sub> per limitare la liberazione nell'atmosfera di questo gas serra (Hannon et al., 2010). Un ulteriore vantaggio delle alghe rispetto alle piante è il fatto che queste non necessitano di terreni fertili o acqua potabile e quindi gli impianti di coltivazione possono essere installati su terreni marginali eliminando la competizione con le produzioni alimentari. È quindi ormai chiaro nella comunità scientifica che le alghe rappresentano un'alternativa da tenere in assoluta considerazione per la produzione di biocombustibili su larga scala in una prospettiva a medio-lungo termine. È importante sottolineare, tuttavia, che questo elevato potenziale non è ancora efficacemente sfruttato dai sistemi di coltivazione su larga scala e che un intenso sforzo di ricerca è ancora necessario per rendere la produzione di biocarburanti una realtà economicamente competitiva (Amaro et al., 2011; Chisti and Yan, 2011; Malcata, 2011; Takeshita, 2011).

La definizione di microalghe racchiude in realtà un numero molto elevato di organismi molto diversi tra loro, adattati a vivere in condizioni ambientali molto differenti. All'interno di questa grande variabilità solo alcune specie hanno caratteristiche adatte a un loro sfruttamento per la produzione di biodiesel e per questa ragione la scelta dell'organismo da utilizzare nelle coltivazioni su larga scala è un fondamentale prerequisito per lo sviluppo di produzioni di questo tipo. È importante sottolineare che difficilmente si potrà isolare un organismo che possieda tutte le caratteristiche ideali e sarà fondamentale procedere con il miglioramento genetico delle specie di interesse per renderle ancora più produttive. In questo contesto alcune specie di alghe, come quelle appartenenti al genere *Nannochloropsis*, stanno emergendo come le più interessanti grazie ai loro buoni tassi di crescita (Sforza et al., 2010) e alla capacità di accumulare grandi quantità di lipidi che possono raggiungere anche il 60-70% del peso secco totale (Boussiba et al., 1987; Hodgson et al., 1991; Rodolfi et al., 2009). La recente disponibilità del geno-



ma di *Nannochloropsis* e lo sviluppo di metodi per introdurre modificazioni genetiche contribuiscono in modo fondamentale a rendere questo organismo probabilmente il modello più importante per lo studio della produzione dei biocombustibili in alghe (Kilian et al., 2011; Radakovits et al., 2012). Per questa ragione anche i successivi paragrafi si concentreranno su specie di *Nannochloropsis*.

#### EFFETTO DELLE DIVERSE CONDIZIONI DI ILLUMINAZIONE SULLA CRESCITA DI NANNOCHLOROPSIS

La crescita e la produttività delle colture algali sono influenzate da molti fattori il cui effetto deve essere compreso nei dettagli per riuscire a ottimizzare i sistemi di coltivazione su larga scala, i fotobioreattori. Uno dei fattori principali che influenza la crescita delle alghe è la luce, la quale fornisce tutta l'energia necessaria per supportare l'intero metabolismo. Nonostante la radiazione luminosa proveniente dal sole fornisca quantità di energia molto elevate, questa energia è distribuita su superfici molto ampie. Una bassa efficienza di utilizzo della luce, quindi, comporta la conseguente necessità di ampliare l'area occupata dal fotobioreattore incrementando i costi di costruzione e gestione rendendo il sistema non economicamente sostenibile. L'ottimizzazione dell'efficienza di utilizzo della radiazione luminosa è quindi indispensabile per rendere competitive le coltivazioni di alghe in fotobioreattori.

In natura le alghe sono esposte a condizioni di illuminazione variabili. Nelle condizioni in cui la quantità di radiazione a disposizione delle alghe è bassa, questa deve essere assorbita nel modo più efficiente possibile per garantire una buona velocità di crescita. In altre occasioni, invece, l'illuminazione può saturare la fotosintesi e quindi superare la capacità delle alghe di utilizzarla per la fissazione dell'anidride carbonica. In questo caso la radiazione luminosa in eccesso non utilizzata per le reazioni fotochimiche può portare alla formazione di forme reattive dell'ossigeno (ROS) e al conseguente stress ossidativo, dannoso per la cellula (Li et al., 2009). In queste occasioni in particolare uno dei componenti dell'apparato fotosintetico, il fotosistema II (PSII), è il preferenziale bersaglio dei danni ossidativi e deve essere continuamente riparato tramite la re-sintesi degli specifici componenti danneggiati (Nixon et al., 2010). Per prosperare in un ambiente dove l'illuminazione è una grandezza variabile, gli organismi fotosintetici hanno anche evoluto meccanismi per modulare l'efficienza di utilizzo della luce dissipando l'energia eventualmente in eccesso come calore per ridurre la formazione di ROS (Li et al., 2009). In questo contesto è importante sot-

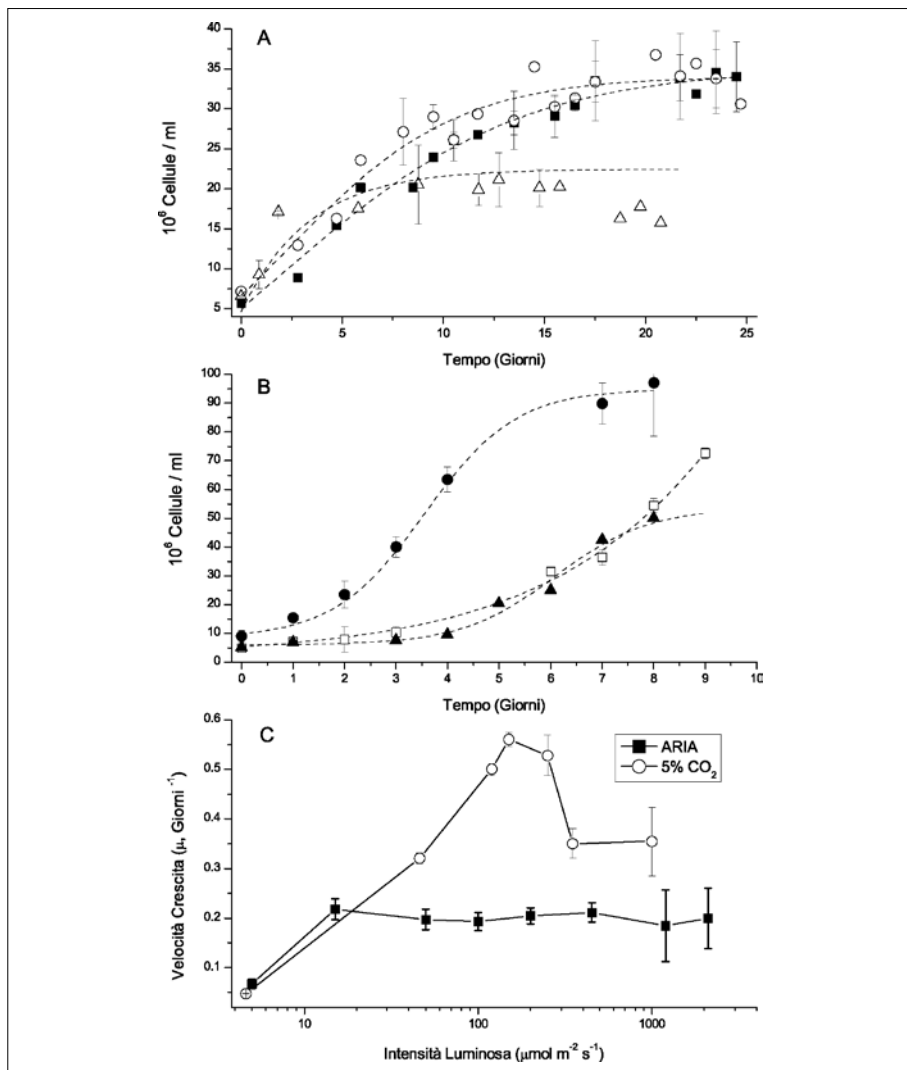


Fig. 1 Effetto dell'intensità luminosa sulla crescita di *Nannochloropsis*

A) Curve di crescita in presenza di  $\text{CO}_2$  atmosferica condotte a diverse intensità di illuminazione fornite in luce continua: le curve a 15, 100, 1200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sono rispettivamente riportate come quadrato, cerchio e triangolo. B) curve di crescita in presenza di  $\text{CO}_2$  al 5% condotte a diverse intensità di illuminazione: le curve a 15, 150, 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sono rispettivamente riportate come quadrato, cerchio e triangolo. In figura A e B è riportato il numero di cellule per millilitro di coltura in riferimento al giorno della curva di crescita. C) tasso di crescita ( $\mu$ ) calcolato durante la fase esponenziale nelle diverse curve di crescita condotte alle diverse intensità luminose in presenza di  $\text{CO}_2$  atmosferica o al 5%. Dati da (Sforza et al., 2012; Simionato et al., 2011).

tolineare che sia la riparazione dei fotosistemi danneggiati sia la dissipazione dell'energia come calore riducono l'efficienza di utilizzo della luce da parte delle cellule e quindi tali processi dovrebbero essere ridotti al minimo per poter raggiungere la più alta produttività.

La capacità di *Nannochloropsis* di rispondere a differenti condizioni di illuminazione è stata saggiata valutando l'effetto di diverse intensità luminose sulla crescita (bassa luce,  $15 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , luce di controllo,  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , alta luce,  $1200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , figura 1A, dati da (Simionato et al., 2011)). Questi dati suggeriscono che cellule di *Nannochloropsis* esposte a intensità luminose molto diverse sono in grado di mantenere delle cinetiche di crescita molto simili. Questo è possibile grazie alla capacità di *Nannochloropsis* di modulare il proprio apparato fotosintetico e ottimizzarlo in base alla quantità di luce fornita alle colture, una risposta generalmente nota come acclimatazione (Falkowski and LaRoche, 1991; Falkowski and Owens, 1980; Walters, 2005; Zou and Richmond, 2000).

Evidenze che supportano l'effettiva attivazione di una risposta di acclimatazione in queste cellule sono mostrate in figura 2 (dati da (Simionato et al., 2011)). 1-qP (Baker, 2008; Maxwell and Johnson, 2000) è un parametro che permette di valutare la capacità del fotosistema II di iniziare il trasporto degli elettroni. Quando i centri di reazione del fotosistema II sono aperti e disponibili a ricevere un fotone di luce, il valore di questo parametro è 0. Come riportato in figura 2A, in cellule esposte a intensità luminose crescenti si assiste a una progressiva crescita di 1-qP il cui valore raggiunge 1 quando i fotosistemi sono saturati e completamente chiusi, quindi non disponibili a ricevere ulteriori fotoni. Quando l'andamento di questa curva viene confrontato per cellule cresciute in regimi luminosi diversi si notano delle differenze evidenti: colture esposte ad alta luce, infatti, raggiungono la saturazione della fotosintesi a intensità di luce più elevate, suggerendo che l'apparato fotosintetico dell'alga sia modulato in modo da sfruttare una frazione di luce incidente più alta per le reazioni fotochimiche.

Nelle piante questa maggiore capacità di utilizzo dell'energia luminosa è associata a un'incrementata efficienza di fissazione dell'anidride carbonica, grazie all'aumento della concentrazione degli enzimi del ciclo di Calvin e in particolare della RuBisCO (Ballottari et al., 2007). Nella figura 2B è riportato una quantificazione di questo enzima in alghe acclimate a diverse illuminazioni la quale mostra come il contenuto di RuBisCO aumenti con l'intensità luminosa applicata alle colture durante la crescita. Questo suggerisce che le cellule in alta luce aumentino la capacità di fissare la  $\text{CO}_2$  in modo tale da sfruttare una maggiore quantità di prodotti della fase luminosa della fotosintesi.

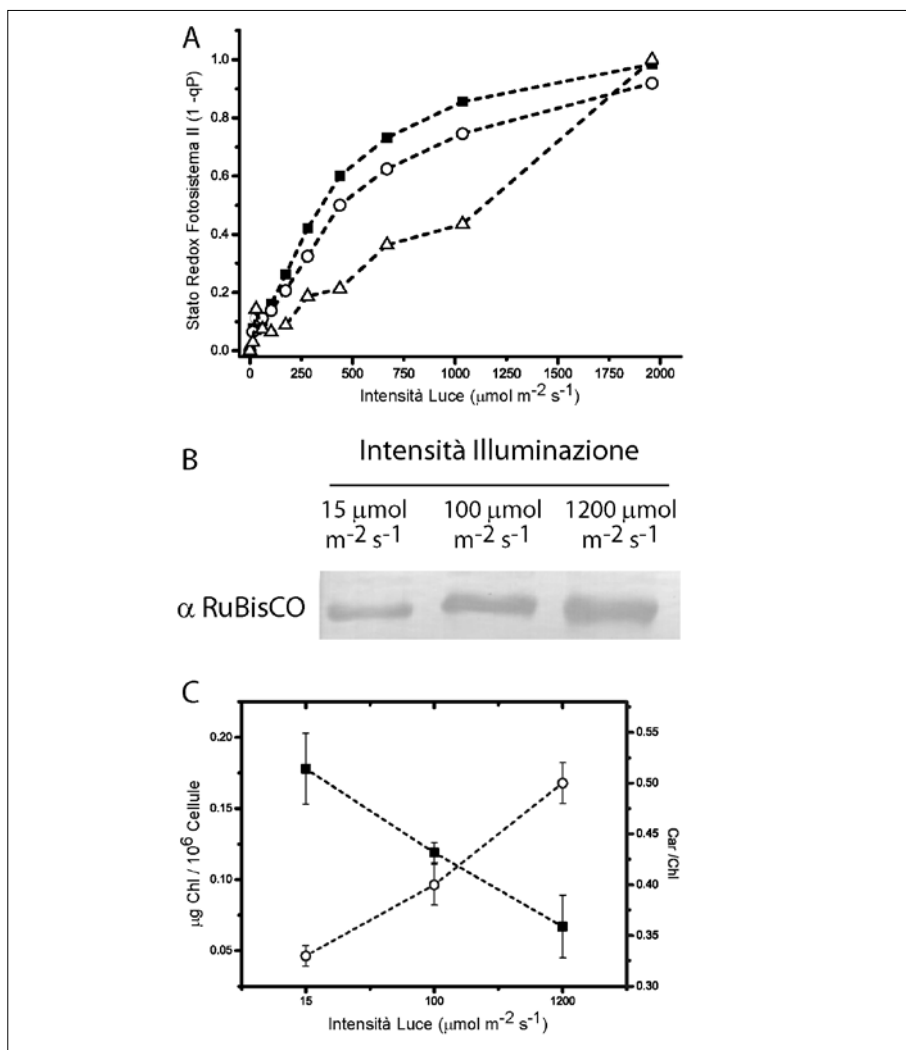


Fig. 2 Acclimatazione di *Nannochloropsis* alle differenti condizioni di intensità luminosa in presenza di diossido di carbonio in concentrazione atmosferica

A) grado di saturazione della fotosintesi in cellule adattate alle diverse intensità luminose. Il parametro 1-qP è riportato per le colture cresciute a 15 (quadrato), 100 (cerchio) e 1200 (triangolo)  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . B) Western Blot per la valutazione della presenza dell'enzima RuBisCO alla fine della fase esponenziale in cellule adattate alle diverse luci. Ciascun campione è stato caricato a parità di clorofilla (1  $\mu\text{g}$ ) e il segnale è stato rilevato usando un anticorpo specifico per la subunità L dell'enzima. C) Contenuto in pigmenti in cellule adattate alle diverse intensità luminose (fine della fase esponenziale). Sono riportate le stime relative al contenuto in clorofilla a ( $\mu\text{g Chl}/10^6$  cellule) e il rapporto carotenoidi/clorofilla. Dati da (Simionato et al., 2011)

Un'altra risposta comune delle alghe a diverse condizioni di illuminazione è la modulazione dell'assetto pigmentario, associata a una riorganizzazione dell'intero apparato fotosintetico. Il contenuto in clorofilla delle cellule cresciute a concentrazione atmosferica di  $\text{CO}_2$  è fortemente influenzato dalla quantità di fotoni che raggiungono le colture (fig. 2C). Infatti le cellule cresciute a bassa luce mostrano un accumulo maggiore di clorofilla per incrementare la loro efficienza di raccolta della radiazione, mentre nelle cellule ad alta luce si osserva la tendenza opposta. Mentre il ruolo principale della clorofilla è l'assorbimento della radiazione, un altro gruppo di pigmenti, i carotenoidi, sono fondamentali nel foto-proteggere l'apparato fotosintetico dallo stress ossidativo (Li et al., 2009) causato dall'alta luce. In accordo con questa funzione, in *Nannochloropsis* il contenuto in carotenoidi è fortemente incrementato nelle colture cresciute ad alta luce. Tutte le variazioni osservate indicano chiaramente che *Nannochloropsis* è in grado di acclimatarsi ai diversi regimi di intensità luminosa modulando il contenuto in pigmenti, in particolare accumulando clorofilla quando la radiazione incidente è limitante e invece i carotenoidi quando la luce assorbita è in eccesso, in modo tale da prevenire il più possibile i danni causati dalla formazione delle forme reattive dell'ossigeno.

I fotobioreattori per la coltivazione su larga scala delle alghe saranno verosimilmente collocati all'aperto, quindi in un ambiente naturale caratterizzato da intensità e disponibilità di luce estremamente variabili. L'organismo scelto per questo tipo di applicazioni dovrà quindi essere in grado di crescere e accumulare lipidi in differenti condizioni di illuminazione, non solo in quelle controllate tipiche di un laboratorio. La capacità di attivare una efficiente risposta di acclimatazione rappresenta, quindi, un importante parametro per l'identificazione di specie di alghe da utilizzare per le coltivazioni su larga scala. I risultati riportati nelle figure 1 e 2 mostrano come *Nannochloropsis* sia in grado di acclimatarsi a intensità luminose molto diverse e anche per questa ragione le specie di questo genere sono candidate interessanti per la produzione di biodiesel su larga scala in fotobioreattori.

#### PRODUTTIVITÀ FOTOSINTETICA DI NANNOCHLOROPSIS NELLE CONDIZIONI TIPICHE DI UN FOTOBIOREATTORE

Le valutazioni riportate fino a ora sono riferite a colture cresciute con una concentrazione di  $\text{CO}_2$  atmosferica, quindi in condizioni simili a quelle che

normalmente si trovano nell'ambiente naturale al quale le alghe si sono adattate durante l'evoluzione. Le condizioni di crescita nei fotobioreattori presentano però alcune specificità che devono essere considerate per riuscire a ottimizzare la crescita in questo ambiente artificiale.

Una delle maggiori differenze nelle coltivazioni su larga scala all'interno di fotobioreattori rispetto all'ambiente naturale è rappresentata dalla presenza di un supplemento di  $\text{CO}_2$ . Diversi studi hanno infatti mostrato che le alghe esposte a concentrazioni di anidride carbonica elevata sono in grado di sfruttare questa maggiore disponibilità per stimolare la produzione di biomassa. È quindi ormai assodato che coltivazioni su larga scala di alghe utilizzeranno una fornitura di  $\text{CO}_2$  supplementare (Bhola et al., 2011). Per questa ragione risulta molto importante verificare l'effetto delle diverse intensità luminose sulla crescita di *Nannochloropsis* in presenza di  $\text{CO}_2$  in eccesso (5%) (fig. 1B, dati da (Sforza et al., 2012)). Rispetto alle curve di crescita a concentrazione atmosferica di diossido di carbonio (fig. 1A) appare evidente come la  $\text{CO}_2$  stimoli positivamente la crescita delle alghe, aumentando sia il tasso di crescita calcolato durante i primi giorni della fase esponenziale sia la quantità di biomassa finale. È importante evidenziare come la  $\text{CO}_2$  in eccesso induca non soltanto un aumento nella produzione di biomassa nelle varie condizioni sperimentate ma alteri anche l'effetto delle diverse intensità luminose sulla crescita. Infatti, nelle cellule cresciute con  $\text{CO}_2$  la diversa intensità luminosa mostra un'influenza rilevante sul tasso di crescita, come riportato in figura 1B e a differenza di quanto visto in precedenza.

Analizzando in dettaglio l'effetto delle condizioni di illuminazione sui tassi di crescita ( $\mu$ ) in presenza o assenza di un supplemento di diossido di carbonio (fig. 1C), appare evidente che se le cellule sono cresciute a concentrazione atmosferica di  $\text{CO}_2$  la radiazione incidente risulta limitante solo nelle condizioni di luce più bassa. Con intensità maggiori di  $15 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , una quantità di luce comunque molto bassa, la crescita è invece limitata dalla disponibilità della  $\text{CO}_2$  piuttosto che dall'intensità luminosa. Se invece la  $\text{CO}_2$  è fornita in eccesso, l'effetto dell'intensità luminosa diventa preponderante e le alghe mostrano una crescita limitata dalla intensità di luce fino a  $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Al di sopra di questo valore la luce fornita risulta in eccesso e ha un effetto inibitorio sulla crescita di *Nannochloropsis*. Questo confronto, quindi, dimostra che l'effetto delle condizioni di illuminazione sulla produttività diventa molto più importante in condizioni di eccesso di  $\text{CO}_2$  che nelle condizioni naturali nelle quali le cellule sono in grado di mantenere il loro massimo tasso di crescita sotto un ampio intervallo di intensità di illuminazione.

Un'altra importante differenza tra le alghe cresciute in condizioni naturali

e in fotobioreattori è la concentrazione delle cellule nella coltura che nel secondo caso è molto più elevata. Questa concentrazione causa un'elevata densità ottica del mezzo che porta a una distribuzione molto disomogenea della luce nella coltura. Di conseguenza poche cellule sono esposte alla luce diretta e assorbono la grande maggioranza dell'energia a disposizione lasciando solo una piccola frazione residua agli strati inferiori di cellule. Gli strati di cellule più esterni sono inoltre facilmente esposti a una intensità di luce in eccesso rispetto alla loro capacità di utilizzarla per la fotosintesi e di conseguenza devono dissipare fino all'80% dell'energia assorbita sotto forma di calore per evitare danni da stress ossidativo. Queste cellule, quindi, non solo assorbono la maggior parte dell'energia a disposizione della coltura ma la utilizzano anche con bassa efficienza. Seguendo tale idea, è stato dimostrato che l'intera efficienza dei fotobioreattori aumenta quando il cammino ottico del reattore stesso è diminuito, riducendo la disomogeneità della distribuzione della luce (Xue et al., 2011). Sfortunatamente, cammini ottici molto brevi sono molto difficili da realizzare per gli impianti su larga scala per ragioni sia pratiche che economiche. Un altro fattore da considerare è che all'interno di un fotobioreattore le cellule sono continuamente sottoposte a un mescolamento. Questo determina per le alghe passaggi repentini da zone a piena luce a zone di piena ombra (Gordon and Polle, 2007). Le cinetiche di mescolamento variano molto a seconda del sistema di coltivazione utilizzato e nel caso di reattori tubulari chiusi queste sono nell'ordine dei millisecondi (Gordon and Polle, 2007) mentre per i *pond* sono di diversi ordini di grandezza più lente (Phillips and Myers, 1954).

Per riuscire a ottimizzare la produttività delle alghe in fotobioreattori è quindi importante capire come i cicli di luce/buio influenzano l'efficienza di utilizzo della luce da parte di questi organismi. Per questo motivo, *Nannochloropsis* è stata cresciuta in fotobioreattori a pannello esposti a cicli di luce/buio a frequenza modulata, in modo tale da simulare il mescolamento all'interno di un fotobioreattore (dati da (Sforza et al., 2012)). Questi esperimenti sono stati condotti in presenza di CO<sub>2</sub> e nutrienti in eccesso in modo tale da evitare inibizioni della crescita dovute ad altre carenze ed evidenziare l'effetto dell'alternanza di luce sulla crescita. Tutte le prove sono state effettuate fornendo alle colture la stessa quantità totale di fotoni, pari a 120  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  di luce continua, una quantità ancora limitante per la crescita in queste condizioni sperimentali. Una volta fissata l'intensità media di luce fornita, è stato preso in considerazione l'effetto di altri parametri quali la frequenza e l'intensità degli impulsi di luce. Come riportato in figura 3 (dati da (Sforza et al., 2012)) la scelta della frequenza applicata durante la crescita ha un effetto

importante sulle prestazioni di crescita di *Nannochloropsis*. In alcuni casi, il tasso di crescita è equivalente a quello di colture esposte a luce continua ( $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , fig. 3), dimostrando che le cellule sono in grado di sfruttare la luce pulsata con la stessa efficienza (Maxwell and Johnson, 2000). In altre condizioni, invece, quando la luce è fornita con bassa frequenza la crescita risulta inibita anche se la quantità di luce totale e l'intensità dell'impulso sono gli stessi. Risultati analoghi sono stati ottenuti sia con impulsi di 1200 che di  $350 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  suggerendo che l'intensità dell'impulso non abbia una rilevanza fondamentale sulla capacità delle alghe di utilizzare la luce in modo efficiente (fig. 3). I dati mostrano, inoltre, che le condizioni con i tassi di crescita più elevati ( $1200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  - 10 Hz and  $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  - 30 Hz) hanno in comune la stessa lunghezza della fase di illuminazione di circa 10 ms (dati da (Sforza et al., 2012)). La lunghezza dell'impulso di luce sembra quindi essere il parametro con l'influenza maggiore sulla crescita delle alghe. È interessante notare che la durata ottimale di 10 ms è in accordo con il tempo di turnover del PSII misurato in cellule algali intere (Dubinsky et al., 1986; Malcata, 2011): dopo l'assorbimento di un fotone da parte del fotosistema II sono infatti necessari 1-15 ms per ri-ossidare i trasportatori di elettroni e renderli disponibili ad accettare un altro fotone (Carvalho et al., 2011). Se il tempo di illuminazione è così breve, la maggior parte dei fotoni sono utilizzati per compiere la fotosintesi e non portano alla perdita di energia a causa della foto-inibizione o l'attivazione di meccanismi di dissipazione termica. Questi risultati dimostrano quindi come anche l'alta luce possa essere sfruttata con alta efficienza, senza creare danni all'apparato fotosintetico purché questa sia fornita per tempi molto brevi alle cellule. Al contrario, esposizioni più lunghe portano alla formazione di ROS e all'attivazione di meccanismi di dissipazione termica, portando a una perdita di efficienza del sistema. L'alternanza di cicli luce/buio può quindi, se opportunamente ottimizzata, essere di beneficio per l'efficienza fotosintetica (Gordon and Polle, 2007; Grobelaar, 2010; Kim et al., 2006; Kok, 1956; Matthijs et al., 1996; Nedbal et al., 1996; Phillips and Myers, 1954; Terry, 1986; Vejrazka et al., 2011; Xue et al., 2011), permettendo alle cellule di *Nannochloropsis* di sfruttare la luce pulsata con la stessa efficienza della luce continua della stessa intensità (Maxwell and Johnson, 2000).

#### EFFETTO DELLA LUCE SULL'ACCUMULO DI LIPIDI

Come discusso in precedenza, un organismo scelto per una produzione di



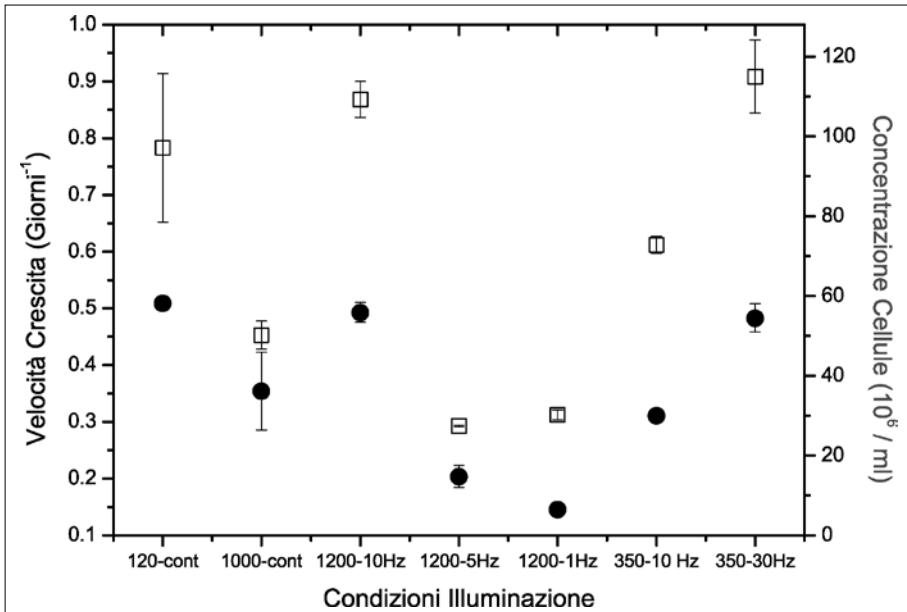


Fig. 3 Effetto dei cicli luce/buio sulla crescita di *Nannochloropsis*

In questa figura sono riportati i tassi di crescita specifici (quadrato) calcolati durante la fase esponenziale e la concentrazione cellulare (cerchio) alla fine della curva di crescita per le diverse curve condotte in diverse condizioni di luce pulsata. Dati da (Sforza. et al., 2012)

biocombustibili deve essere in grado di mantenere buoni tassi di crescita in diverse condizioni di illuminazione, ma deve anche essere in grado di produrre in modo costante la materia prima fondamentale per la produzione di biodiesel, i lipidi. In questo caso, nell'analizzare l'influenza della luce bisogna considerare non solo il suo ruolo nel metabolismo, ma anche il ruolo di segnale che influenza diversi processi all'interno della cellula (Brautigam et al., 2009; Eberhard et al., 2008; Kim et al., 2008).

Dati di letteratura suggeriscono che l'accumulo di lipidi in alghe unicellulari sia stimolato in condizioni di alta luce (Damiani et al., 2010), come evidenziato anche in specie del genere *Nannochloropsis* (Fisher et al., 1998; Solovchenko et al., 2010). Per analizzare questo problema in modo sistematico, il contenuto lipidico nelle alghe cresciute nelle varie condizioni di illuminazione e diossido di carbonio è stato valutato con metodi gravimetrici (fig. 4, dati da (Sforza et al., 2012; Simionato et al., 2011)). Quando le cellule sono cresciute a luce continua e a concentrazione atmosferica di  $\text{CO}_2$  (fig. 4A) l'accumulo di lipidi inizia durante la fase stazionaria a tutte le intensità luminose testate e alla fine della curva di crescita (25 giorni) la quantità finale di lipidi è molto simile in

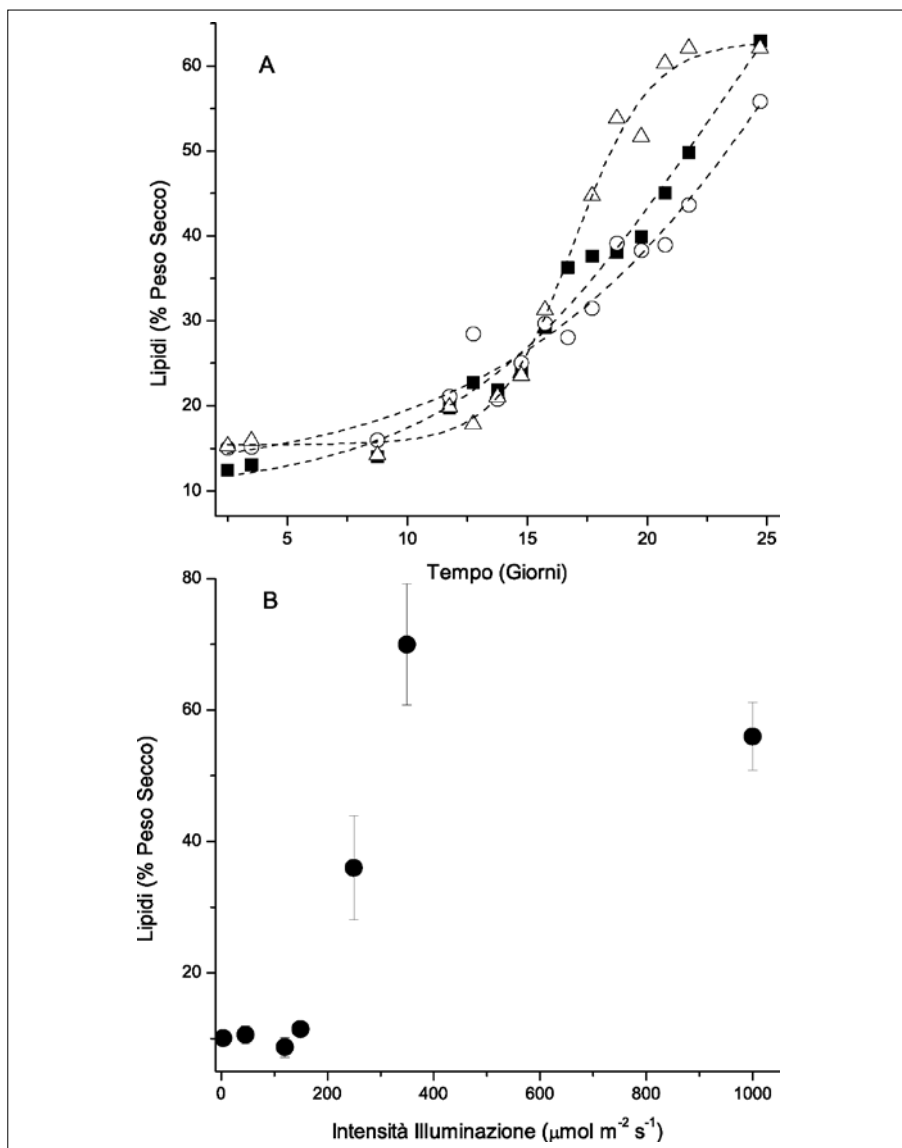


Fig. 4 Produzione di lipidi in colture di *Nannochloropsis* adattate alle diverse condizioni di illuminazione

A) percentuale di lipidi calcolata sul peso secco di colture cresciute a 15 (quadrato), 100 (cerchio) e 1200 (triangolo)  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in condizione di  $\text{CO}_2$  atmosferica. L'accumulo di lipidi è indotto durante la fase stazionaria indipendentemente dalle condizioni di illuminazione (dati da (Simionato et al., 2011)). B) quantità finale di lipidi in colture cresciute in eccesso di azoto alle diverse intensità luminose riportate in condizione di diossido di carbonio al 5% (dati da (Sforza et al., 2012))

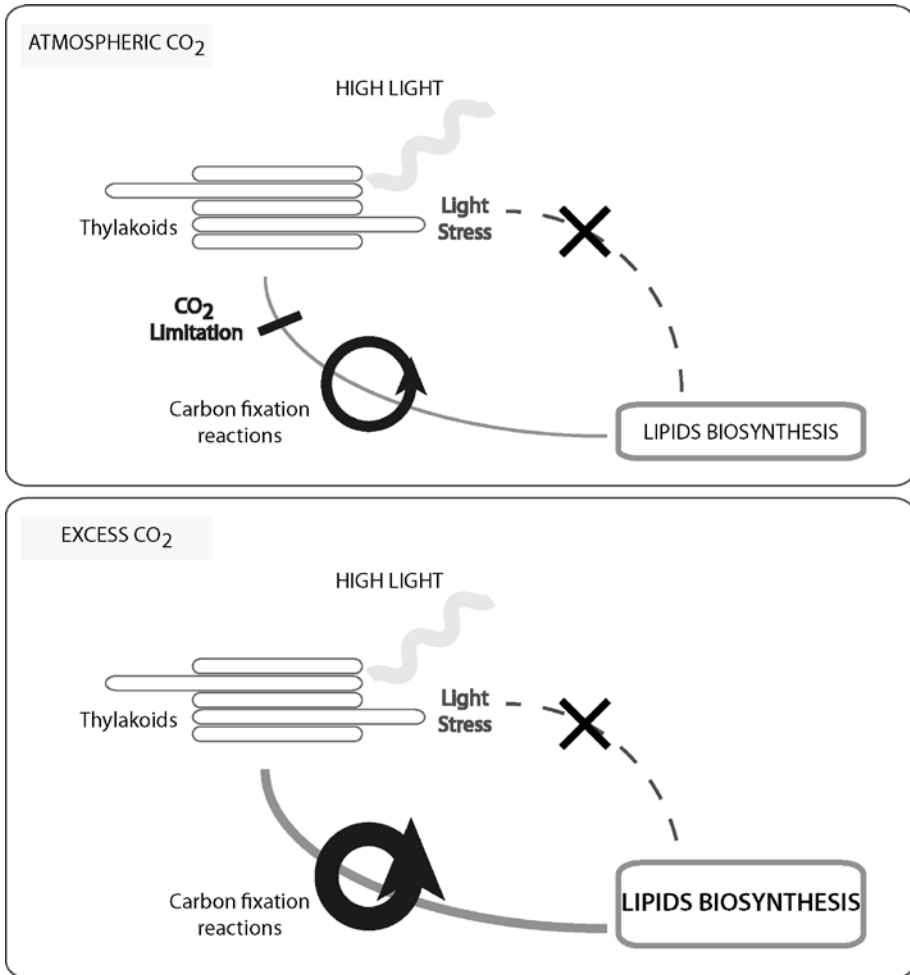


Fig. 5 Rappresentazione dell'effetto dell'alta luce sull'accumulo di lipidi in *Nannochloropsis*. In alto sono rappresentate condizioni di concentrazione atmosferica di diossido di carbonio, in basso il caso in cui questa sia fornita in eccesso

tutte le condizioni. L'accumulo pronunciato di lipidi durante la fase stazionaria è indotto dalla carenza di nutrienti tipica di questa fase (dati da (Simionato et al., 2011)). Questo risultato è in accordo con molti dati precedenti che mostrano che la carenza di nutrienti, e in particolare di azoto, stimola l'accumulo di lipidi in molte specie di microalghe (Gouveia and Oliveira, 2009; Rodolfi et al., 2009). In questi esperimenti, quindi, l'effetto della disponibilità di nutrienti sulla sintesi di lipidi è evidente, mentre l'intensità luminosa a cui le cellule

sono esposte non ha invece una particolare influenza sulla produzione finale. I risultati ottenuti sono, al contrario, profondamente diversi nel caso di colture cresciute in eccesso di diossido di carbonio (fig. 4B). In questa condizione, infatti, le cellule cresciute in bassa luce presentano un livello massimo di lipidi del 10% su peso secco corrispondente alla quantità costitutivamente presente nelle cellule. Nelle condizioni di alta luce, invece, la percentuale di lipidi raggiunge valori oltre il 60% del peso secco nonostante l'azoto sia sempre fornito in eccesso alle colture. L'effetto dell'intensità di luce sulla produzione di lipidi è quindi fortemente influenzato dalla disponibilità di diossido di carbonio. Una possibile spiegazione per queste osservazioni è che in condizioni di alta luce e CO<sub>2</sub> atmosferica l'efficienza del ciclo di Calvin è probabilmente limitante per le alghe, come suggerito dal fatto che la crescita è limitata proprio dalla disponibilità di anidride carbonica (fig. 1A) e dal fatto che l'enzima RuBisCO si accumula con l'aumentare dell'intensità luminosa alla quale le alghe sono cresciute (fig. 2B). Di conseguenza, in queste condizioni si accumulano molecole a monte del ciclo di Calvin-Benson e c'è una conseguente diminuzione di efficienza delle reazioni fotochimiche (fig. 5). La saturazione dei fotosistemi e la generazione di stress ossidativo in alta luce non ha però effetti rilevanti di stimolo né inibizione della biosintesi di lipidi. Quando l'illuminazione intensa è combinata a un eccesso di diossido di carbonio, invece, i prodotti del ciclo di Calvin-Benson si accumulano stimolando la biosintesi dei trigliceridi (fig. 5). Per questo motivo, la disponibilità di diossido di carbonio deve essere considerata un fattore molto importante sia nella crescita delle alghe ma anche nella produzione di lipidi da parte delle stesse. Tutte le evidenze discusse finora permettono di suggerire quindi che l'intensità luminosa non abbia un'influenza diretta sull'accumulo dei lipidi in *Nannochloropsis* e che la rete di *signaling* che normalmente risponde alle diverse condizioni di illuminazione non ne influenza direttamente la biosintesi. L'effetto dell'illuminazione sull'accumulo di lipidi è piuttosto indiretto e i segnali che inducono la produzione massiccia dovrebbero essere ricercati tra quelli coinvolti nella regolazione del metabolismo del carbonio.

## RIASSUNTO

Alcune specie di alghe unicellulari sono capaci di accumulare grandi quantità di lipidi che possono essere utilizzati per la produzione di biodiesel. Questa è una interessante prospettiva per lo sviluppo di combustibili alternativi alle fonti fossili. Tuttavia, i sistemi di coltivazione delle alghe su larga scala attualmente disponibili sono ancora poco efficienti e sono necessari ulteriori sforzi di ricerca per rendere la produzione di biocombustibili da alghe una solida realtà.

La luce fornisce tutta l'energia necessaria per supportare il metabolismo delle alghe e per questa ragione l'efficienza di utilizzo della radiazione luminosa è uno dei fattori fondamentali che determina la produttività delle coltivazioni di alghe. In questo capitolo sono riviste le informazioni più recenti sull'influenza dell'illuminazione sulla crescita e la produzione di lipidi nelle microalghe. L'attenzione è focalizzata sulle specie appartenenti al genere *Nannochloropsis* che stanno emergendo come modelli per questo tipo di applicazioni grazie alla loro elevata produttività. *Nannochloropsis* è capace di crescere in condizioni di illuminazione molto diverse, caratteristica importante per le crescita in campo. Oltre all'effetto sulla crescita è stato analizzata anche l'influenza dell'illuminazione sull'accumulo di lipidi: l'intensità della radiazione non regola direttamente la loro biosintesi ma ha ugualmente una forte influenza se combinata con altri fattori quali una elevata disponibilità di anidride carbonica.

#### ABSTRACT

Some species of unicellular algae are capable of accumulating large amount of lipids which can be exploited for the production of biodiesel. Their exploitation is highly interesting in the perspective of replacing at least partially fossil fuels. Unfortunately, algae large scale cultivation systems are still largely inefficient and strong research efforts are necessary to develop competitive production of biofuels from algae.

One of the major factors influencing algae growth is light which provides all the energy supporting metabolism. For this reason a high light use efficiency is seminal for developing any competitive algae cultivation system. In this chapter the most recent work on the influence of illumination environment on algae growth and lipids production is reviewed, focusing in particular on the species belonging to the genus *Nannochloropsis*, which are emerging as models for this kind of applications thanks to their remarkable productivity. *Nannochloropsis* showed the ability of growing efficiently under a wide range of illumination conditions, a fundamental property in the perspective of cultivation in outdoor photobioreactors. Light intensity do not directly influence lipids biosynthesis but it plays a strong indirect role when combined with other factors like increased carbon dioxide supply.

#### BIBLIOGRAFIA

- AMARO H.M., GUEDES A.C., MALCATA F.X. (2011): *Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel*, «Applied Energy», 88, pp. 3402-3410.
- BALLOTTARI M., DALL'OSTO L., MOROSINOTTO T., BASSI R. (2007): *Contrasting behavior of higher plant photosystem I and II antenna systems during acclimation*, «Journal of Biological Chemistry», 282, pp. 8947-8958.
- BAKER N.R. (2008): *Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo*, «Annual Review of Plant Biology», 58, pp. 89-113.
- BHOLA V., DESIKAN R., SANTOSH S.K., KARTHIKEYAN S., SANNIYASI E., BUX F. (2011): *Effects of parameters affecting biomass yield and thermal behaviour of Chlorella vulgaris*, «Journal of Bioscience and Bioengineering», 111, pp. 377-382.
- BOUSSIBA S., VONSHAK A., COHEN Z., AVISSAR Y., RICHMOND A. (1987): *Lipid and*

- biomass production by the halotolerant microalga Nannochloropsis salina*, «Biomass», 12, pp. 37-47.
- BRAUTIGAM K., DIETZEL L., STROHER E., WORMUTH D., DIETZ K.J., RADKE., WIRTZ M.M., HELL R., DORMANN P., NUNES-NESE A., SCHAUER N., FERNIE A.R., OLIVER S.N., GEIGENBERGER P., LEISTER D., PFANNSCHMIDT T. (2009): *Dynamic plastid redox signals integrate gene expression and metabolism to induce distinct metabolic states in photosynthetic acclimation in Arabidopsis*, «Plant Cell», 21, pp. 2715-2732.
- CHISTI Y. (2007): *Biodiesel from microalgae*, «Biotechnology Advertising», 25, pp. 294-306.
- CHISTI Y., YAN J. Y. (2011): *Energy from algae: current status and future trends*, «Applied Energy», 88, pp. 3277-3279.
- DAMIANI M.C., POPOVICH C.A., CONSTELA D., LEONARDI P.I. (2010): *Lipids analysis in Haematococcus pluvialis to assess its potential use as a biodiesel feedstock*, «Bioresource Technology», 101, pp. 3801-3807.
- DISMUKES G.C., CARRIERI D., BENNETTE N., ANANYEV G.M., POSEWITZ M.C. (2008): *Acquatic phototrophs: efficient alternative to land-based crops for biofuels*, «Current Opinions in Biotechnology», 19, pp. 235-240.
- EBERHARD S., FINAZZI G., WOLLMAN F.A. (2008): *The dynamics of photosynthesis*, «Annual review of Genetics», 46, pp. 463-515.
- FALKOWSKY P.G., LA ROCHE J. (1991): *Acclimation to spectral irradiance in algae*, «Journal of Phycology», 27, pp. 8-14.
- FALKOWSKY P.G., OWENS T.G. (1980): *Light-shade adaptation: two strategies in marine phytoplankton*, «Plant Physiology», 66, pp. 592-595.
- FISHER T., BERNER T., ILUZ D., DUBINSKY Z. (1998): *The kinetics of the photoacclimation response of Nannochloropsis sp. (Eustigmatophyceae): a study of changes in ultrastructure and PSU density*, «Journal of Phycology», 34, pp. 818-824.
- GORDON J.M., POLLE J.E. (2007): *Ultrahigh bioproductivity from algae*, «Applied Microbiology and Biotechnology», 76, pp. 969-975.
- GOUVEIA L., OLIVEIRA A.C. (2009): *Microalgae as a raw material for biofuels production*, «Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology», 36, pp. 269-274.
- GROBBELAAR J.U. (2010): *Microalgal biomass production: challenges and realities*, «Photosynthesis Research», 106, pp. 135-144.
- HANNON M., GIMPEL J., TRAN M., RASALA B., MAYFIELD S. (2010): *Biofuels from algae: challenges and potential*, «Biofuels», 1, pp. 763-784.
- HODGSON P.A., HENDERSON R.J., SARGENT J.R., LEFTLEY J.W. (1991): *Patterns of variations in the lipid class and fatty acid composition of Nannochloropsis oculata (Eustigmatophyceae) during batch culture. 1. the growth cycle*, «Journal of Applied Phycology», 3, pp. 169-181.
- HU Q., SOMMERFELD M., JARVIS E., GHIRARDI M., POSEWITZ M., SEIBERT M., DARZINS A. (2008): *Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuels production: perspectives and advances*, «Plant Journal», 54, pp. 621-639.
- JEONG G.T., PARK D.H., KANG C.H., LEE W.T., SUNWOO C.S., YOON C.H., CHOI B.C., KIM H.S., KIM S.W., LEE U.T. (2004): *Production of biodiesel fuel by transesterification of rapeseed oil*, «Applied Biochemistry and Biotechnology», 113-116, pp. 747-758.
- KILIAN O., BENEMANN C.S., NIYOGI K.K., VICK B. (2011): *High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga Nannochloropsis sp.*, «Proceedings of the National Academy of Sciences, USA», 108, pp. 21265-21269.
- KIM C., MESKAUSKIENE R., APEL K., LALOI C. (2008): *No single way to understand singlet oxygen signalling in plants*, «EMBO Reports», 9, pp. 435-439.

- KIM Z.H., KIM S.H., LEE H.S., LEE C.G. (2006): *Enhanced production of astaxanthin by flashing light using Haematococcus pluvialis*, «Enzyme and Microbial Technology», 39, pp. 414-419.
- KULHEIM C., AGREN J., JANSSON S. (2002): *Rapid regulation of light harvesting and plant fitness in the field*, «Science», 297: 91-93.
- LI Z., WAKAO S., FISCHER B.B., NIYOGI K.K. (2009): *Sensing and responding to excess light*, «Annual Review of Plant Biology», 60, pp. 239-260.
- MALCATA F.X. (2011): *Microalgae and biofuels: a promising partnership?*, «Trends in Biotechnology», 29, pp. 542-549.
- MATTHIJS H.C., BALKE H., VAN HES U.M., KROON B.M., MUR L.R., BINOT R.A. (1996): *Application of light-emitting diodes in bioreactors: flashing light effects and energy economy in algal culture (Chlorella pyrenoidosa)*, «Biotechnology and Bioengineering», 50, pp. 98-107.
- MAXWELL K., JOHNSON G.N. (2000): *Chlorophyll fluorescence – a practical guide*, «Journal of Experimental Botany», 51, pp. 569-580.
- MOLINA G.E., ROBLES M.A., GIMENEZ G.A., SANCHEZ P.J., GARCIA-CAMACHO F., GARCIA SANCHEZ J.L. (1994): *Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass*, «Journal of the American Oil Chemists Society», 71, pp. 955-959.
- NIXON P.J., MICHOUX F., YU J., BOEHM M., KOMENDA J. (2010): *Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II*, «Annals of Botany», 106, pp. 1-16.
- PEERS G., TRUONG T.B., OSTENDORF E., BUSCH A., ELRAD D., GROSSMAN A. R., HIPPLER M., NIYOGI K.K. (2009): *An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis*, «Nature», 462, pp. 518-521.
- PHILIPS J.N., MYERS J. (1954): *Growth rate of Chlorella in flashing light*, «Plant Physiology», 29, pp. 152-161.
- RADAKOWITS R., JINKERSON R.E., FUERSTENBERG S.I., TAE H., SETTLAGE R.E., BOORE J.L., POSEWITZ M.C. (2012): *Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga Nannochloropsis gaditana*, «Nature Communications», 3, pp. 686.
- RODOLFI L., CHINI Z.G., BASSI N., PADOVANI G., BIONDI N., BONINI G., TREDICI M.R. (2009): *Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low cost photobioreactor*, «Biotechnology and Bioengineering», 102, pp. 100-112.
- SFORZA E., BERTUCCO A., MOROSINOTTO T., GIACOMETTI G. M. (2010): *Vegetal oil from microalgae: species selection and optimization*, «Chemical Engineering Transactions», Conference Proceeding.
- SFORZA E., SIMIONATO D., BERTUCCO A., GIACOMETTI G.M., MOROSINOTTO T. (2012): *Adjusted light and dark cycles can optimize photosynthetic efficiency in algae growing in photobioreactors*, «PLOS ONE», in press.
- SIMIONATO D., SFORZA E., CORTEGGIANI C.E., BERTUCCO A., GIACOMETTI G.M., MOROSINOTTO T. (2011): *Acclimation of Nannochloropsis gaditana to different illumination regimes: effects on lipids accumulation*, «Bioresource Technology», 102, pp. 6026-6032.
- SINGH A., NIGAM P.S., MURPHY J.D. (2011): *Renewable fuels from algae: an answer to debatable land based fuels*, «Bioresource Technology», 102, pp. 10-16.
- SOLOVCHENKO A., KHOZIN-GOLDBERG I., RECHT L., BOUSSIBA S. (2011): *Stress-induced changes in optical properties, pigment and fatty acid content of Nannochloropsis sp.: implications for non-destructive assay of total fatty acids*, «Marine Biotechnology», 13, pp. 527-535.

- TAKESHITA T. (2011): *Competitiveness, role and impact of microalgal biodiesel in the global energy future*, «Applied Energy», 88, pp. 3481-3491.
- TERRY K.L. (1986): *Photosynthesis in modulated light: quantitative dependence of photosynthetic enhancement on flashing rate*, «Biotechnology and Bioengineering», 28, pp. 988-995.
- VEJRAZKA C., JANSSEN M., STREETFLAND M., WIJFFELS R.H. (2011): *Photosynthetic efficiency of Chlamydomonas reinhardtii in flashing light*, «Biotechnology and Bioengineering», 108, pp. 2905-2913.
- WALTERS R.G. (2005): *Towards an understanding of photosynthetic acclimation*, «Journal of Experimental Botany», 56, pp. 435-447.
- XUE S., SU Z., CONG W., (2011): *Growth of Spirulina platensis enhanced under intermittent illumination*, «Biotechnology», 151, pp. 271-277.
- ZOU N., RICHMOND A. (2000): *Light-path length and population density in photoacclimation of Nannochloropsis sp. (Eustigmatophyceae)*, «Journal of Applied Phycology», 12, pp. 349-354.



## Assorbimento della luce, fotoprotezione e fotosintesi artificiale

### FOTOSINTESI NATURALE E ARTIFICIALE

Il sole rappresenta la più abbondante sorgente di energia a disposizione del nostro pianeta. Tuttavia, per essere utilizzata, l'energia solare deve venir convertita in qualche forma utile come calore, elettricità o combustibile. Particolare interesse a livello di tecnologie da sviluppare per lo sfruttamento dell'energia solare, è rivolto oggi all'ottenimento di combustibili. Questi, rispetto alle tecnologie energetiche attualmente disponibili e ben sviluppate, quali il solare termico e fotovoltaico, offrirebbero infatti il vantaggio di rappresentare forme di energia a elevata concentrazione con possibilità di stoccaggio, trasporto etc. Un approccio adottato dalla ricerca attuale è quello di ispirarsi alla fotosintesi naturale per costruire sistemi artificiali di conversione dell'energia solare in combustibile. Infatti, come è noto, la fotosintesi naturale è un convertitore perfetto di energia solare in energia chimica sottoforma di carboidrati.

Le fasi principali della fotosintesi ossigenica che si svolgono alla luce avvengono nei tilacoidi dei cloroplasti a opera dei complessi multiproteici, fotosistema I (PSI) e II (PSII). Gli stadi iniziali del processo comportano l'assorbimento della luce solare da parte dei cosiddetti complessi antenna (LHC), il successivo trasferimento dell'eccitazione ai complessi dei centri di reazione (RC) dove l'eccitazione viene convertita in separazione di carica tra coppie molecolari donatore (+)-accettore (-). Le lacune a carica positiva vengono neutralizzate nel PSII mediante gli elettroni provenienti dall'ossidazione dell'acqua, a opera del cluster catalitico  $\text{Mn}_4\text{Ca}$ , che è il "cuore" del cosiddetto complesso OEC ("Oxygen Evolving Complex"). Le cariche negative e i protoni prodotti

\* *Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Padova*

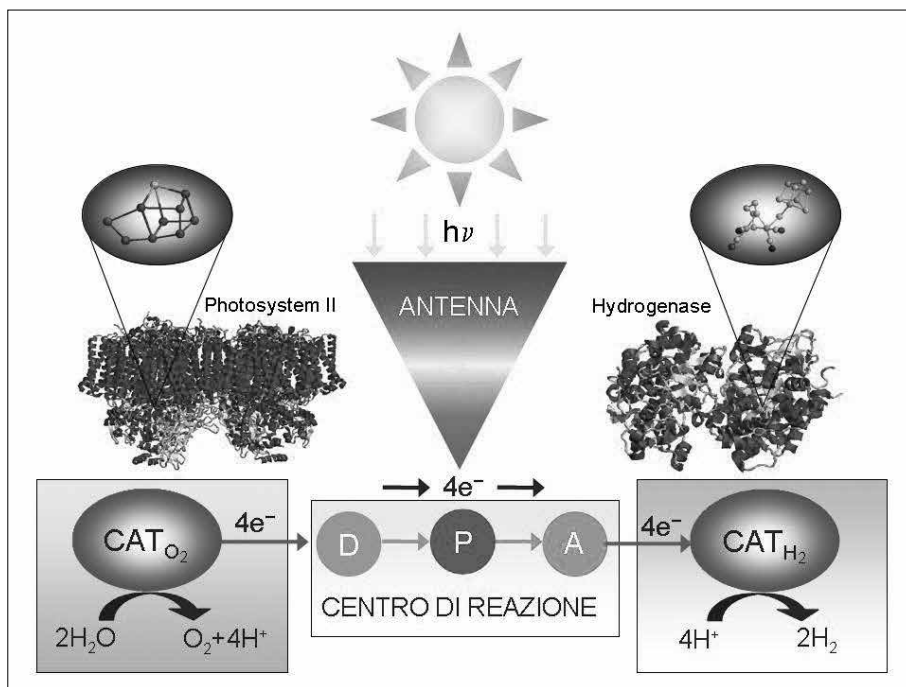


Fig. 1 Schema modulare della fotosintesi artificiale ispirata alla fotosintesi naturale. Sono evidenziati nelle strutture del PSII e dell'enzima idrogenasi i siti attivi che costituiscono le basi per i modelli di catalizzatori artificiali

dall'ossidazione dell'acqua vengono trasferiti al PSI e da ultimo utilizzati per produrre NADPH e ATP. Questi composti verranno sfruttati nella fase al buio della fotosintesi per fissare la  $CO_2$  e produrre zuccheri (il carburante biochimico utilizzato da cellule e organismi). È interessante notare come il potere riducente fotosintetico possa anche venire utilizzato da microalghe e cianobatteri per produrre transitoriamente idrogeno molecolare ( $H_2$ ) a partire da protoni, in un processo catalizzato dall'enzima *idrogenasi*. L'energia solare unita all'ossidazione dell'acqua può essere, quindi, immagazzinata dagli organismi fotosintetici nei legami chimici di carboidrati o addirittura, in condizioni particolari, come gas idrogeno.

La "macchina molecolare" naturale può considerarsi perfetta per l'alta resa di conversione luce-energia chimica ma anche per la capacità di fotoprotezione e riparazione necessarie per limitare i danni che sono legati a una fonte molto variabile e intermittente di fotoni, quale è il sole, e alla inevitabile produzione di fotoprodotto di ossidazione in condizioni di stress luminoso.

L'imitazione del processo di fotosintesi naturale ha dato vita a un filone

di ricerca per la fotosintesi artificiale basato su una sorta di lego chimico atto a riprodurre i vari stadi della fotosintesi con l'intento finale di produrre un combustibile più utilizzabile dei carboidrati, quale l'idrogeno molecolare o altri composti organici ottenibili dalla riduzione dell'anidride carbonica (per compendi recenti sull'argomento si veda: (Balzani et al., 2008; Barber, 2009; Cook et al., 2010; Lubitz et al., 2008)).

I moduli ispirati alla fotosintesi naturale da sviluppare sono schematizzati in figura 1, dove viene anche messa in rilievo l'analogia con i fotosistemi naturali.

#### 1) *Sistemi antenna:*

si tratta di sistemi molecolari in grado di assorbire fotoni con efficienza in un ampio spettro di luce visibile e in grado di incanalare l'eccitazione verso i centri fotochimici. Nelle antenne fotosintetiche naturali, i pigmenti sono principalmente rappresentati da molecole di clorofilla e carotenoidi legati in modo non covalente alle proteine. Nella progettazione di sistemi antenna artificiali le porfirine (simili alle clorofille) sono state ampiamente utilizzate. Dai primi dimeri di porfirine si è passati successivamente a "cluster", polimeri e dendrimeri (Gust et al., 2012). Strutture ad anello ispirate alle antenne fotosintetiche batteriche, sono state proposte con diversi tipi di elementi chimici (Balzani et al., 2008). Molte di queste architetture macromolecolari forniscono un assorbimento esteso e attuano un trasferimento di energia direzionale ed efficiente, dalla periferia al centro come avviene nei sistemi naturali.

#### 2) *Centri di reazione:*

rappresentano dispositivi fotovoltaici su scala nanometrica. Un donatore eccitato, direttamente o per trasferimento di energia dall'antenna, trasferisce un elettrone a un accettore, generando in tal modo uno stato a carica separata con conseguente conversione di energia luminosa in potenziale elettrochimico. Questi stati a carica separata devono avere la caratteristica di possedere da un lato sufficiente potere ossidante, in modo da estrarre elettroni dall'acqua, e dall'altro elevato potere riducente, in modo da consentire la produzione del combustibile ridotto, e inoltre devono resistere alla ricombinazione di carica abbastanza a lungo in modo tale da permettere l'interfacciamento con i siti catalitici per la produzione di carburante. Centri di reazione artificiali sono stati ottenuti legando covalentemente tra loro i donatori e gli accettori di elettroni in diadi e triadi molecolari. Il donatore principalmente utilizzato è una porfirina, che ricorda il donatore primario del PSII che è costituito da molecole di clorofilla, e l'accettore primario è spesso ancora una porfirina, un chinone, o la molecola di fullerene. Il gruppo di D. Gust, Ana e Thomas Moore, con cui da anni abbiamo una collaborazione per la caratterizzazione

spettroscopica dei centri di reazione artificiali, ha molto utilizzato i fullereni, che hanno infatti dimostrato di essere buoni accettori di elettroni nel processo di separazione di carica (per una panoramica dei sistemi si veda: (Gust et al., 2012)). Mediante studi di risonanza magnetica di spin elettronico risolta nel tempo (TR-EPR) abbiamo caratterizzato l'efficienza del processo primario, in alcuni di questi centri di reazione, in termini di accoppiamento elettronico tra donatore e accettore (Di Valentin et al., 2004; Di Valentin et al., 2005a; Di Valentin et al., 2005b; Di Valentin 2006). Un miglioramento dell'efficienza della separazione di carica è stato raggiunto con una configurazione "multi-step" simile a quanto avviene nei centri di reazione naturali. Sono state sintetizzate serie di triadi, tetradi e pentadi molecolari, in grado di dare successive reazioni di trasferimento di carica consentendo di separare spazialmente elettrone e lacuna e aumentare in tal modo la durata dello stato a carica separata (Gust et al., 2012).

### 3) *Catalizzatori per l'ossidazione dell'acqua e per la produzione dell'idrogeno*

In natura, gli equivalenti ossidanti creatisi nel centro di reazione per effetto dell'assorbimento di luce, vengono utilizzati per estrarre elettroni dall'acqua nel complesso catalitico OEC in cui il cluster  $Mn_4Ca$ , dopo aver accumulato quattro equivalenti ossidanti, promuove la dissociazione di due molecole di acqua a ossigeno molecolare e protoni. Dal lato riducente l'*idrogenasi*, è un enzima potenzialmente in grado di catalizzare la reazione di riduzione di protoni a idrogeno molecolare. Il sito attivo dell'enzima comprende, a seconda del tipo di *idrogenasi*, un centro mononucleare o binucleare di ferro oppure un centro binucleare ferro-nichel.

I siti catalitici dei due enzimi stanno ispirando la sintesi di complessi organometallici di vario tipo. Entrambi i processi richiedono infatti efficienti sistemi catalitici, che devono svolgere difficili reazioni a molti elettroni e a potenziali redox molto elevati. I catalizzatori chimici più comuni per la riduzione dei protoni a idrogeno molecolare sono basati su (costosi) metalli nobili. Poiché l'enzima *idrogenasi* richiede solo centri metallici di ferro e nichel, il sito attivo è diventato fonte d'ispirazione per la progettazione di catalizzatori sintetici più sostenibili. I risultati sono promettenti e alcuni di questi complessi metallici "biomimetici" hanno dimostrato un comportamento catalitico corretto (Lubitz et al., 2008). Tuttavia la resa catalitica e la stabilità del catalizzatore rimangono problemi ancora da risolvere.

La maggior parte dei catalizzatori per l'ossidazione acqua sono a base dei metalli rutenio o iridio. Entrambi questi metalli sono rari, costosi e tossici e quindi non adatti per applicazioni pratiche in larga scala. Un catalizzatore "biomimetico" a base di manganese, come l'OEC della fotosintesi naturale,

non è stato ancora ottenuto. I complessi catalitici prodotti fino ad ora sono di fatto caratterizzati da una notevole instabilità chimica.

Come ulteriore passo nella progettazione del sistema fotosintetico artificiale, ciascuno dei due catalizzatori deve essere incorporato in un gruppo molecolare o su una superficie di elettrodo, per essere integrato con gli altri elementi funzionali (antenna e centri di reazione). Benché siano stati raggiunti degli obiettivi importanti nella “biomimesi” dei processi, vi sono ancora vari problemi da risolvere nell’ottenimento di un sistema completo ed efficiente nella resa di conversione fotochimica. Tra questi i principali sono l’ottenimento di un’elevata resa quantica della separazione di carica e di una durata sufficientemente lunga dello stato a carica separata che ne consenta l’accoppiamento con i catalizzatori, le variazioni di intensità dell’illuminazione naturale, l’integrazione dei vari componenti e la fotostabilità dei componenti. Quest’ultimo aspetto ci introduce al capitolo relativo alla fotoprotezione, che nei sistemi fotosintetici naturali prevede diversi livelli e meccanismi di azione. La mimesi ispirata ai sistemi naturali, relativamente a questo importante aspetto, è infatti solo agli inizi.

#### FOTOPROTEZIONE

Nei complessi proteici antenna, l’assorbimento della luce provoca l’eccitazione dello stato di singoletto dei pigmenti, principalmente della clorofilla (Chl). In condizioni di bassa illuminazione, tutta l’energia di eccitazione viene trasferita in modo efficiente ai centri di reazione, dove viene convertita in energia chimica. I sistemi antenna estesi che si riscontrano nei fotosistemi naturali sono particolarmente adatti a un assorbimento efficiente in condizioni limitanti di luce, ma possono rappresentare un problema quando la luce assorbita è in eccesso rispetto alla capacità di conversione fotochimica dei centri di reazione. Infatti, in tali condizioni, nei complessi antenna la popolazione stazionaria di clorofilla eccitata in stato di singoletto ( $^1\text{Chl}^*$ ) aumenta. Come conseguenza, la probabilità di intersystem crossing agli stati di tripletto di Chl ( $^3\text{Chl}^*$ ) diventa maggiore. Gli stati  $^3\text{Chl}^*$  risultano particolarmente pericolosi in quanto promuovono la formazione di ossigeno di singoletto ( $^1\text{O}_2$ ), una specie altamente ossidante, potenzialmente dannosa per l’apparato fotosintetico (Demmig-Adams e Adams, 1992; Barber e Andersson, 1992; Krieger-Liszkay, 2005). Lo stress ossidativo che si genera dall’assorbimento di energia luminosa in eccesso ha portato allo sviluppo, nei fotosistemi naturali, di meccanismi di fotoprotezione (Ruban et al., 2012). Questi meccanismi

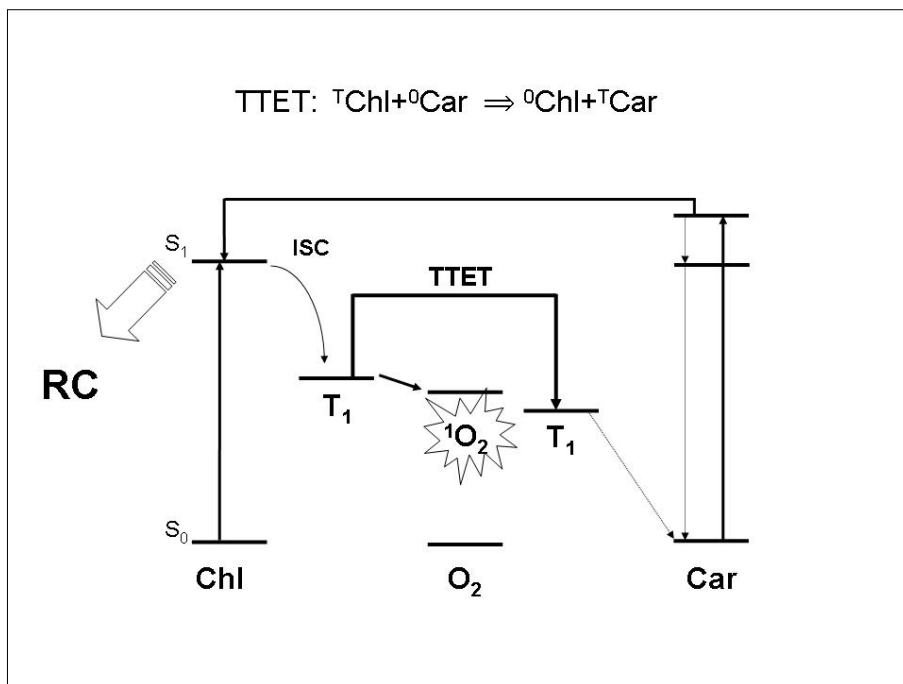


Fig. 2 Schema dei livelli energetici di clorofilla e carotene e processi di trasferimento di energia tra stati di singoletto e tra stati di tripletto (TTET). È anche evidenziato il cammino di produzione di ossigeno di singoletto

hanno come scopo la disattivazione, o “quenching”, degli stati direttamente responsabili della produzione di  $^1O_2$ , vale a dire gli stati di tripletto o di singoletto eccitato delle clorofilla.

1) “Quenching” dello stato di tripletto della clorofilla a opera dei carotenoidi

Il “quenching” diretto degli stati  ${}^3Chl^*$  e dell’ossigeno di singoletto è costitutivamente fornito dai carotenoidi, molecole non covalentemente legate alle proteine antenna che hanno anche la funzione di assorbire energia nella regione spettrale poco coperta dall’assorbimento delle clorofille e di trasferire a queste l’eccitazione di singoletto. Il meccanismo di “quenching” avviene con trasferimento di energia tripletto-tripletto (TTET), dagli stati di tripletto della clorofilla a quelli dei carotenoidi ( ${}^3Car^*$ ), come schematizzato in figura 2.

Poiché gli stati di tripletto dei carotenoidi giacciono in energia sotto il livello dell’ossigeno di singoletto ( $^1O_2$ ), essi, una volta popolatisi, decadono direttamente allo stato fondamentale preservando in tal modo il fotosistema da possibili danni ossidativi. Il processo TTET si svolge attraverso un mecca-

nismo di scambio elettronico che dipende dalla sovrapposizione degli orbitali elettronici del donatore e dell'accettore che devono pertanto essere in stretto contatto tra loro. Infatti l'efficienza del trasferimento diminuisce in modo esponenziale con la distanza accettore-donatore ed è anche funzione della loro orientazione relativa. I requisiti geometrici sono garantiti dal legame dei pigmenti con la matrice proteica.

Un aspetto della ricerca, relativo al processo in esame e che ci ha visti coinvolti in anni recenti, è rivolto a individuare le strategie molecolari messe a punto nei vari sistemi antenna di diversi organismi fotosintetici, per ottenere un TTET efficiente. Lo stato di tripletto è, a causa dello spin ( $S=1$ ) associato agli elettroni spaiati, uno stato paramagnetico, pertanto la spettroscopia di risonanza magnetica di spin elettronico (EPR), in particolare nelle varianti risolta nel tempo (TR-EPR) e impulsata (FT-EPR), risulta essere tecnica d'elezione nello studio del processo di TTET. Poiché durante il processo di trasferimento di tripletto il momento di spin si conserva, il carotene "eredita" la polarizzazione di spin dalla clorofilla, in un modo che dipende strettamente dall'orientazione molecolare della coppia carotene-clorofilla coinvolta nel trasferimento (Di Valentin et al., 2008a; Di Valentin et al., 2009; Di Valentin et al., 2011). Questo aspetto permette di ricavare informazioni importanti relative alle coppie specifiche Chl-Car interessate al processo fotoprotettivo, in sistemi antenna complessi dove sono presenti molti pigmenti.

Abbiamo effettuato un'analisi comparativa tra due complessi antenna, la proteina PCP (peridinin chlorophyll protein) delle alghe rosse *dinoflagellati* e la proteina LHCII (light harvesting complex II), il principale complesso antenna delle piante superiori. Di queste due proteine è nota la struttura (Hofmann et al., 1996; Liu et al., 2004) e rappresentano due casi di composizione in pigmenti opposti: PCP è ricca in caroteni (rapporto carotene-clorofilla 4:1), mentre LHCII è più ricca in clorofilla (rapporto carotene-clorofilla 4:14). Sulla base del confronto tra i dati spettroscopici EPR e i calcoli della polarizzazione di spin degli spettri, basati sulla conservazione di spin nel processo di TTET e sulla struttura dei complessi proteici, è stato possibile individuare nei due sistemi antenna considerati, le coppie di molecole specificatamente coinvolte nel processo di "quenching" di tripletto (fig. 3) (Di Valentin et al., 2008a; Di Valentin et al., 2009).

Le caratteristiche dei siti di fotoprotezione rivelano che in entrambi le proteine considerate le coppie Chl-Car coinvolte nel TTET sono quelle che presentano la minor distanza centro-centro. Inoltre la coordinazione al Mg della clorofilla, (una molecola d'acqua in PCP e un residuo aminoacidico in LHCII), appare fungere da ponte molecolare nel trasferimento di energia di

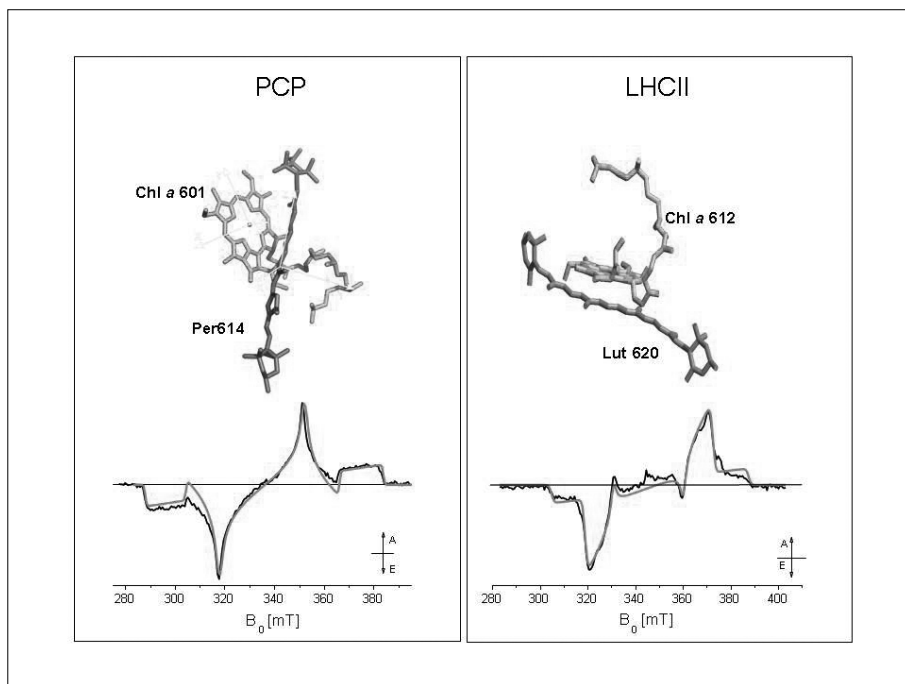


Fig. 3 Coppie clorofilla-peridina e clorofilla-luteina coinvolte nel processo di TTET in PCP e LHCII rispettivamente. Le numerazioni e la nomenclatura si riferiscono alle convenzioni adottate per le strutture dei due complessi. Spettri di tripletto TR-EPR sperimentali (tratto sottile) e simulazioni (tratto spesso) ottenute mediante calcolo del processo TTET per PCP (sinistra) e LHCII (destra)

tripletto. Studi di doppia risonanza elettronica-nucleare (ENDOR) di tripletto, effettuati sui due complessi proteici, hanno infine rivelato che i due caroten (peridina nel caso di PCP, e luteina nel caso di LHCII) presentano forte analogie nella distribuzione elettronica dello stato di tripletto, che appare in entrambi i casi omogeneamente distribuita sull'intera lunghezza del carotene (Di Valentin et al., 2008b).

## 2) "Quenching" dello stato di singoletto eccitato della clorofilla. "Non-Photochemical Quenching (NPQ)"

Anche se il trasferimento di energia tripletto- tripletto tra clorofilla e carotenoidi è un processo generalmente efficiente nelle varie proteine dei complessi antenna, in particolari condizioni di stress luminoso, il meccanismo fotoprotettivo basato sul solo "quenching" degli stati di tripletto risulta insufficiente. In tali condizioni, le piante attivano meccanismi atti a spegnere l'eccitazione già nello stato di singoletto ( $^1\text{Chl}^*$ ). Questo fenomeno, noto



come “Non-Photochemical Quenching (NPQ)”, corrisponde a un canale non-radiativo di disattivazione degli stati eccitati di singoletto che ha luogo in particolare nei complessi antenna del fotosistema II, quando l'energia della luce viene assorbita in eccesso (Ruban et al., 2012). Vi sono varie componenti nel processo NPQ di cui la più rapida prende il nome di qE. Un modello corrente per l'attivazione di NPQ nelle piante lo mette in relazione al fenomeno dell'acidificazione del lume tilacoidale che si produce in eccesso di illuminazione. Il basso pH induce la sintesi di zeaxantina, tramite il ciclo delle xantofille e l'entrata in azione della proteina PSBS. Il risultato è quello di far commutare le proteine da uno stato antenna a uno stato di dissipazione. Malgrado le linee generali del meccanismo del NPQ siano ben delineate, il dibattito sui meccanismi molecolari è ancora molto acceso (si veda per una analisi sistematica dei meccanismi proposti Ruban et al., 2012).

Utilizzando la tecnica di doppia risonanza ODMR (optically detected magnetic resonance), ci siamo posti l'obiettivo di misurare *in vivo* l'efficacia del “quenching” di singoletto, attraverso la misura diretta degli stati di tripletto di clorofilla in condizioni NPQ. Infatti il “quenching” degli stati  $^1\text{Chl}^*$  è stato ampiamente studiato solo mediante misure di fluorescenza, mentre non è noto se i riarrangiamenti strutturali che sono stati ipotizzati in relazione all'instaurarsi dello stato dissipativo siano effettivamente caratterizzati da una bassa resa di tripletto di clorofilla nei vari complessi antenna del fotosistema. Allo stesso tempo, non è noto se la capacità intrinseca di “quenching” di tripletto da parte dei carotenoidi subisca delle variazioni in seguito ai cambiamenti strutturali indotti dal meccanismo di NPQ. Sfruttando la sensibilità e selettività intrinseche alla spettroscopia ODMR, abbiamo cercato di rispondere a queste domande, misurando le popolazioni di tripletto nel muschio *Physcomitrella patens* in condizioni di bassa e alta illuminazione. È noto infatti che la spettroscopia ODMR è particolarmente adatta alla misura di quantità anche molto modeste di stati di tripletto e si è dimostrata una tecnica potente e unica nel consentire l'assegnazione di varie popolazioni di tripletto ( $^3\text{Car}^*$  e  $^3\text{Chl}^*$ ) a siti specifici del fotosistema. Il principio su cui è basata questa tecnica consiste nel indurre transizioni tra sottolivelli di spin elettronico degli stati di tripletto, rivelando gli effetti indiretti prodotti dalla risonanza nelle proprietà ottiche del sistema, quali la fluorescenza o l'assorbimento. La sensibilità della spettroscopia ottica risulta pertanto accoppiata alla selettività della spettroscopia magnetica (per una descrizione dettagliata della tecnica si veda: Carbonera, 2009).

I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'attivazione di NPQ riduce sensibilmente la formazione di stati di tripletto di clorofilla in tutti i complessi antenna, sia periferici che di “core”, e che le variazioni conformazionali asso-

ciate allo stato dissipativo non portano alla formazione di nuovi stati di tripletto di clorofilla in siti interni, esposti o di interfaccia tra diversi complessi antenna, dimostrando così che il controllo sulla formazione di  $^3\text{Chl}^*$  è molto efficiente e che non vi è necessità di modificare la capacità dei carotenoidi a dare TTET nello stato dissipativo (*in press*).

La definizione a livello molecolare dei meccanismi deputati alla fotoprotezione comincia a essere recepito anche dai ricercatori impegnati ne campo della fotosintesi artificiale.

Non solo sono state sintetizzate diadi e triadi molecolari in cui gli stati di tripletto fotoindotti nelle porfirine vengono trasferiti via TTET a molecole di carotene a esse legate (Carbonera et al., 1997a; Carbonera et al., 1997b; Gust et al., 2012), ma anche il “quenching” di singoletto è stato riprodotto in sistemi artificiali a base di ftalocianine e caroteni (Liao et al., 2012). Lo studio del comportamento fotofisico di quest’ultimi ha consentito di proporre tre meccanismi per il possibile “quenching” di singoletto: 1) trasferimento di carica da ftalocianina a carotene seguito da ricombinazione a stato fondamentale; 2) trasferimento di energia allo stato  $S_1$  proibito dei carotenoidi da parte della ftalocianina e susseguente decadimento termico; 3) mescolamento eccitonico tra lo stato di singoletto eccitato di ftalocianina e lo stato  $S_1$  dei carotenoidi. Quale (o quali) di questi meccanismi sia operativo nei sistemi naturali rimane tuttavia da chiarire.

## CONCLUSIONI

Solo recentemente la ricerca di base sulla fotosintesi e la definizione dei meccanismi molecolari che la regolano hanno consentito alla ricerca finalizzata alla fotosintesi artificiale di raggiungere la fase di maturità che permetterà di integrare i singoli elementi sviluppati in un sistema complesso per la produzione di combustibile a partire dall’energia solare.

In questa prospettiva, le strategie future per la fotosintesi artificiale dovranno includere la mimesi della fotosintesi naturale non solo a livello di organizzazione supramolecolare, ma anche relativamente ai processi di fotoprotezione che potranno consentire alle macchine molecolari per la conversione di energia di resistere alle fotoossidazioni.

## RIASSUNTO

Un approccio adottato nella ricerca per lo sfruttamento dell’energia solare è quello che s’ispira alla fotosintesi naturale per costruire sistemi artificiali di conversione dell’energia

solare in combustibile. La fotosintesi artificiale si basa su una sorta di lego chimico atto a riprodurre i vari stadi della fotosintesi producendo da ultimo un combustibile più utilizzabile dei carboidrati, quale ad esempio idrogeno. Malgrado siano stati raggiunti degli obiettivi importanti nella "biomimesi" dei processi, vi sono ancora vari problemi da risolvere nell'ottenimento di un sistema completo ed efficiente nella resa di conversione fotochimica. Tra questi i principali sono l'integrazione dei vari elementi e la fotostabilità, spesso minata dalla fotoossidazione dei componenti che si genera a partire dagli stati di tripletto dei vari fotorecettori. Nei sistemi fotosintetici naturali la fotoprotezione prevede diversi livelli e meccanismi di azione, attualmente oggetto di intenso studio. La mimesi ispirata ai sistemi naturali, relativamente a questo importante aspetto, è ancora solo agli inizi, ma ci si aspetta che possa fornire in futuro elementi importanti per la durata dei sistemi artificiali.

#### ABSTRACT

An approach adopted in the research field of solar energy conversion is that inspired by natural photosynthesis. The artificial photosynthesis is based on a kind of chemical "lego" adapted to reproduce the various stages of photosynthesis and produce a sustainable fuel, such as molecular hydrogen. In spite of the important objectives achieved in the "bio-mimetic" process, there are still several problems to be solved. The main ones are the integration of the various components developed and their photo-stability. Natural photosynthetic systems have developed several different photoprotection mechanisms, which are currently the subject of intense study. Mimesis inspired by natural systems, with regard to this important aspect, is at the beginning but it is expected to provide in the next future important improvement of the lifetime of the artificial devices.

#### BIBLIOGRAFIA

- BALZANI V., CREDI A., VENTURI M. (2008): *Photochemical Conversion of Solar Energy*, «ChemSusChem», 1, pp. 26-58.
- BARBER J., ANDERSSON B., (1992). *Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis*, «Trends in Biochemical Sciences», 17, pp. 61-66.
- BARBER J. (2009): *Photosynthetic energy conversion: natural and artificial*, «Chemical Society Reviews», 38, pp. 185-196.
- CARBONERA D., DI VALENTIN M., AGOSTINI G., GIACOMETTI G., LIDDEL P.A., GUST D., MOORE A.L., MOORE T.A., (1997a): *Energy transfer and Spin polarization of the Carotenoid Triplet State in Synthetic Carotenopotphyrin Dyads and in Natural Antenna Complexes*, «Applied Magnetic Resonance », 13, pp. 487-504.
- CARBONERA D., DI VALENTIN M., CORVAJA C., AGOSTINI G., GIACOMETTI G., LIDDEL P.A., KUCIAUSKAS D., MOORE A.L., MOORE T.A., GUST D., (1997b): *Carotenoid triplet detection by time-resolved EPR spectroscopy in carotenopyropheophorbide dyads*, «Journal of Photochemistry and Photobiology», 105, pp. 329-335.
- CARBONERA D. (2009): *Optically detected magnetic resonance (ODMR) of photoexcited triplet states*, «Photosynthesis Research», 102, pp. 403-414.

- COOK T.R., DOGUTAN D.K., REECE S.Y., SURENDRANATH Y., TEETS T.S., NOCERA D.G. (2010): *Solar Energy Supply and Storage for the Legacy and Nonlegacy Worlds*, «Chemical Reviews», 110, pp. 6474-6502.
- DEMMIG-ADAMS B., ADAMS W.W. (1992): *Photoprotection and Other Responses of Plants to High Light Stress*, «Annual Review of Plant Physiology», 43, pp. 599-626.
- DI VALENTIN M., BISOL A., FUHS M., LIDDELL P.A., MOORE A.L., MOORE T.A., GUST D., CARBONERA D. (2004): *Photochemistry of artificial photosynthetic reaction centers in liquid crystals probed by multifrequency EPR (9.5 and 95 GHz)*, «Journal of the American Chemical Society», 126, pp. 17074-17086.
- DI VALENTIN M., BISOL A., AGOSTINI G., LIDDELL P.A., KODIS G., MOORE A.L., MOORE T.A., GUST D., CARBONERA D. (2005a): *Photoinduced Long-Lived Charge Separation in a Tetrathiafulvalene-Porphyrin-Fullerene Triad Detected by Time-Resolved Electron Paramagnetic Resonance*, «Journal of Physical Chemistry B», 109, pp. 14401-14409.
- DI VALENTIN M., BISOL A., AGOSTINI G., CARBONERA D. (2005b): *Electronic coupling effects on photoinduced electron transfer in carotene-porphyrin-fullerene triads detected by time-resolved EPR*, «Journal of Chemical Information modeling», 45, pp. 1580-1588.
- DI VALENTIN M., BISOL A., AGOSTINI G., MOORE A.L., MOORE T.A., GUST D., PALACIOS R.E., GOULD S.L., CARBONERA D. (2006): *Time-resolved EPR investigation of charge recombination to a triplet state in a carotene-diporphyrin triad*, «Molecular Physics» 104, pp. 1595-1607.
- DI VALENTIN M., CEOLA S., SALVADORI E., AGOSTINI G., CARBONERA D. (2008a): *Identification by time-resolved EPR of the peridinin directly involved in chlorophyll triplet quenching in the peridinin-chlorophyll a-protein from Amphidinium carterae*, «Biochimica et Biophysica Acta», 1777, pp. 186-195.
- DI VALENTIN M., CEOLA S., AGOSTINI G., GIACOMETTI G.M., ANGERHOFER A., CRESCENZI O., BARONE V., CARBONERA D. (2008b): *Pulse ENDOR and density functional theory on the peridinin triplet state involved in the photo-protective mechanism in the peridinin-chlorophyll a-protein from Amphidinium carterae*, «Biochimica et Biophysica Acta», 1777, pp. 295-307.
- DI VALENTIN M., BIASIBETTI F., CEOLA S., CARBONERA D. (2009): *Identification of the Sites of Chlorophyll Triplet Quenching in Relation to the Structure of LHC-II from Higher Plants. Evidence from EPR Spectroscopy*, «Journal of Physical Chemistry B», 113, pp. 13071-13078.
- DI VALENTIN M., TAIT C., SALVADORI E., CEOLA S., SCHEER H., HILLER R.G., CARBONERA D. (2011): *Conservation of Spin Polarization during Triplet-Triplet Energy Transfer in Reconstituted Peridinin-Chlorophyll-Protein Complexes*, «Journal of Physical Chemistry B», 115, pp. 13371-13380.
- GUST D., MOORE T.A., MOORE A.L. (2012): *Realizing Artificial Photosynthesis*, «Faraday Discussions», 155, pp. 9-26.
- HOFMANN E., WRENCH P.M., SHARPLES F.P., HILLER R.G., WELTE W., DIEDERICH K. (1996): *Structural basis of light harvesting by carotenoids: Peridinin-chlorophyll-protein from Amphidinium carterae*, «Science» 272, pp. 1788-1791.
- KRIEGER-LISZKAY A. (2005): *Singlet oxygen production in photosynthesis*, «Journal of Experimental Botany», 56, pp. 337-346.
- LIAO P., PILLAI S., KLOZ M., GUST D., MOORE A.L., MOORE T.A., KENNIS J.T.M., VAN GRONDELLE R., WALLA P.J. (2012): *On the role of excitonic interactions in carotenoid-phthalocyanine dyads and implications for photosynthetic regulation*, «Photosynthesis Research», 111, pp. 237-243.
- LIU Z., YAN H., WANG K., KUANG T., ZHANG J., GUI L., AN X., CHANG W. (2004):

- Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution*, «Nature», 428, pp. 287-292.
- LUBITZ W., REIJERSE E.J., MESSINGER J. (2008): *Solar water-splitting into  $H_2$  and  $O_2$ : design principles of photosystem II and hyd rogenases*, «Energy & Environmental Science», 1, pp. 15–31.
- RUBAN A.V., JOHNSON M.P., DUFFY C.D.P. (2012): *The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna.*, «Biochimica et Biophysica Acta», 1817, pp. 167-81.



## Trasporto di Elettroni Secondario nel centro di reazione del Fotosistema I: descrizione delle cinetiche di ossidazione dei fillochinoni legati alle subunità PsaA e PsaB

### I. PANORAMICA DELLA STRUTTURA DEL FOTOSISTEMA I

I fotosistemi sono grandi complessi macromolecolari composti da molte subunità proteiche, alcune delle quali legano pigmenti e altri gruppi prostetici e al cui interno avvengono le reazioni che portano alla conversione dell'energia primaria per via fotochimica. Nella fotosintesi ossigenica due di tali complessi, chiamati fotosistema II (PSII) e fotosistema I operano in serie. Il PS II catalizza l'ossidazione dell'acqua e la riduzione del plastochinone mentre il fotosistema I (PS I) catalizza l'ossidazione della plastocianina, una piccola proteina solubile che agisce come trasportatore di elettroni, e la riduzione della ferredossina. Negli organismi eucariotici, come le piante superiori e le alghe verdi, i fotosistemi sono localizzati nella membrana tilacoidale dei cloroplasti, insieme agli altri complessi attivi nelle reazioni di trasferimento di elettroni fotosintetici, ovvero il citocromo *b<sub>f</sub>* e l'ATPasi/sintasi. Nei procarioti, per esempio nei cianobatteri, i complessi fotosintetici sono localizzati in regioni specializzate della membrana plasmatica che sono anche, per analogia con gli eucarioti, chiamate tilacoidi, ma non hanno la caratteristica struttura morfologica di questi ultimi.

Entrambi i fotosistemi sono funzionalmente organizzati in due unità: il *core* e l'*antenna esterna*. Le reazioni fotochimiche primarie avvengono a livello di alcuni cromofori specializzati e cofattori redox presenti nel core detti *centri di reazione*. D'altra parte, la maggior parte dei pigmenti legati al core ha funzione di raccolta della luce e sono per questo noti collettivamente come antenna interna. L'antenna esterna ha invece solo la funzione di raccolta della luce, e in genere aumenta la probabilità di assorbimento e la gamma di radia-

\* Istituto di Biofisica, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Dipartimento di Biologia, Milano

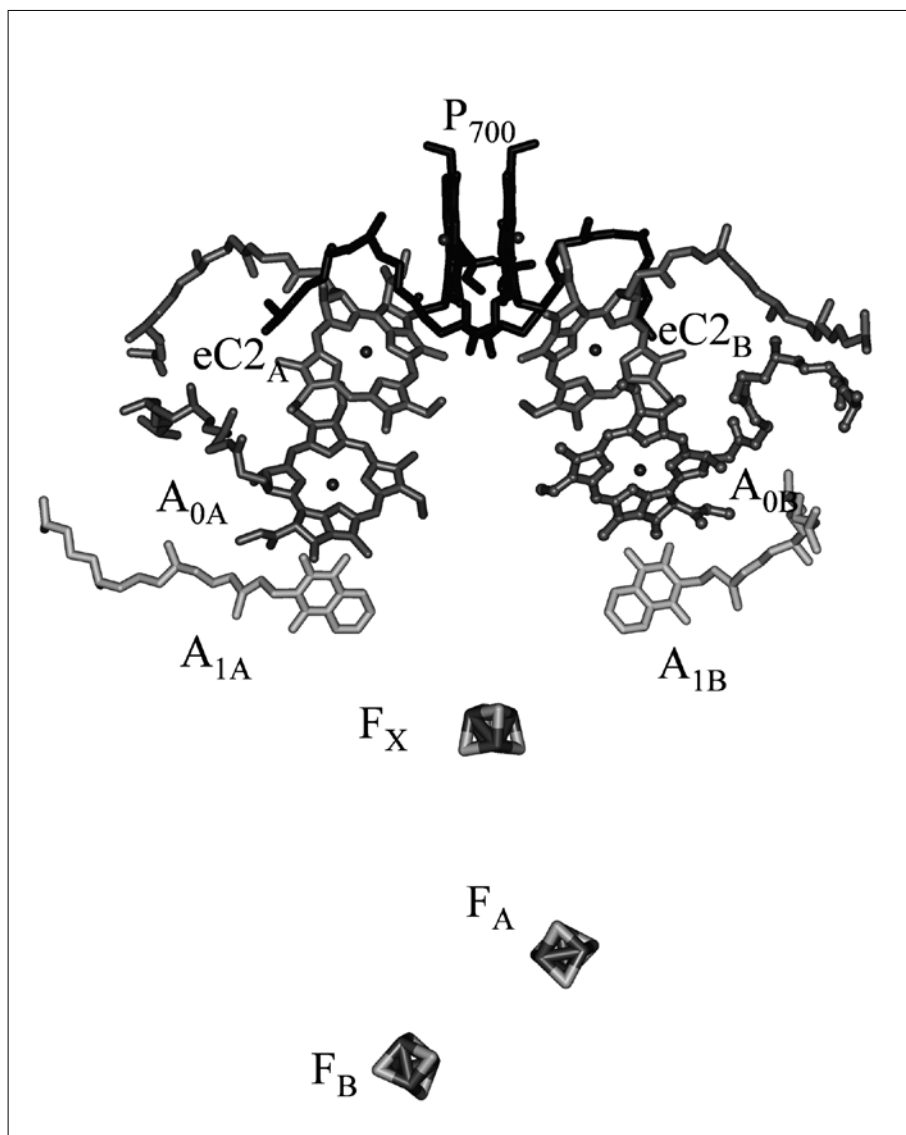


Fig. 1 Rappresentazione schematica delle catene di trasporto di elettroni nel fotosistema I ripresa dal modello strutturale di Jordan et al. (2001)

zione luminosa assorbita rispetto alla sola antenna interna. I core sia del PS II che del PS I sono ben conservati attraverso l'evoluzione, mentre l'antenna esterna mostra una grande variabilità, che riflette l'adattamento alle diverse nicchie ambientali.



Nel caso del PS I il core è costituito da 12-13 polipeptidi differenti, il numero specifico varia da specie a specie (Jensen et al., 2003). Le subunità PsaA e PsaB, formano un eterodimero che lega una vasta gamma di cofattori tra cui circa 80 clorofille *a* (Chl *a*), 30 molecole di  $\beta$ -carotene, due molecole di fillochinone ( $k_{ET}$ ) e un centro ferro-zolfo [4Fe -4S], detto  $F_X$ . Due altri centri [4Fe-4S], detti  $F_A$  e  $F_B$  sono coordinati alla subunità PsaC. La maggior parte dei pigmenti legati al core del PS I ha funzione di antenna interna, mentre un gruppo di 6 molecole di Chl *a*, uno dei quali è l'epimero in posizione 13' (Chl *a'*), catalizza le reazioni fotochimiche. All'interno di queste sei molecole sono contenuti sia il donatore che l'accettore primario di elettroni. Modelli cristallografici del core basati sulla diffrazione a raggi X sono stati ottenuti sia in un sistema modello dei cianobatteri (Jordan et al., 2001) sia in uno delle piante superiori (Ben-Shem et al., 2003). Il confronto tra i due modelli strutturali non evidenzia differenze né nell'organizzazione, né nei siti di legame specifici ai putativi cofattori coinvolti nelle reazioni di trasferimento elettronico.

La catena di trasferimento di elettroni del PS I possiede un asse di simmetria C<sub>2</sub>, perpendicolare al piano della putativa membrana tilacoidale, così che esistono due potenziali catene di cofattori, identiche dal punto vista chimico (fig. 1) e che si distinguono solo per leggere variazioni nell'interazione con la matrice proteica. Il gruppo di pigmenti assegnati al centro di reazione è spazialmente separato dalle altre clorofille che compongono l'antenna interna, con una distanza media di circa 18 Å. Il centro di reazione fotochimico può essere descritto come composto da tre pseudo-dimeri di clorofilla. Uno di questi si trova all'interfaccia tra PsaA e PsaB, è parallelo all'asse di simmetria, contiene l'epimero (chl *a'*) ed è generalmente attribuito a  $P_{700}$ , che costituisce, in forma cationica ( $P_{700}^+$ ), il donatore di elettroni terminale. Negli studi strutturali le clorofille che compongono  $P_{700}$  sono chiamate come  $eC1_{A/B}$  dove il pedice indica la subunità a cui sono coordinate (Jordan et al., 2001). Gli altri due dimeri sono composti delle coppie di clorofille  $eC2_A/eC3_A$  ed  $eC2_B/eC3_B$ . Le clorofille  $eC_2$  sono anche note come clorofille "accessorie", mentre  $eC_3$  è altrimenti conosciuta come  $A_0$  e rappresenta il primo accettore di elettroni osservato chiaramente tramite metodi spettroscopici (Brettel, 1997). Le cinetiche di riduzione di  $A_0$ , che sono spesso discusse in termini di separazione di carica primaria, avvengono in poche decine di picosecondi, con limiti superiori nell'ordine di  $\sim 1$  ps discussi in letteratura (Gobets e van Grondelle, 2001, Santabarbara et al., 2005). È stato suggerito che la separazione di carica potrebbe partire dalle clorofille accessorie (Müller et al., 2003; 2010), anziché da  $P_{700}$  come più comunemente considerato. Indipendentemente dei modelli dettagliati delle

reazioni fotochimiche primarie,  $A_{0(A/B)}$  è sempre considerato essere l'accettore primario di elettroni. Essi sono localizzati in prossimità delle molecole di fillochinone ( $A_{1A}$  e  $A_{1B}$  rispettivamente), che sono i successivi intermedi nella catena di trasporto. Questi vengono ridotti alla forma di semi-chinone radicale nell'intervallo di 40-60 ps (e.g. Brettel, 1997; Santabarbara et al., 2005). L'ossidazione del semi-chinone  $A_1$  da parte del successivo accettore che è il centro  $[4Fe-4S] F_x$  mostra cinetiche multi-esponenziali caratterizzate da un minimo di due ben distinti tempi di vita nell'ordine di circa  $\sim 20$  e  $\sim 200$  nanosecondi. La fase più rapida della cinetiche è associata all'ossidazione di  $A_{1B}$ , mentre la fase lenta è associata all'ossidazione di  $A_{1A}$ , secondo il modello "bidirezionale" di trasferimento di elettroni (Santabarbara et al., 2005; 2010a; Rappaport et al., 2006). La bidirezionalità sembra essere una proprietà caratteristica del PS I, dato che sia nel centro di reazione del PS II, così come in quello dei batteri purpurei, che fanno parte della famiglia dei centri di Tipo-II, il trasferimento di elettroni è asimmetrico così che le reazioni fotochimiche avvengono unicamente in una delle due possibili catene redox evidenziate dagli studi strutturali. Gli accettore terminali nel PS I sono dei centri ferro-zolfo, noti come  $F_A$  e  $F_B$ , i quali operano a cascata e, a differenza degli altri gruppi attivi in reazioni di ossidoriduzione, sono coordinati dalla subunità PsaC.

L'analisi delle strutture del PS I non fornisce ovvie indicazioni che spieghino le differenti cinetiche di ossidazione di  $A_{1B}$  e  $A_{1A}$  che differiscono di quasi un ordine di grandezza. È ragionevole supporre che esse possano derivare da differenze nelle proprietà chimico-fisiche determinate da specifiche interazioni dei fillochinoni con le subunità alle quali sono coordinati, PsaA e PsaB. Questa ipotesi è discussa in questo articolo.

## 2. DESCRIZIONE GENERALE DELLA MODELLISTICA DEL TRASPORTO DI ELETTRONI NEL PS I

Al fine di descrivere le cinetiche di ossidazione  $A_1$  verrà utilizzata una modellizzazione che consiste nella soluzione di un sistema di equazioni differenziali lineari del tipo (in notazione matriciale):

$$\dot{S}(t) = \mathbf{R} \cdot S(t) \quad (1)$$

dove  $S(t)$  sono i vettori delle evoluzioni temporali delle specie coinvolte nel trasporto di elettroni,  $\dot{S}(t)$  è la loro derivata prima, mentre  $\mathbf{R}$  è la matrice

che ha come elementi le costanti di velocità reazione tra coppie di donatori-accettori. Il sistema (1) ha come soluzione generale:

$$S(t) = \sum_{i=1}^n V_i e^{\gamma_i t} \quad (2)$$

dove  $\gamma_i$  e  $V_i$  sono, rispettivamente gli autovalori e gli autovettori della matrice  $\mathbf{R}$ .

Le costanti di velocità di reazione ( $k_{D \rightarrow A}$ ) tra un donatore (D) e accettore (A), ovvero gli elementi di  $\mathbf{R}$ , sono descritte, secondo la teoria attribuita a Marcus (Marcus e Sutin, 1985, DeVault, 1984), dalla relazione:

$$k_{D \rightarrow A} = \frac{\pi}{h} \frac{|H_{DA}|^2}{\sqrt{\pi \lambda_i k_b T}} e^{-\frac{(\Delta G^0 + \lambda_i)^2}{4 \lambda_i k_b T}} \quad (3)$$

dove,  $k_b$  è la costante di Boltzmann,  $h$  è la costante di Dirac,  $|H_{DA}|$  è l'elemento elettronico dell'Hamiltoniano del sistema,  $\Delta G^0$  è la differenza di energia libera in condizioni standard,  $\lambda_i$  è l'energia di riorganizzazione (totale). Nel caso di reazioni reversibili, la velocità della reazione *inversa*, cioè il trasferimento di un elettrone dall'accettore al donatore può essere ottenuto semplicemente sostituendo  $\Delta G^0$  con  $-\Delta G^0$  nell'Equazione (3). Ne risulta che rapporto tra le costanti di reazione "diretta" e "inversa" è descritto dalla distribuzione di Boltzmann:

$$\frac{k_{D \rightarrow A}}{k_{A \rightarrow D}} = e^{-\frac{\Delta G^0}{k_b T}} \quad (4)$$

ed è quindi equivalente alla costante di equilibrio,  $K_{eq}$ . Quindi, la velocità di trasferimento di elettroni è determinata da tre incognite,  $|H_{DA}|$ ,  $\Delta G^0$  e  $\lambda_i$ .

*Valutazione dei parametri che determinano i valori delle costanti di velocità:*

*Differenza di energia libera ( $\Delta G^0$ ).*  $\Delta G^0$  è determinabile da misure indipendenti, per esempio tramite titolazioni redox dei donatori e degli accettori di elettroni. Tuttavia, tali titolazioni spesso non sono possibili in campioni biologici, soprattutto quando questi operano ad alti potenziali. Nel caso del PS I solo i potenziali del donatore terminale  $P_{700}^+$  e degli accettori  $F_{A/B/X}$  sono stati determinati direttamente (elencati da Brettel, 1997). I valori riportati in letteratura sono abbastanza variabili, in particolare per  $F_X$ . Negli altri casi i valori saranno scelti in modo da riprodurre i valori sperimentali.

*Energia di riorganizzazione ( $\lambda_i$ ).* In un'analisi estensiva di varie proteine coinvolte nel trasporto di elettroni, Moser, Dutton e collaboratori (1992), hanno verificato che  $\lambda_i$  è contenuta in una finestra piuttosto raccolta di valori,

in genere tra 0.5 e 1 eV e con una media di ~0.7 eV. Verranno utilizzati valori in questo intervallo.

*Elemento elettronico dell'Hamiltoniano* ( $|H_{DA}\rangle$ ). Il valore di  $|H_{DA}|$  dipende dalla forma e la profondità della barriera di tunneling attraverso cui gli elettroni devono transitare perché la reazione abbia luogo (DeVault, 1984). Considerando una barriera di tunneling rettangolare, è possibile descrivere l'elemento elettronico in prima approssimazione come:

$$|H_{DA}|^2 = |H_{DA}|_0^2 \times e^{-\beta r_{DA}} \quad [5]$$

dove  $|H_{DA}|_0^2$  è il valore massimo in condizioni di “contatto”, smorzato esponenzialmente in funzione della distanza donatore-accettore,  $r_{DA}$  e modulato dalla costante di attenuazione,  $\beta$ , che dipende del mezzo circostante. Moser et al. (1992) hanno proposto un valore medio di  $\beta$  di  $1,3\text{--}1,4 \text{ \AA}^{-1}$ .  $r_{DA}$  è la distanza “edge-to-edge” tra i cofattori coinvolti nella reazione, corretta per i raggi di van del Waals (~ 3.6 Å). Una buona approssimazione per il valore di  $|H_{DA}|_0^2$  è ottenuta considerando una barriera di potenziale di ~ 2 eV che risulta in un valore di circa  $\sim 1 \cdot 10^{-3} \text{ eV}^2$ . Va sottolineato che questi valori dei parametri sono approssimati. Pertanto la descrizione delle costanti, deve essere considerata anch'essa come una approssimazione e in genere affidabile all'interno dell'ordine di grandezza.

### 3. DESCRIZIONE DEL TRASPORTO SECONDARIO DI ELETTRONI NEL PS I

Le cinetiche di ossidazione del fillochinone  $A_1^-$  da parte del centro 4Fe-4S  $F_x$  sono descritte da cinetiche dominate, nei ceppi selvatici, da due componenti caratterizzate da tempi di vita nell'intervallo dei 5-25 ns e dei 200-350 ns (e.g. Santabarbara et al., 2005; 2010a; Rappaport et al., 2006). È stata anche osservata una fase “intermedia”, a cui è associato un tempo di vita di circa 160-180 ns (e.g. Agalarov e Brettel, 2003; Byrdin et al., 2007). Esiste al momento un consenso generale nel considerare che il componente veloce (5-25 ns) rappresenti l'ossidazione di  $A_{1B}^-$  mentre la fase “lenta” (200-350 ns) sia dominata dall'ossidazione di  $A_{1A}^-$ , in accordo con il modello di trasporto di elettroni (ET) bidirezionale. Le evidenze sperimentali a favore del trasporto bidirezionale sono state ottenute dall'analisi di mutanti del centro di reazione del PS I, in cui le catene laterali di residui coinvolti nei siti di legame dei fillochinoni  $A_1$  e delle clorofille  $A_0$  sono state sostituiti nelle subunità PsA e PsB. Nel caso dei fillochinoni la principale interazione con la proteina è

di tipo idrofobico (“ $\pi$ -stacking”) tramite l’anello indolico di un residuo di triptofano (PsaA-Trp697, PsaB-Trp677, la numerazione si riferisce a *S. elongatus*). La sostituzione del residuo PsaA-Trp697 con diverse catene laterali determina un rallentamento delle cinetiche di ossidazione, a seguito di una variazione del componente da 250 ns (WT) che passa a un valore nell’intervallo dei 450-1200 ns nei mutanti (Rappaport et al., 2006; Santabarbara et al., 2005; 2010a). D’altra parte, i tempi di vita della fase rapida di ossidazione ( $\sim 20$  ns) non sono influenzati da mutazioni della proteina PsaA. L’effetto opposto è stato osservato per mutanti del residuo PsaB-Trp677 che producono un rallentamento del tempo di vita di  $\sim 20$  ns (WT) a 40-80 ns, mentre il valore del componente di  $\sim 250$  ns rimane costante. Significativamente, in doppi mutanti PsaA-Trp697/PsaB-Trp677 si osserva un rallentamento di entrambe le componenti (Rappaport et al., 2006; Santabarbara et al., 2005). Questo tipo di comportamento viene osservato non solo nei mutanti dei residui coinvolti nell’interazione- $\pi$ , ma in generale per sostituzione di residui presenti nell’intorno del sito di legame dei chinoni, e spesso l’effetto sulle componenti cinetiche è comparabile a quello che si osserva per i residui che apparentemente interagiscono più strettamente con le molecole di cofattori attivi nel trasporto redox (Rappaport et al., 2006; Santabarbara et al., 2005; 2010a).

Le strutture indicano anche che solo uno dei gruppi chetonici di entrambi i chinoni è localizzato in prossimità di un possibile donatore di legame idrogeno, il legame peptidico che coinvolge i residui PsaA-Leu722 e PsaB-Leu706. Per cui non è possibile sopprimere completamente questa interazione, attraverso la sostituzione della catena laterale. Nonostante questo, in mutanti in cui la leucina è stata sostituita sia con una treonina che con una tirosina, è stato osservata una accelerazione dei tempi di decadimento, in particolare in mutanti della subunità PsaA-Leu722 e il tempo di vita “lento” diviene  $\sim 180$  ns rispetto a 250 ns nel WT, mentre in mutanti di PsaB-Leu706 diviene  $\sim 15$  invece di 25 ns (Santabarbara et al., 2010b; Srinivasan et al., 2011).

Quindi, nonostante le evidenze per il trasporto bidirezionale sono solide non c’è una spiegazione semplice, dal punto di vista strutturale, per la differenza di circa un ordine di grandezza dei tempi di vita associati all’ossidazione di  $A_{1A}^-$  e  $A_{1B}^-$ . Il legame di entrambi i fillochinoni alle rispettive subunità proteiche, PsaA e PsaB è molto simile.  $F_x$  è un accettore comune a entrambe le catene di trasferimento di elettroni, e la distanza “edge-to-edge” tra i due chinononi e  $F_x$  è la medesima, nel limite di frazioni di Å. Pertanto, è ragionevole considerare che i tempi di vita da  $\sim 20$ -ns and  $\sim 250$ -ns siano causati da diverse proprietà

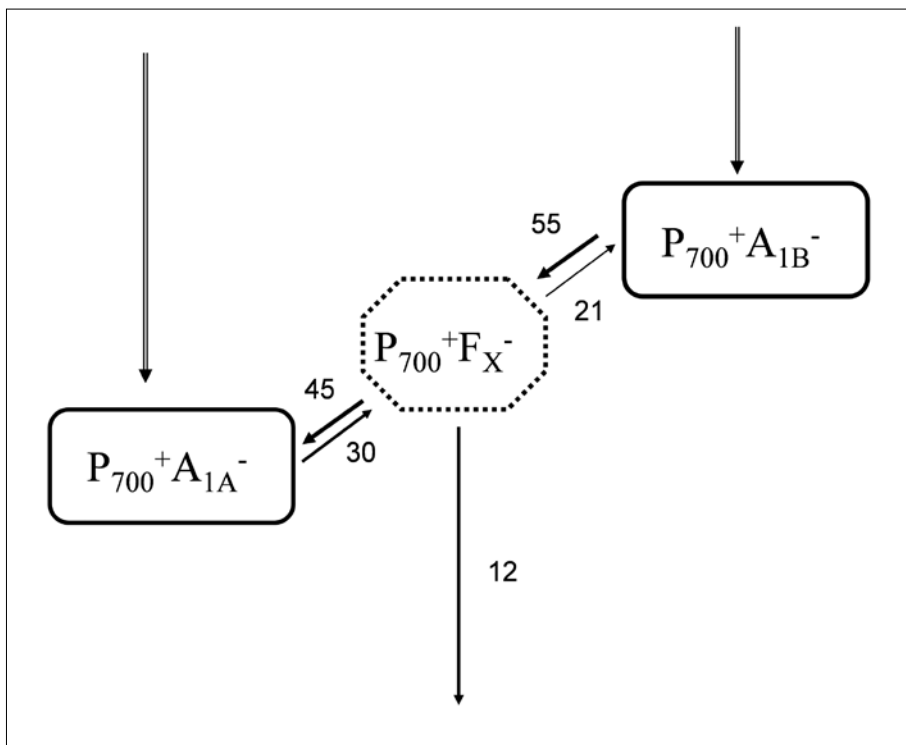


Fig. 2 *Modello cinetico delle reazioni di trasporto elettronico secondario nel fotosistema I. Le velocità di reazione sono riportate in  $\mu s^{-1}$*

chimico-fisiche del sistema, come l'energia di riorganizzazione ( $\lambda_i$ ) o differenze di energia libera ( $\Delta G^0$ ). Il valore di  $\lambda_i$  dovrebbe essere, con buona approssimazione, relativamente costante per porzioni ristrette del complesso proteico. È improbabile spiegare un ordine di grandezza di differenza nei tempi di vita misurati per i fillochinoni che distano meno di 15 Å tra loro solo nei termini di distinti valori di  $\lambda_i$ .

È stato quindi proposto un modello relativamente semplice (Santabarbara et al., 2005a), che descrive in modo semi-quantitativo la cinetica di ossidazione e che considera un importante contributo della reversibilità del ET per entrambe le reazioni di ossidazione ( $A_{1A/B}^- \rightarrow F_x^-$ ), mentre il successivo passo nella catena di trasferimento, rappresentato dalla riduzione di  $F_A$  da parte di  $F_x^r$  (l'apice *r* indica la forma ridotta del centro 4Fe-4S) è considerato come sostanzialmente irreversibile e quindi associato a un valore largamente negativo di  $\Delta G_{F_x^r \rightarrow F_A}^0 \leq -150$  meV derivante dalle titolazioni redox dei cofattori (fig. 2).

Considerando un valore comune di  $\lambda_i$  è necessario aggiustare solo i valo-

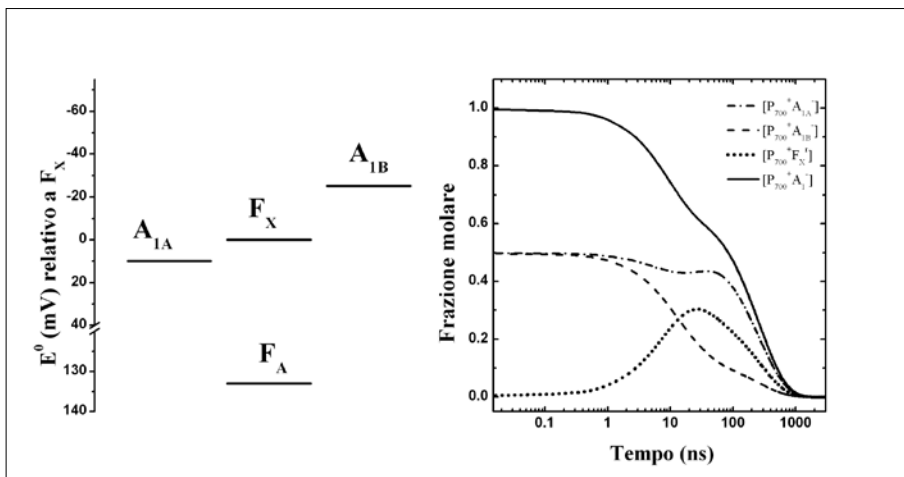


Fig. 3 Pannello A: schema energetico dei cofattori coinvolti nelle reazioni secondarie, utilizzando come riferimento interno. Pannello B: Evoluzione temporale delle popolazione delle coppie radicaliche  $[P_{700}^+ A_{1A}^-]$  (linea tratteggiata),  $[P_{700}^+ A_{1B}^-]$  (linea punto-tratto) e  $[P_{700}^+ F_X^-]$  (linea punteggiata). È inoltre riportata l'evoluzione di  $[P_{700}^+ A_{1A}^-]$  totale. Tempi di vita derivati dal modello: 9 ns, 21 ns, 258 ns

ri dell'energia libera, dato che, come descritto nella sezione 2, tutti gli altri parametri sono fissati o derivati dal modello strutturale, come ad esempio le distanze che sono 9 Å tra  $A_{1A/B}$  e  $F_X$  e 11.6 Å tra  $F_X$  e  $F_A$ . Per valori di  $\lambda_i$  dell'ordine di 0,5-0,75 eV, ovvero quelli comunemente riportati per proteine attive nel trasferimento elettronico, il valore di  $\Delta G_{A_{1A}^- \rightarrow F_X}^0$  varia tra 0 e 50 meV e quello di  $\Delta G_{A_{1B}^- \rightarrow F_X}^0$  tra - (15-50) meV, così che, in generale,  $\Delta G_{A_{1A}^- \rightarrow F_X}^0 \pm 2,5 k_b T$  a temperatura ambiente. Inoltre, da questi valori di  $\Delta G_{A_{1A/B}^- \rightarrow F_X}^0$  risulta che la differenza di potenziale redox standard tra i due fillochinoni è nell'intervallo 20-120 mV che è relativamente contenuta, e può essere razionalizzata sulla base della diversa forza del legame idrogeno tra i due fillochinoni e le rispettive subunità proteiche PsaB e PsaA come suggerito da recenti analisi spettroscopiche (Berthold et al., 2012).

In figura 3 sono riportate le evoluzioni della popolazione delle coppie radicaliche  $[P_{700}^+ A_{1A}^-]$ ,  $[P_{700}^+ A_{1B}^-]$  e  $[P_{700}^+ F_X^-]$  calcolate secondo il modello minimo appena descritto e considerando un valore medio di  $\lambda_i = 0.7$  eV. In questo caso, il valore di  $\Delta G_{A_{1A}^- \rightarrow F_X}^0 = 10$  meV, quello di  $\Delta G_{A_{1B}^- \rightarrow F_X}^0 = -25$  meV. Le caratteristiche più significative di questa descrizione dell'ossidazione di  $A_{1A}^-$  possono essere riassunte come:

- i. la reazione di ossidazione  $A_{1A}^-$  appare essere accoppiata a un gradiente energetico minore rispetto all'ossidazione di  $A_{1B}^-$ . Mentre l'ossidazione di  $A_{1B}^-$  appare essere sempre favorevole dal punto di vista termodinamico, quella

- di  $A_{1A}^-$  sembra essere leggermente endoergonica o, al limite, leggermente esoergonica. Quindi, queste reazioni sono trascinate energeticamente dall'accoppiamento con l'ossidazione di  $F_x^r$  che è largamente favorevole.
- ii. Le reali costanti di velocità per l'ossidazione dei due fillochinoni,  $k_{A_{1A}^- \rightarrow F_x}$  e  $k_{A_{1B}^- \rightarrow F_x}$  differiscono solo di un fattore due. Per l'esempio riportato sopra i valori sono  $30 \mu s^{-1}$  e  $55 \mu s^{-1}$ , mentre la differenza nei tempi di vita (che sono descritti dagli autovalori del modello cinetico) è circa dieci volte. Ciò è dovuto alla differenza nelle velocità della reazione *inverse* ( $k_{F_x \rightarrow A_i^-}$ ), che sono determinate dalle rispettive costanti di equilibrio. Se la reazione  $A_{1A}^- \rightarrow F_x$  è leggermente endoergonica ne consegue che  $k_{F_x \rightarrow A_{1A}^-} \geq k_{A_{1A}^- \rightarrow F_x}$ , l'opposto per  $A_{1B}^- \rightarrow F_x$ .
- iii. In questo scenario energetico, l'approssimazione comunemente adottata  $\tau_{obs}^{-1} \sim k_{ET}$ , in cui  $\tau_{obs}^{-1}$  è il tempo di vita misurato e  $k_{ET}$  è la vera costante di velocità, non è applicabile. In particolare, per le reazioni considerate, l'approssimazione è accettabile per  $A_{1B}^- \rightarrow F_x$  ma non per  $A_{1A}^- \rightarrow F_x$ .
- iv. Dato che il modello cinetico considera tre intermedi, risultano tre tempi di vita calcolati. Vale a dire, più di quelli normalmente risolti sperimentalmente. Per il modello delle figura 2, due di questi tempi di vita sono compresi nell'intervallo di 8-30 ns; comunemente, a uno di questi tempi di vita è associata un'ampiezza frazionale molto piccola quando viene considerata l'evoluzione totale della coppia radicalica  $[P_{700}^+ A_1^-] = ([P_{700}^+ A_{1A}^-] + [P_{700}^+ A_{1B}^-])$ . Per tanto il tempo misurato di  $\sim 20$  ns è descritto collettivamente dai due componenti (9 e 21 ns) che nella modellistica hanno valori nell'ordine della decina di nanosecondi. Il tempo di vita più lungo misurato sperimentalmente invece corrisponde direttamente a quello ricavato dalla modellistica.
- v. La piccola ampiezza associata al secondo tempo nelle decine di ns quando viene considerato il suo contributo totale a  $[P_{700}^+ A_1^-]$  è dovuto al segno opposto dell'ampiezza (gli autovettori associati a questo autovalore del modello cinetico) nelle due coppie radicaliche che contengono i fillochinoni. Il segno è positivo per  $[P_{700}^+ A_{1B}^-]$ , indicando un decadimento, mentre è negativo per  $[P_{700}^+ A_{1A}^-]$ , cioè un popolamento di questa coppia radicalica. Questo è interpretabile come un effettivo trasferimento netto di popolazione da  $A_{1B}^-$  a  $A_{1A}^-$ , mediato da  $F_x^r$  (Santabarbara et al., 2010b), favorito dal fatto che la coppia  $A_{1A}^-/A_{1A}$  sia la più ossidante della terna considerata.
- Il modello appena descritto non intende descrivere quantitativamente i risultati sperimentali, tuttavia fornisce una descrizione semi-qualitativa che fornisce una spiegazione semplice per evidenze sperimentali diverse, in termini di una singola variabile microscopica, la differenza di energia libera stan-



dard per le reazioni. È altresì evidente che ulteriori studi sono necessari per delucidare con precisione i valori dei parametri chimico-fisici che controllano queste reazioni.

#### RIASSUNTO

Le cinetiche di trasporto di elettroni che coinvolgono gli accettori secondari all'interno del centro di reazione del fotosistema (PS) I sono descritte da complessi decadimenti multi-esponenziali. Questo è in parte dovuto al fatto che nel PS I esistono due catene di trasporto funzionali, mentre una sola è attiva nel PS II. I tempi di vita misurati sembrano suggerire differenze nell'ordine di 10 volte nella velocità di reazione tra le due catene. D'altra parte i dati strutturali non forniscono elementi in grado di razionalizzare questa differenza. Viene qui descritto un modello in cui i dati sperimentali possono essere spiegati in termini di differenti valore per le differenze nell'energia libera di Gibbs associata alle due catene di trasporto attive nel PS I.

#### ABSTRACT

The kinetics of electron transfer involving the secondary electron transfer acceptors in the reaction centre of Photosystem (PS) I are described by complex multi-exponential decay. This is in part explained by the observation that two parallel electron transfer chains are active in electron transfer process, according to the bidirectional mechanism. The measured lifetimes suggests difference of about an order of magnitude in between the oxidation kinetics attributed to the two electron transfer chains. Yet, the structural data do not provide elements which allow to rationalise such differences. It is here described a kinetic model by which the experimental data are explained in terms of distinct Gibbs free energy difference associated with the reactions occurring on the two parallel redox chains of PS I.

#### BIBLIOGRAFIA

- AGALAROV R., BRETTEL K. (2003): *Temperature dependence of biphasic forward electron transfer from the phyloquinone(s) A1 in photosystem I: only the slower phase is activated*, «Biochim. Biophys. Acta», 1604, pp. 7-12.
- BEN-SHEM A., FROLOW F., NELSON N. (2003): *Crystal structure of plant photosystem I*, «Nature», 426, pp. 630-635.
- BERTHOLD T., VON GROMOFF E.D., SANTABARBARA S., STEHLE P., LINK G., POLUEKTOV O.G., HEATHCOTE P., BECK C.F., THURNAUER M.C., KOTHE G. (2012): *Exploring the electron transfer pathways in photosystem I by high-time-resolution electron paramagnetic resonance: observation of the B-side radical pair  $[P_{700}^+ A_{1B}^-]$  in whole cells of the deuterated green alga Chlamydomonas reinhardtii at cryogenic temperatures*, «J. Am. Chem. Soc.», 134, pp. 5563-5576.

- BRETTEL K. (1997): *Electron transfer and arrangement of the redox cofactor in photosystem I*, «Biochim. Biophys. Acta», 1318, pp. 322-373.
- BYRDIN M., SANTABARBARA S., GU F., FAIRCLOUGH W.V., HEATHCOTE P., REDDING K., RAPPAPORT F. (2006): *Assignment of a kinetic component to electron transfer between iron-sulfur clusters  $F_X$  and  $F_{A/B}$  of Photosystem I*, «Biochim. Biophys. Acta», 1757, pp. 1529-1538.
- DEVULT D. (1984): *Quantum-Mechanical Tunnelling in Biological Systems*, Cambridge University Press, Cambridge.
- GOBETS B., VAN GRONDELLE R. (2001): *Energy transfer and trapping in Photosystem I*, «Biochim. Biophys. Acta», 1507, pp. 80-99.
- JENSEN P.E., HALDRUP A., ROSGAARD L., SCHELLER H.V. (2003): *Molecular dissection of photosystem I in higher plants: topology structure and function*, «Physiol. Plant.», 119, pp. 313-321.
- JORDAN P., FROMME P., WITT H.T., KLUKAS O., SAENGER W., KRAUSS N. (2001): *Three-dimensional structure of cyanobacterial Photosystem I at 2.5 Å resolution*, «Nature», 411, pp. 909-917.
- MARCUS R.A., SUTIN N. (1985): *Electron transfer in chemistry and biology*, «Biochim. Biophys. Acta», 811, pp. 265-322.
- MOSER C.C., KESKE J.M., WARNCKE K., FARID R.S., DUTTON P.L. (1992): *Nature of biological electron transfer*, «Nature», 355, pp. 796-802.
- MÜLLER M.G., NIKLAS J., LUBITZ W., HOLZWARTH A.R. (2003): *Ultrafast transient absorption studies on Photosystem I reaction centers from Chlamydomonas reinhardtii*, «Biophys. J.», 85, pp. 3899-3922.
- MÜLLER M.G., SLAVOV C., LUTHRA R., REDDING K.E., HOLZWARTH A.R. (2010): *Independent initiation of primary electron transfer in the two branches of the photosystem I reaction center*, «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», 107, pp. 4123-4128.
- RAPPAPORT F., DINER B.A., REDDING K. (2006): *Optical Measurements of Secondary Electron Transfer in Photosystem I*. In: Golbeck JH, ed. *Photosystem I: The Light-Driven Plastocyanin: Ferredoxin Oxidoreductase*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 223-244.
- SANTABARBARA S., HEATHCOTE P., EVANS M.C.W. (2005): *Modelling of the electron transfer reactions in Photosystem I by electron tunnelling theory*, «Biochim. Biophys. Acta», 1708, pp. 283-310.
- SANTABARBARA S., GALUPPINI L., CASAZZA A.P. (2010a): *Bidirectional electron transfer in the reaction centre of photosystem I*, «J. Integr. Plant. Biol.», 52, pp. 735-749.
- SANTABARBARA S., REIFSCHNEIDER K., JASAITIS A., GU F., AGOSTINI G., CARBONERA D., RAPPAPORT F., REDDING K.E. (2010b): *Interquinone electron transfer in photosystem I as evidenced by altering the hydrogen bond strength to the phylloquinone(s)*, «J. Phys. Chem. B.», 114, pp. 9300-9312.
- SRINIVASAN N., SANTABARBARA S., RAPPAPORT F., CARBONERA D., REDDING K., VAN DER EST A., GOLBECK J.H. (2011): *Alteration of the H-bond to the  $A_{1A}$  phylloquinone in Photosystem I: influence on the kinetics and energetics of electron transfer*, «J. Phys. Chem. B.», 115, pp. 1751-1759.

## Trasporto ciclico di elettroni nel cloroplasto

### I. INTRODUZIONE

La fotosintesi è il processo che converte l'energia luminosa in energia chimica e avviene all'interno del cloroplasto, organello tipico delle cellule vegetali.

La fase luminosa della fotosintesi ha luogo nelle membrane tilacoidali del cloroplasto e consiste nel trasferimento di elettroni dall'acqua al  $\text{NADP}^+$ , con conseguente formazione di potere riducente (NADPH), produzione di ossigeno molecolare ( $\text{O}_2$ ) e rilascio di protoni nel lume tilacoidale ( $\text{H}^+$ ) (Arnon, 1991; Arnon et al., 1954; Hill e Bendall, 1960). Questo processo prende il nome di trasporto lineare di elettroni (LET) e coinvolge due reazioni fotochimiche che hanno luogo a livello del Fotosistema II (PSII) e del Fotosistema I (PSI) (fig. 1). Gli elettroni ottenuti dall'ossidazione dell'acqua, catalizzata dal PSII, sono trasferiti ai plastochinoni (PQ), al citocromo  $b_6f$  (Cyt  $b_6f$ ) e quindi sono utilizzati per ridurre la plastocianina (PC). Successivamente, la plastocianina è ossidata dal PSI e gli elettroni sono trasferiti alla Ferredossina (Fd) per la produzione di NADPH grazie all'enzima Ferredossina-NADP<sup>+</sup> reduttasi (FNR). Il trasporto lineare di elettroni genera, contemporaneamente, un gradiente protonico attraverso la membrana tilacoidale ( $\Delta\text{pH}$ ), che è utilizzato dal complesso proteico ATP-sintasi (ATPase) per produrre ATP (per una rassegna si veda Shikanai, 2007). NADPH e ATP sono, quindi, i prodotti primari della fase luminosa della fotosintesi e sono soprattutto utilizzati per la fissazione dell'anidride carbonica ( $\text{CO}_2$ ), attraverso il ciclo di Calvin-Benson, nello stroma del cloroplasto. Si stima che in piante a metabolismo C3 occorra un rapporto ATP/NADPH pari a 1.66 per fissare l'anidride carbonica, mentre

\* Dipartimento di Bioscienze, Università di Milano

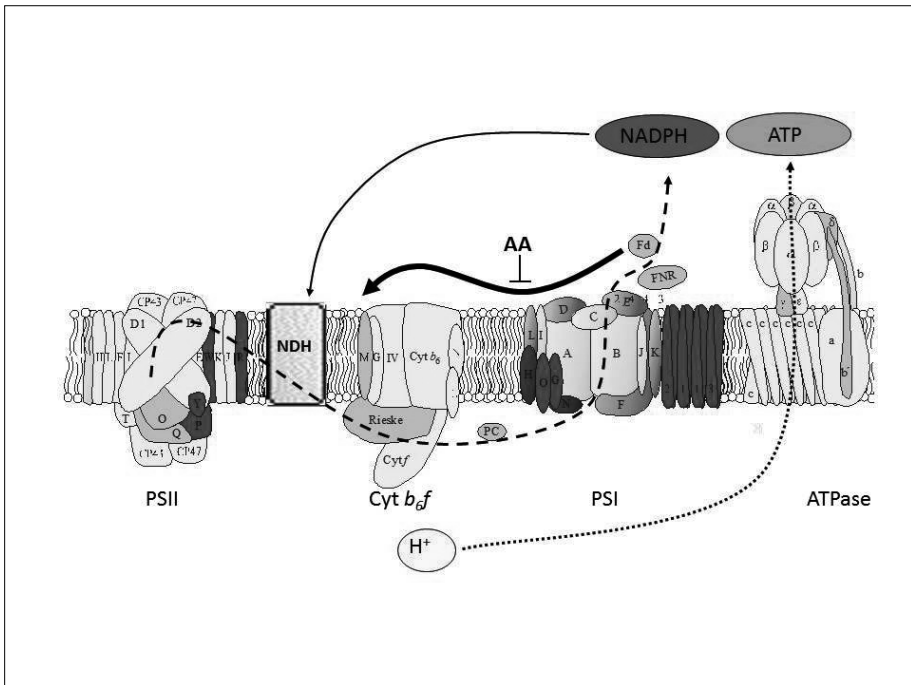


Fig. 1 Schema raffigurante i principali complessi proteici presenti nelle membrane tilacoidali e coinvolti nel trasporto lineare di elettroni (linea tratteggiata) e nelle due vie alternative di trasporto ciclico di elettroni: la via sensibile all'Antaïmicina A (AA) e dipendente dalla Ferredossina (Fd; linea continua spessa) e la via dipendente dal complesso NAD(P)H-deidrogenasi (NDH; linea continua sottile). Sia il trasporto lineare che quello ciclico di elettroni contribuiscono alla generazione di un gradiente protonico ( $H^+$ ), a cavallo della membrana tilacoidale, essenziale sia per l'attivazione di meccanismi fotoprotettivi (NPQ) che per la produzione di ATP attraverso il complesso dell'ATPase (linea punteggiata). PSII, fotosistema II; Cyt  $b_6/f$ , citocromo  $b_6/f$ ; PC, plastocianina; PSI, fotosistema I; ATPase, ATP sintasi; FNR, Ferredossina NADP<sup>+</sup> reductasi

il trasporto lineare di elettroni produce ATP e NADPH in un rapporto pari a 1.50. Come la pianta sia in grado di ottenere l'ATP mancante, necessario al ciclo di Calvin-Benson non è ancora del tutto chiaro, tuttavia si ipotizza che il trasporto ciclico di elettroni intorno al PSI (CET) possa contribuire ad aumentare la concentrazione di ATP (fig. 1). Infatti, il trasporto ciclico di elettroni necessita soltanto della reazione fotochimica del PSI e gli elettroni del NADPH o della Ferredossina sono nuovamente trasferiti ai plastochinoni e quindi reimmessi nella catena di trasporto (Bendall e Manasse, 1995; Fork e Herbert, 1993; Munekage e Shikanai, 2005). Pertanto, il trasporto ciclico di elettroni è in grado di incrementare il gradiente protonico che attraversa

la membrana tilacoidale e quindi produrre ATP, senza accumulare NADPH.

Seppur il trasporto ciclico di elettroni è noto da oltre 50 anni (Arnon et al., 1954; Arnon et al., 1958), alcune delle proteine coinvolte in questo processo sono state individuate soltanto di recente, grazie a studi di genomica funzionale eseguiti sulle piante modello *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum* (per una rassegna si veda Shikanai, 2007). A oggi si conoscono due vie parzialmente ridondanti del trasporto ciclico di elettroni intorno al PSI: i) la via dipendente dalla Ferredossina e inibita da Antimicina A; ii) la via dipendente dal complesso della NAD(P)H deidrogenasi (NDH) (fig. 1).

In questo manoscritto cercheremo di fornire un quadro, il più possibile esaustivo, dello stato dell'arte della ricerca sul trasporto ciclico di elettroni, insieme a possibili impieghi biotecnologici per migliorare l'efficienza fotosintetica e quindi la produttività delle piante superiori.

## 2. LE PROTEINE COINVOLTE NEL TRASPORTO CICLICO DI ELETTRONI DIPENDENTE DALLA FERREDOSSINA E SENSIBILE ALL'ANTIMICINA A

I primi lavori in cui sono riportati dati che evidenziano l'esistenza di un trasporto tilacoidale di elettroni responsabile di sintetizzare ATP, senza produzione di O<sub>2</sub> e NADPH, risalgono al 1954 grazie alle ricerche di Daniel I. Arnon (Arnon et al., 1954). Soltanto nel 1958, tuttavia, lo stesso autore parlerà per la prima volta di trasporto ciclico di elettroni (Arnon et al., 1958).

Successivamente nel 1963, Arnon insieme ai suoi collaboratori individuerà il ruolo essenziale della Ferredossina nel trasporto ciclico di elettroni oltre a sottolineare l'importanza del citocromo *b<sub>6</sub>f* e il fatto che il trasporto ciclico mediato dalla Ferredossina è inibito da un metabolita secondario prodotto da batteri del genere *Streptomyces* che prende il nome di Antimicina A (AA) (Tagawa et al., 1963) (fig. 1).

### 2.1 La scoperta della proteina "Protein Gradient Regulation 5" (PGR5)

Dovranno passare quasi 40 anni per arrivare a conoscere i primi dettagli molecolari alla base del trasporto ciclico di elettroni sensibile all'Antimicina A (Shikanai et al., 1999; Munekage et al., 2002). Questo importante risultato è ottenuto grazie a uno screening messo a punto da Toshiharu Shikanai, basato sull'individuazione di mutanti di *Arabidopsis* caratterizzati da un ridotto smorzamento della fluorescenza emessa dalla clorofilla (Non-Photochemical

Quenching, NPQ; Shikanai et al., 1999). In particolare, sulla base della considerazione che lo smorzamento della fluorescenza è indotto dall'acidificazione del lume tilacoidale e che anche il trasporto ciclico contribuisce a creare il gradiente protonico che attraversa la membrana tilacoidale, Shikanai insieme ai suoi collaboratori intuirono che l'individuazione di mutanti alterati nel meccanismo di fotoprotezione NPQ (Demmig-Adams et al., 1996; Niyogi et al., 2005), possa portare all'individuazione di geni e proteine coinvolti nel trasporto ciclico di elettroni. Il mutante di *Arabidopsis pgr5* (Munekage et al., 2002), infatti, oltre a essere caratterizzato da un ridotto NPQ, mostra le stesse caratteristiche di piante selvatiche di *Arabidopsis* trattate con Antimicina A. In particolare, il rapporto  $P700^+/P700$  (centro di reazione del PSI ossidato/ridotto) è più basso nel mutante *pgr5* rispetto al controllo selvatico e tale rapporto può essere ripristinato al valore di controllo per aggiunta di Metil-Viologeno, un accettore artificiale di elettroni provenienti dal PSI. Inoltre, l'assenza della proteina PGR5 non altera in alcun modo il trasporto lineare di elettroni, indicando chiaramente che PGR5 è coinvolta nella via di trasporto ciclico di elettroni sensibile all'Antimicina A e alternativa al trasporto lineare (fig. 2). Ulteriori analisi hanno dimostrato che PGR5 è una proteina estrinseca associata alla membrana tilacoidale e coinvolta nel trasferimento di elettroni dalla Ferredossina ai plastochinoni, quindi nella via del trasporto ciclico identificata da Arnon nel 1954.

## 2.2 La scoperta della proteina “Protein Gradient Regulation 5-Like 1” (PGRL1)

Alcuni anni dopo la scoperta di PGR5, il gruppo di ricerca coordinato da Dario Leister, presso la Ludwig-Maximilians-Universität di Monaco, Germania, individua una nuova proteina coinvolta nel trasporto ciclico di elettroni sensibile all'Antimicina A (DalCorso et al., 2008). Si tratta della proteina PGRL1, chiamata in questo modo in quanto il fenotipo del mutante corrispondente *pgrl1* era del tutto simile al fenotipo delle piante prive di PGR5. Il gruppo identifica i due geni di *Arabidopsis*, codificanti la proteina PGRL1 (*PGRL1a* e *PGRL1b*), grazie a studi di trascrittomica e alla definizione di “regoloni”, intesi come gruppi di geni la cui espressione è altamente co-regolata, anche in condizioni molto diverse tra loro. In particolare, i dati di trascrittomica indicano che i due geni *PGRL1a* e *PGRL1b* sono espressi in modo del tutto simile a *PGR5* e fanno parte di un regolone che contiene gran parte dei geni nucleari codificanti proteine cloroplastiche coinvolte nella fase luminosa della fotosintesi (Biehl et al., 2005). Pertanto, il coinvolgimento di PGRL1 nella fotosintesi, e più in par-



modello *Chlamydomonas reinhardtii* hanno evidenziato la capacità di PGRL1 di agire contemporaneamente sia da sensore per il Ferro che da modulatore del trasporto ciclico di elettroni (Petroutsos et al., 2009), insieme al fatto che la sua attività potrebbe essere regolata da una modificazione post-traduzionale (fosforilazione) mediata dalla chinasi STN8 (Reiland et al., 2011; Bonardi et al., 2005).

### 2.3 Isolamento del complesso multiproteico responsabile del trasporto ciclico di elettroni nell'alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*

Il complesso multiproteico alla base del trasporto ciclico di elettroni, la cui esistenza è stata ipotizzata nella pianta modello *Arabidopsis thaliana*, è stato recentemente isolato nell'alga unicellulare *C. reinhardtii* (Iwai et al., 2010). Seppur il trasporto ciclico in *Chlamydomonas* presenta delle peculiarità rispetto alle piante superiori, in quanto coinvolge un ulteriore processo fotoprotettivo conosciuto come "Transizioni di Stato", che ha l'obiettivo di bilanciare l'energia assorbita dai due fotosistemi, attraverso la migrazione di parte dell'antenna del PSII verso il PSI (Finazzi et al., 2002), la composizione del complesso multiproteico isolato in *Chlamydomonas* è del tutto simile a quella ipotizzata in *Arabidopsis*. In particolare, esso contiene subunità del PSI (PsaA/B, PsaD, PsaE, PsaF) e dell'antenna del PSI (LHCI), insieme al citocromo  $b_6$ , il citocromo  $f$ , la subunità Rieske (PetC), l'enzima FNR e la proteina PGRL1. Tuttavia, la proteina PGR5 e la Ferredossina non sono state individuate nel complesso isolato, molto probabilmente a causa delle interazioni troppo deboli di queste due proteine con il resto delle subunità.

### 3. LE PROTEINE COINVOLTE NEL TRASPORTO CICLICO DI ELETTRONI DIPENDENTE DAL COMPLESSO NDH

La seconda via di trasporto ciclico di elettroni intorno al PSI, individuata nelle piante superiori, dipende dall'attività del complesso cloroplastico indicato come NAD(P)H deidrogenasi (NDH). Una delle caratteristiche più sorprendenti dei genomi cloroplastici, infatti, è la presenza di 11 geni, indicati come *ndhA-ndhK*, che codificano proteine omologhe alle subunità che compongono la NADH deidrogenasi mitocondriale, conosciuta anche come Complesso I (Shinozaki et al., 1986; Matsubayashi et al., 1987; Ohyama et al., 1988; Sugiyama, 1992). La funzione di queste subunità e il loro coinvolgimento nel tra-



sporto ciclico di elettroni è stata studiata in dettaglio a partire dagli anni '90, grazie alla disponibilità di protocolli per la trasformazione del genoma cloroplastico della specie modello *Nicotiana tabacum* (Burrows et al., 1998; Kofer et al., 1998; Shikanai et al., 1998). Le diverse linee silenziata in ciascuno degli 11 geni non mostravano l'emissione transiente di fluorescenza subito dopo lo spegnimento della luce, tipica invece delle foglie selvatiche di tabacco. Questa alterazione indicava chiaramente che il complesso NDH è in grado di trasferire gli elettroni, presenti come potere riducente nello stroma del cloroplasto, al pool dei plastochinoni e quindi, attraverso il citocromo  $b_6f$  e la plastocianina, al PSI dando vita alla via alternativa di trasporto ciclico di elettroni. Il complesso NDH del cloroplasto può essere suddiviso in 4 diversi subcomplessi multiproteici che prendono il nome di subcomplesso di membrana, subcomplesso A, subcomplesso B, e subcomplesso del lume, ciascuno con una specifica funzione nell'ambito del trasporto ciclico di elettroni (per una rassegna si veda Peng et al., 2011).

In particolare, il subcomplesso di membrana è formato da sette subunità, NdhA-NdhG che hanno il compito di accettare elettroni dal NADPH e contemporaneamente trasportare protoni nel lume dei tilacoidi (Peng et al., 2009). Si calcola che per ogni 2 elettroni trasferiti dal NADPH al subcomplesso di membrana, 4 protoni siano pompati all'interno del lume tilacoidale. A questi si devono aggiungere altri 4 protoni trasferiti dallo stroma al lume tilacoidale a seguito del ciclo Q dei plastochinoni, per un rapporto finale elettroni:protoni trasferiti pari a 1:4 (Efremov et al., 2010).

Le subunità del subcomplesso A, NdhH-NdhO, formano invece il sito di legame per il plastochinone (Efremov et al., 2010), mentre meno chiara è la funzione delle subunità del subcomplesso B (NDF1, 2, 4, 6, NDH18) e del subcomplesso del lume (PPL2, CYP20-2, FKBP16-2), sebbene alcune evidenze sperimentali punterebbero a un ruolo chiave nell'accumulo e assemblaggio del complesso NDH (per una rassegna si veda Peng et al., 2011).

Come evidenziato nel caso del complesso PGR5-PGRL1 in *Chlamydomonas*, analisi immunologiche e di spettrometria di massa hanno evidenziato la presenza in *Arabidopsis* e *mais* di un supercomplesso proteico formato dall'interazione del complesso NDH con PSI (Peng et al., 2009).

#### 4. LA FISIOLOGIA DEL TRASPORTO CICLICO DI ELETTRONI NELLE PIANTE SUPERIORI

Come già descritto nei paragrafi precedenti, esistono chiare evidenze bio-

chimiche e spettroscopiche che supportano l'esistenza di due vie distinte del trasporto ciclico di elettroni: la via dipendente da PGR5-PGRL1 e quella mediata dal complesso NDH. Inoltre, appare chiaro che queste due vie abbiano ruoli distinti e siano regolate in modo diverso, seppur una parziale ridondanza non può essere esclusa.

Spesso il trasporto ciclico dipendente dal complesso NDH è stato considerato trascurabile in piante a metabolismo C3 in quanto la quantità del complesso è molto bassa rispetto alle altre componenti del trasporto di elettroni (Johnson, 2011). A supporto di ciò, mutanti alterati nell'attività del complesso NDH non mostravano alcun difetto fotosintetico, diversamente da quanto osservato in piante prive del complesso PGR5-PGRL1 (DalCorso et al., 2008; Munekage et al., 2002). Tuttavia, mutanti di *Arabidopsis* alterati contemporaneamente nelle due vie del trasporto ciclico sono caratterizzati dal trasporto lineare di elettroni decisamente alterato e di conseguenza mostrano un tasso di crescita e un contenuto in pigmenti ridotti, a dimostrazione del fatto che il trasporto ciclico di elettroni riveste un ruolo fisiologico molto importante nelle piante superiori (Munekage et al., 2004).

#### 4.1 *Funzione fotoprotettiva*

Sia i mutanti alterati nel complesso NDH, che privi delle proteine PGR5 e PGRL1 mostrano una maggiore suscettibilità a stress ambientali a testimonianza del fatto che il trasporto ciclico riveste un ruolo primario nella fotoprotezione. Mutanti di tabacco silenziati nei diversi geni cloroplastici codificanti proteine del complesso NDH sono, infatti, molto suscettibili a condizioni di alta luce (Endo et al., 1999), carenza idrica (Munné-Bosch et al., 2005) e temperature sia basse che elevate (Wang et al., 2006). Inoltre, il mutante privo della proteina PGR5 è stato individuato grazie a uno screening mirato a identificare mutanti alterati nel meccanismo fotoprotettivo NPQ (Shikanai et al., 1999; si veda anche paragrafo 2.1). Pertanto, si può asserire che uno dei ruoli primari del trasporto ciclico è sicuramente quello di generare un gradiente protonico responsabile di indurre la dissipazione termica dell'energia in eccesso attraverso NPQ. Un'altra importante funzione del trasporto ciclico dipendente da PGR5-PGRL1 è quella di proteggere il PSI dalla foto-ossidazione. Piante prive della proteina PGR5 sono, infatti, soggette a danni ossidativi a carico del PSI, se esposte ad alte intensità di luce (Munekage et al., 2002). La spiegazione di ciò risiede nella carenza di accettori alternativi di elettroni provenienti dal PSI che portano a una sovra-

riduzione dell'intero fotosistema e conseguente produzione di radicali ossigeno e danni ossidativi. Molteplici evidenze supportano il ruolo protettivo del trasporto ciclico in condizioni di stress. Clarke e Johnson (2001), ad esempio, hanno dimostrato che il trasporto ciclico di elettroni aumenta in piante di orzo esposte a condizioni di alta luce e basse temperature. Inoltre, aumenti nell'accumulo dei trascritti e delle proteine PGR5 e PGRL1 sono stati osservati in piante di *Arabidopsis* esposte a stress idrico (Lehtimäki et al., 2010) o in mutanti di *Arabidopsis* (*psad1-1* e *psae1-3*) con difetti nel trasporto lineare di elettroni (DalCorso et al., 2008). Prese assieme, tutte queste evidenze indicano chiaramente che il trasporto ciclico nelle piante superiori ha un ruolo molto importante nella protezione da danni ossidativi.

#### 4.2 *Essenziale per la produzione di ATP*

Il dibattito sul possibile ruolo fisiologico del trasporto ciclico nelle piante superiori è stato incentrato, soprattutto, sul suo possibile coinvolgimento nell'aggiustare la stechiometria NADPH/ATP a seconda delle richieste metaboliche del ciclo di Calvin-Benson (Allen, 2003). Oggi, tuttavia, sappiamo che il trasporto ciclico di elettroni e quindi la disponibilità di NADPH/ATP non sono strettamente ed esclusivamente collegate alle necessità del ciclo di Calvin-Benson. Diverse vie metaboliche, oltre al ciclo di Calvin-Benson, competono per la disponibilità di ATP e NADPH all'interno del cloroplasto. Inoltre, è sempre più evidente che il cloroplasto non è isolato energeticamente dal resto della cellula, in quanto ATP e NADPH possono attraversare la doppia membrana plastidiale in entrambe le direzioni a secondo delle necessità dell'intero metabolismo cellulare.

Tuttavia, i fenotipi marcatamente alterati, nonostante siano cresciuti in condizioni ottimali, dei mutanti di *Arabidopsis* privi di entrambe le vie di trasporto ciclico di elettroni indicano chiaramente che il trasporto ciclico ha un ruolo fondamentale nel metabolismo energetico delle piante superiori e quindi nella produzione di ATP (Munekage et al., 2004).

A supporto di ciò, l'esempio che più spesso viene fatto, riguarda il ruolo fondamentale del trasporto ciclico nelle cellule della guaina del fascio, tipiche delle piante caratterizzate dal metabolismo C<sub>4</sub> (Johnson, 2011). In queste piante, la CO<sub>2</sub> è fissata nelle cellule del mesofillo sotto forma di uno zucchero a 4 atomi di carbonio, il malato, che è poi trasferito alle cellule della guaina del fascio dove è decarbossilato e la CO<sub>2</sub> è rilasciata in prossimità della RUBISCO che provvederà a fissarla attraverso il ciclo di Calvin-Benson. Durante questo processo

la decarbossilazione del malato produce NADPH nelle cellule della guaina del fascio con un rapporto NADPH:CO<sub>2</sub> pari a 1 e il trasporto ciclico di elettroni nella guaina del fascio, dove l'attività del PSII e quindi il trasporto lineare sono drasticamente ridotti, ha lo scopo di bilanciare il rapporto ATP:NADPH (Majeran and van Wijk, 2009). Infatti, sia il complesso NDH che le proteine PGR5-PGRL1 sono molto più abbondanti nelle cellule della guaina del fascio rispetto alle cellule del mesofillo di piante a metabolismo C<sub>4</sub> o nelle foglie di piante C<sub>3</sub> (Munekage et al., 2010; Takabayashi et al., 2005).

Il trasporto ciclico sembrerebbe avere un ruolo molto importante per la produzione di ATP anche in piante cresciute a bassa luce dove il rapporto PSI:PSII è molto alto (Bailey et al., 2001).

In conclusione, molteplici evidenze indicano che il trasporto ciclico ha un ruolo essenziale anche nella produzione di ATP e quindi nell'ottimizzare il rapporto NADPH:ATP in funzione delle necessità metaboliche della cellula e non solo del ciclo di Calvin-Benson.

## 5. CONCLUSIONI

Grazie alle molteplici evidenze raccolte soprattutto negli ultimi anni per merito di studi di genomica funzionale, possiamo concludere che il trasporto ciclico di elettroni nelle piante superiori ha un ruolo molto importante sia nella protezione da danni ossidativi in condizioni di stress che nella produzione di ATP in condizioni ottimali di crescita. Nei prossimi anni acquisiremo sicuramente molti più dettagli in merito alla regolazione del trasporto ciclico di elettroni e alle proteine e cofattori coinvolti in questo processo. Tali conoscenze saranno di notevole importanza per migliorare la capacità delle piante di adattarsi, innanzitutto, alle diverse condizioni ambientali e proteggersi da danni ossidativi. Inoltre, visto il ruolo fondamentale del trasporto ciclico nelle piante a metabolismo C<sub>4</sub>, la comprensione dettagliata di questo processo fornirà sicuramente spunti importanti per raggiungere uno degli obiettivi più ambiziosi che i biotecnologi vegetali di tutto il mondo si sono dati: la trasformazione di piante di interesse agronomico con metabolismo C<sub>3</sub> in piante molto più produttive con metabolismo C<sub>4</sub>.

## RIASSUNTO

La fase luminosa della fotosintesi ha luogo nelle membrane tilacoidali, all'interno del cloroplasto, e consiste del ben noto trasporto lineare di elettroni, che genera ossigeno

molecolare dall'acqua, ATP e NADPH, e del trasporto ciclico di elettroni che produce soltanto ATP e che per larghi tratti è un processo ancora sconosciuto.

Infatti, nonostante l'esistenza del trasporto ciclico di elettroni sia stata riportata più di 50 anni fa, soltanto negli ultimi 15 anni si è incominciato a comprendere alcuni dei dettagli molecolari alla base di questo processo, grazie soprattutto a studi di genomica funzionale eseguiti sulle piante modello *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum*. Oggi sappiamo che esistono due vie distinte, e in parte ridondanti, responsabili del trasporto ciclico di elettroni: la via che coinvolge il complesso della NAD(P)H deidrogenasi (NDH) e la via che richiede la presenza del complesso PGR5-PGRL1. Nelle piante con metabolismo C3, il trasporto ciclico mediato da PGR5-PGRL1, dipendente dalla Ferredossina e inibito dall'Antamicina A sembra prevalere sul trasporto ciclico dipendente da NDH, che risulta essere particolarmente attivo nelle cellule della guaina del fascio, tipiche delle piante con metabolismo C4.

Analisi genetiche e fisiologiche hanno permesso di stabilire che il trasporto ciclico di elettroni ha un ruolo molto importante nel proteggere le piante da condizioni ambientali di stress e prevenire danni ossidativi, oltre a ottimizzare la resa fotosintetica. La conoscenza dettagliata di questo processo sarà sicuramente utile per ottenere piante più resistenti agli stress ambientali e più produttive.

#### ABSTRACT

The light phase of photosynthesis takes place onto the chloroplast thylakoid membranes and is made of the well-known linear electron transport that leads to the production of oxygen from water, ATP and NAD(P)H and of the almost unknown cyclic electron transport around photosystem I, that exclusively generates ATP. Despite the cyclic electron transport has been reported more than 50 years ago, only recently few molecular details of this process have been revealed via functional genomics studies on the model species *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*.

Nowadays, it is known that two independent and partially redundant cyclic electron transport pathways exist in higher plant chloroplasts: the NAD(P)H dehydrogenase-dependent pathway (NDH) and the PGR5-PGRL1-dependent pathway.

Plants characterized by C3-metabolism show a high activity of the PGR5-PGRL1-dependent pathway, whereas the NDH-dependent cyclic electron transport is highly active in the vascular bundle sheath cells, typical of C4-plants.

Genetic and physiological analyses have shown that cyclic electron transport plays a major role in protection from environmental stresses, preventing oxidative damages, and in the optimization of photosynthetic performance. It appears clear that the deep knowledge of this process will be extremely useful with respect to biotechnological approaches aimed to obtain plants more resistant to stress conditions and more productive, i.e. through the transformation of C3-plants into plants with a C4 metabolism.

#### BIBLIOGRAFIA

ALLEN J.F. (2003): *Cyclic, pseudocyclic and noncyclic photophosphorylation: new links in the chain*, «Trends Plant Sci.», 8, pp. 15-19.

- ARNON D.I., ALLEN M.B., WHATLEY F.R. (1954): *Photosynthesis by isolated chloroplasts*, «Nature», 174, pp. 394-396.
- ARNON D.I., ALLEN M.B., WHATLEY F.R. (1958): *Assimilatory power in photosynthesis*, «Science», 127, pp. 1026-1034.
- ARNON D.I. (1991): *Photosynthetic electron transport: Emergence of a concept*, «Photosynth. Res.», 29, pp. 117-131.
- BAILEY S., WALTERS R.G., JANSSON S., HORTON P. (2001): *Acclimation of Arabidopsis thaliana to the light environment: the existence of separate low light and high light responses*, «Planta», 213, pp. 794-801.
- BENDALL D.S., MANASSE R.S. (1995): *Cyclic photophosphorylation and electron transport*, «Biochim. Biophys. Acta», 1229, pp. 23-38.
- BIEHL A., RICHLI E., NOUTSOS C., SALAMINI F., AND LEISTER D. (2005): *Analysis of 101 nuclear transcriptomes reveals 23 distinct regulons and their relationship to metabolism, chromosomal gene distribution and co-ordination of nuclear and plastid gene expression*, «Gene», 344, pp. 33-41.
- BONARDI V., PESARESI P., BECKER T., SCHLEIFF E., WAGNER R., PEANNSCHMIDT T., JAHNS P., LEISTER D. (2005): *Photosystem II core phosphorylation and photosynthetic acclimation require two different protein kinases*, «Nature», 437, pp. 1179-1182.
- BURROWS P.A., SAZANOV L.A., SVAB Z., MALIGA P., NIXON P.J. (1998): *Identification of a function respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid ndh genes*, «EMBO J.», 17, pp. 868-876.
- CLARKE J.E., JOHNSON G.N. (2001): *In vivo temperature dependence of cyclic and pseudo-cyclic electron transport in barley*, «Planta», 212, pp. 808-816.
- DALCORO G., PESARESI P., MASIERO S., ASEVA E., NEMANN D.S., FINAZZI G., JOLIOT P., BARBATO R., LEISTER D. (2008): *A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in Arabidopsis*, «Cell», 132, pp. 273-285.
- DEMMIG-ADAMS B., ADAMS W.W. III, BAKER D.H., LOGAN B.A., BOWLING D.R., ET AL. (1996): *Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excessive excitation*, «Physiol. Plant.», 98, pp. 253-264.
- EFREMOV R.G., BARADRAN R., SAZANOV L.A. (2010): *The architecture of respiratory complex I*, «Nature», 465, pp. 441-445.
- ENDO T., SHIKANAI T., TAKABAYASHI A., ASADA K., SATO F. (1999): *The role of chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in photoprotection*, «FEBS Lett.», 457, pp. 5-8.
- FINAZZI G., RAPPAPORT F., FURIA A., FLEISCHMANN M., ROCHAIX J.D., ZITO F., FORTI G. (2002): *Involvement of state transitions in the switch between linear and cyclic electron flow in Chlamydomonas reinhardtii*, «EMBO Rep.», 3, pp. 280-285.
- FORK D.C., HERBERT S.K. (1993): *Electron transport and photophosphorylation by photosystem I in vivo in plants and cyanobacteria*, «Photosynth. Res.», 36, pp. 149-68.
- HILL R., BENDALL F. (1960): *Function of the cytochrome components in chloroplasts: A working hypothesis*, «Nature», 186, pp. 136-137.
- IWAI M., TAKIZAWA K., TOKUTSU R., OKAMURO A., TAKAHASHI Y., MINAGAWA J. (2010): *Isolation of the elusive supercomplex that drives cyclic electron flow in photosynthesis*, «Nature», 464, pp. 1210-1213.
- LEHTIMÄKI N., LINTALA M., ALLAHVERDIYEVA Y., ARO E.M., MUÑOZ P. (2010): *Drought stress-induced upregulation of components involved in ferredoxin-dependent cyclic electron transport*, «J. Plant Physiol.», 167, pp. 1018-1022.
- MAJEREN W., VAN WIJK K.J. (2009): *Cell-type-specific differentiation of chloroplasts in C4 plants*, «Trends Plant Sci.», 14, pp. 100-109.

- MATSUBAYASHI T., WAKASUGI T., SHINOZAKI K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., ZAITA N., HIDAKA T., MENG B.Y., OHTO C., TANAKA M., KATO A., MARUYAMA T., SUGIURA M. (1987): *Six chloroplast genes (ndhA-F) homologous to human mitochondrial genes encoding components of the respiratory chain NADH dehydrogenase are actively expressed: determination of the splice sites in ndhA and ndhB pre-mRNAs*, «Mol. Gen. Genet.», 210, pp. 385-393.
- MUNEKAGE Y., HOJO M., MEURER J., ENDO T., TASAKA M., ET AL. (2002): *PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in Arabidopsis*, «Cell», 110, pp. 361-371.
- MUNEKAGE Y., HASHIMOTO M., MIYAKE C., TOMIZAWA K., ENDO T., (2004): *Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis*, «Nature», 429, pp. 579-582.
- MUNEKAGE Y., SHIKANAI T. (2005): *Cyclic electron transport through photosystem I*, «Plant Biotechnol.», 22, pp. 361-369.
- MUNEKAGE Y., EYMERY D., RUMEAU S., CUINE M., OGURI M., NAKAMURA A., YOKOTA A., GENTY B., PELTIER G. (2010): *Elevated expression of PGR5 and NDH-H in bundle sheath chloroplasts in C-4 flaveria species*, «Plant Cell Physiol.», 51, pp. 664-668.
- MUNNÈ-BOSCH S., SHIKANAI T., ASADA K. (2005): *Enhanced ferredoxin-dependent cyclic electron flow around photosystem I and  $\alpha$ -tocopherol quinone accumulation in water-stressed ndh-B-inactivated tobacco mutants*, «Planta», 222, pp. 502-511.
- JOHNSON G.N. (2011): *Physiology of PSI cyclic electron transport in higher plants*, «Biochim. Biophys. Acta», 1807, pp. 906-911.
- KOFER W., KOOP H.U., WANNER G., STEINMULLER K. (1998): *Mutagenesis of the genes encoding subunits A, C, H, I, J and K of the plastid NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase in tobacco by polyethylene glycol-mediated plastome transformation*, «Mol. Gen. Genet.», 258, pp. 166-173.
- NIYOGI K.K., LI X.P., ROSENBERG V., JUNG H.S. (2005): *Is PsbS the site of nonphotochemical quenching in photosynthesis?*, «J. Exp. Bot.», 56, pp. 375-382.
- OHYAMA K., KOHCHI T., SANO T., YAMADA Y. (1988): *Newly identified groups of genes in chloroplasts*, «Trends Biochem Sci.», 13, pp. 19-22.
- PENG L., FUKAO M., FUJIWARA M., TAKAMI T., SHIKANAI T. (2009): *Efficient operation of NAD(P)H dehydrogenase requires the supercomplex formation with photosystem I via minor LHCl in Arabidopsis*, «Plant Cell», 21, pp. 3623-3640.
- PENG L., YAMAMOTO H., SHIKANAI T. (2011): *Structure and biogenesis of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex*, «Bioch. Biophys. Acta», 1807, pp. 945-953.
- PETROUTSOS D., TERAUCHI A.M., BUSCH A., HIRSCHMANN I., MERCHANT S.S., FINAZZI G., HIPPLER M. (2009): *PGR1 participates in iron-induced remodeling of the photosynthetic apparatus and in energy metabolism in Chlamydomonas reinhardtii*, «J. Biol. Chem.», 284, pp. 32770-32781.
- REILAND S., FINAZZI G., ENDLER A., WILLIG A., BAERENFALLER K., GROSSMANN J., GERITS B., RUTISHAUSER D., GRUISSEM W., ROCHAIX J.D., BAGINSKY S. (2011): *Comparative phosphoproteome profiling reveals a function of the STN8 kinase in fine-tuning of cyclic electron flow (CEF)*, «Proc Natl Acad Sci U S A.», 108, pp. 12955-12960.
- SHIKANAI T., ENDO T., HASHIMOTO T., YAMADA Y., ASADA K., ET AL. (1998): *Directed disruption of the tobacco ndhB gene impairs cyclic electron flow around photosystem I*, «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 95, pp. 9705-9709.
- SHIKANAI T., MUNEKAGE Y., SHIMIZU K., ENDO T., HASHIMOTO T. (1999): *Identification and characterization of Arabidopsis mutants with reduced quenching of chlorophyll fluorescence*, «Plant Cell Physiol.», 40, pp. 1134-1142.

- SHIKANAI T. (2007): *Cyclic Electron Transport Around Photosystem I: Genetic Approaches*, «Annu. Rev. Plant Biol.», 58, pp. 199-217.
- SHINOZAKI K., OHME M., TANAKA M., WAKASUGI T., HAYASHIDA N., MATSUBAYASHI T. ET AL. (1986): *The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression*, «EMBO J.», 5, pp. 2043-2049.
- SUGIURA M. (1992): *The chloroplast genome*, «Plant Mol. Biol.», 19, pp. 149-168.
- TAGAWA K., TSUJIMOTO H.Y., ARNON D.I. (1963): *Role of chloroplast ferredoxin in the energy conversion process of photosynthesis*, «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 49, pp. 567-572 .
- TAKABAYASHI A., KISHINE M., ASADA K., ENDO T., SATO F. (2005): *Differential use of two cyclic electron flows around photosystem I for driving CO<sub>2</sub>-concentration mechanism in C-4 photosynthesis*, «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 102, pp. 16898-16903.
- WANG P., DUAN W., TAKABAYASHI A., ENDO T., SHIKANAI T., ET AL. (2006): *Chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in tobacco leaves functions in alleviation of oxidative damage caused by temperature stress*, «Plant Physiol.», 141, pp. 465-474.



## Meccanismi di regolazione redox nel cloroplasto

### I. REGOLAZIONE REDOX

I primi meccanismi di regolazione cellulare basati sulla variazione dello stato redox di gruppi tiolici in specifiche proteine sono stati scoperti nell'ambito del processo fotosintetico (Schurmann e Jacquot, 2000), ma attualmente è nota la loro diffusione ubiquitaria in molti ambiti della biologia. Questo tipo di regolazione si è sviluppato in tutti gli organismi con metabolismo aerobio, dove l'adattamento alle condizioni ossidanti che si possono generare all'interno della cellula dipende da processi metabolici capaci di ripristinare le condizioni riducenti necessarie alla vita. Evidenze sperimentali hanno suggerito come nelle piante la regolazione redox svolga un ruolo fondamentale nella risposta allo stress ossidativo modulando processi cellulari quali la trascrizione, la traduzione e diverse vie metaboliche (Buchanan e Balmer, 2005). Il meccanismo d'azione alla base di questo tipo di regolazione prevede una variazione dello stato redox di alcune cisteine proteiche, le quali possono oscillare tra la forma ossidata e quella ridotta (*i.e.* interscambio disolfuro/ditiolo,  $S-S \leftrightarrow SH$ ). Il diverso stato di ossidazione o di riduzione di queste cisteine comporta modificazioni conformazionali che possono influenzare sia la regolazione che le capacità catalitiche degli enzimi bersaglio.

### 2. NATURA DEGLI AMINOACIDI COINVOLTI E TIPI DI LEGAMI POSSIBILI

Il ruolo fondamentale dello zolfo, in campo biologico, è determinato dalle

\* *Laboratorio di Biologia redox dei sistemi vegetali, Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie (Fa-Bit), Università di Bologna*

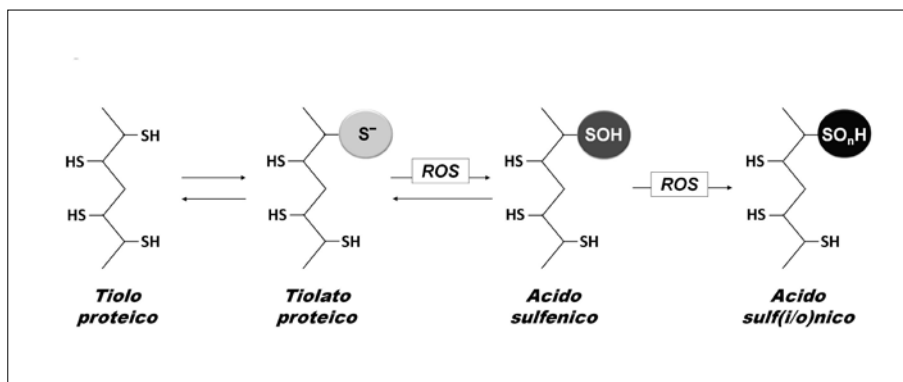


Fig. 1 *I diversi stati di ossidazione delle cisteine proteiche*

sue caratteristiche chimico-fisiche che gli conferiscono particolari capacità redox e catalitiche. Lo zolfo, anche nei sistemi biologici, esiste in diversi stati di ossidazione, con numeri di ossidazione che vanno da -2 nei gruppi tiolici (R-SH), a +4 nei solfonati anionici (R-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e +6 nel solfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). Negli aminoacidi, lo zolfo è presente sia nei residui di metionina (Met) che di cisteina (Cys). Nelle proteine, la Met si trova in due forme principali: la più abbondante dove lo zolfo risulta ridotto (R-S-CH<sub>3</sub>) e una forma più rara in cui lo zolfo è ossidato (metionina sulfossido, R-SO-CH<sub>3</sub>). La Cys è più versatile perché nello stato ridotto (-SH) può subire deprotonazione acquisendo lo stato tiolato (-S<sup>-</sup>) oppure ossidarsi generando ponti disolfuro (-S-S-) o altri stati di ossidazione quali l'acido sulfenico (R-SOH), l'acido sulfonico (R-SO<sub>2</sub>H) e l'acido solfonico (R-SO<sub>3</sub>H) (Jacob et al., 2006; Zaffagnini et al., 2012a, 2012b) (fig. 1). A differenza dei ponti disolfuro e dell'acido sulfenico, che sono modificazioni proteiche considerate reversibili nei sistemi biologici, le ultime due sono modificazioni irreversibili e possono condurre ad alterazioni della struttura proteica generalmente accompagnate da una perdita di funzione e aumento alla suscettibilità alle proteasi o alla denaturazione (Montrichard et al., 2009). I diversi stati di ossidazione delle Cys sono dipendenti dallo stato redox intracellulare, il quale può subire variazioni in seguito a condizioni di stress (Noctor e Foyer, 2005). In condizioni fisiologiche ottimali (*i.e.* riducenti) è favorito il mantenimento dello stato ridotto delle Cys, mentre, in condizioni di stress, un aumento della formazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) può portare all'ossidazione di questi residui. La probabilità di subire modificazioni ossidative dipende dalla reattività dei tioli, che può essere molto variabile nei diversi casi (Winterbourn e Hampton, 2008). La reattività

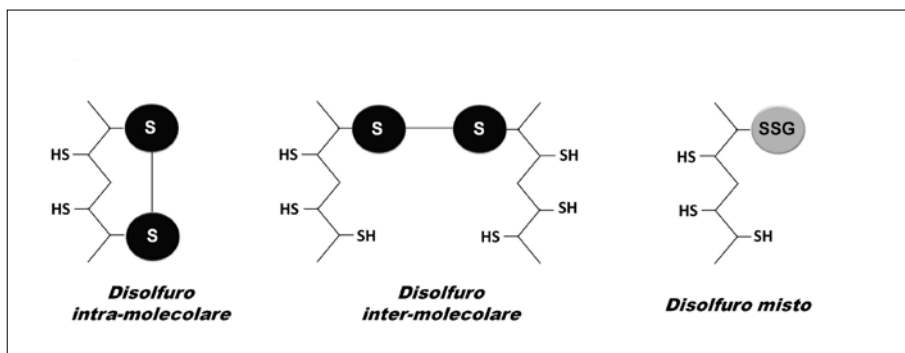


Fig. 2 Tipologie di legame disolfuro: intra-molecolare, inter-molecolare e misto

dipende dal  $pK_a$  specifico di ogni tiolo che determina il suo stato di protonazione ( $-SH$ )/deprotonazione ( $-S^-$ ) in relazione all'intorno molecolare (es. interazione con aminoacidi basici che favoriscono la deprotonazione del tiolo). La maggiorparte delle Cys proteiche presenta un  $pK_a$  maggiore di 8 e quindi, al pH fisiologico dei principali compartimenti intracellulari (valori compresi tra 7 e 8), tali residui si trovano in forma protonata ( $-SH$ ) e sono conseguentemente poco reattivi nei confronti delle ROS (Dalle-Donne et al., 2007). Al contrario, alcune Cys vengono definite reattive perché hanno valori di  $pK_a$  intorno a 6 o inferiori (Zaffagnini et al., 2012b). Tali Cys reattive si troveranno quindi in forma tiolata ( $-S^-$ ) a pH fisiologici e saranno suscettibili all'attacco da parte delle ROS (Dalle-Donne et al., 2007). L'interazione delle ROS con i tioli proteici può portare, se presente una seconda Cys a distanza opportuna, alla formazione di un ponte disolfuro che può proteggere le Cys reattive da un'eventuale ossidazione irreversibile. Infatti, i legami disolfuro sono piuttosto stabili e inerti, e possono rappresentare una strategia di difesa per ovviare all'inattivazione e alla degradazione proteica. Inoltre, i ponti disolfuro possono costituire un meccanismo di regolazione dell'attività della proteina. Da questo punto di vista vengono generalmente catalogati in tre gruppi: intramolecolari, intermolecolari e disolfuri misti (fig. 2). I legami intramolecolari sono molto comuni e coinvolgono due Cys presenti sullo stesso polipeptide. Nella struttura primaria questi residui possono essere localizzati vicini e distanti. Nel secondo caso, le due Cys coinvolte sono sufficientemente vicine nel folding nativo della proteina da permettere la formazione del ponte disolfuro. Per quel che concerne i legami intermolecolari, questi si formano tra Cys localizzate in polipeptidi (e.g. subunità) diversi. Il terzo tipo di legame, consiste in un disolfuro misto e

prevede il legame di una Cys proteica con la cisteina di una molecola di glutatione (GSH).

### 3. REGOLAZIONE ENZIMATICA LUCE-DIPENDENTE

I carboidrati, nella cellula vegetale, costituiscono la fonte principale di energia per il metabolismo cellulare. La trasformazione di acqua e CO<sub>2</sub> in carboidrati è un processo che avviene nello stroma del cloroplasto ed è strettamente dipendente dalla luce solare, una fonte di energia che per sua natura è di intensità variabile nel corso della giornata e assente di notte. Gli organismi fotosintetici hanno sviluppato complicati meccanismi regolativi per ottimizzare il metabolismo cellulare in funzione della disponibilità di energia solare. Alla luce gli enzimi coinvolti nell'assimilazione del carbonio sono attivi, mentre gli enzimi coinvolti nella degradazione dei prodotti di riserva della fotosintesi vengono inattivati o comunque sottoposti a una forte inibizione. Al buio invece, sono attivati gli enzimi necessari al catabolismo di parte dei fotosintati accumulati durante il giorno, per provvedere alla formazione dell'energia metabolica (Schurmann, 2003). La luce, captata dai pigmenti fotosintetici dei complessi delle membrane tilacoidali, svolge in modo indiretto un'azione di controllo sul metabolismo attraverso il sistema redox ferredossina/tioredoossina. Tale sistema permette l'attivazione o l'inattivazione di specifici enzimi bersaglio mediante reazioni di interscambio ditiolo/disolfuro (Buchanan e Balmer, 2005). Il sistema agisce trasformando il segnale elettronico, proveniente dal fotosistema I, in un segnale biochimico che coinvolge, in prima istanza, tre proteine: la ferredossina (Fd), la ferredossina tioredoossina riduttasi (FTR) e la tioredoossina (Trx). Oltre alla regolazione mediata dal sistema Fd/Trx, l'attività di questi enzimi è modulata anche da altri fattori cellulari dipendenti dalla luce, quali il pH e la concentrazione dei metaboliti (Scheibe et al., 1991).

#### 3.1 *Il sistema ferredossina/tioredoossina*

Il sistema Fd/Trx è composto da tre proteine solubili: la Fd, l'FTR e la Trx (Schurmann, 2003) (fig. 3). Alla luce, la Fd è ridotta dagli elettroni proveniente dal fotosistema I e trasferisce elettroni a diversi enzimi tra i quali l'FTR. Quest'ultima gioca un ruolo centrale nel sistema Fd/Trx, in quanto permette il trasferimento degli elettroni dalla Fd alla Trx e di conseguenza agli

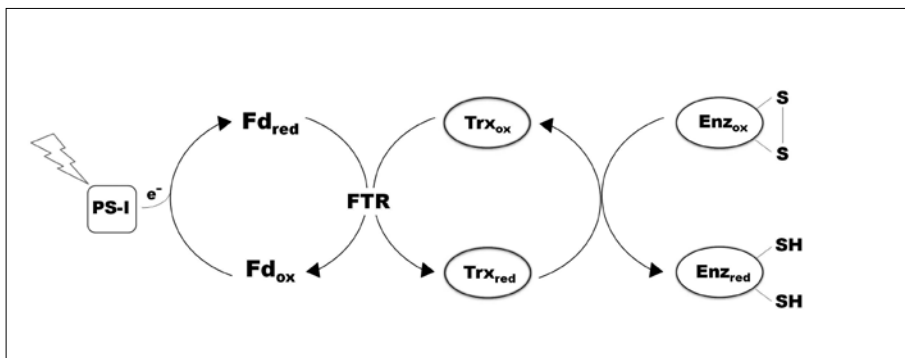


Fig. 3 Schema del sistema ferredossina/tioredoxina. Abbreviazioni: PS-I, fotosistema I; Fd, ferredossina; FTR, tioredossina ferredossina riduttasi; Trx, tioredossina; Enz, enzima bersaglio; red, ridotto; ox, ossidato

enzimi bersaglio mediante reazioni di scambio ditiolo/disolfuro (Buchanan e Balmer, 2005).

### 3.1.1 La ferredossina

Nelle piante, la ferredossina (Fd) è una piccola proteina solubile di circa 12 kDa, che presenta un *cluster* [2Fe-2S] con potenziale redox che si aggira intorno a  $-400$  mV. La Fd viene fisiologicamente ridotta dal fotosistema I alla luce, e costituisce il primo trasportatore elettronico che si può staccare dal fotosistema I e diffondere nello stroma. Le strutture tridimensionali di Fd di specie diverse presentano una forte similarità (Dai et al., 2000). Tali strutture presentano lo stesso tipo di *folding* ed espongono due tasche con cariche negative dalla stessa parte del *cluster* Fe-S, le quali sono essenziali per l'interazione con altre proteine (Schurmann e Jacquot, 2000). Mediante un legame ad alta affinità, la Fd forma con l'FTR un complesso elettrostaticamente stabile con stechiometria 1:1 che favorisce il trasferimento elettronico dalla prima proteina alla seconda (Hirasawa, 1998).

### 3.1.2 La ferredossina tioredossina riduttasi

La ferredossina tioredossina riduttasi (FTR) è un enzima presente esclusivamente negli organismi fotosintetici (Dai et al., 2000). Questa proteina

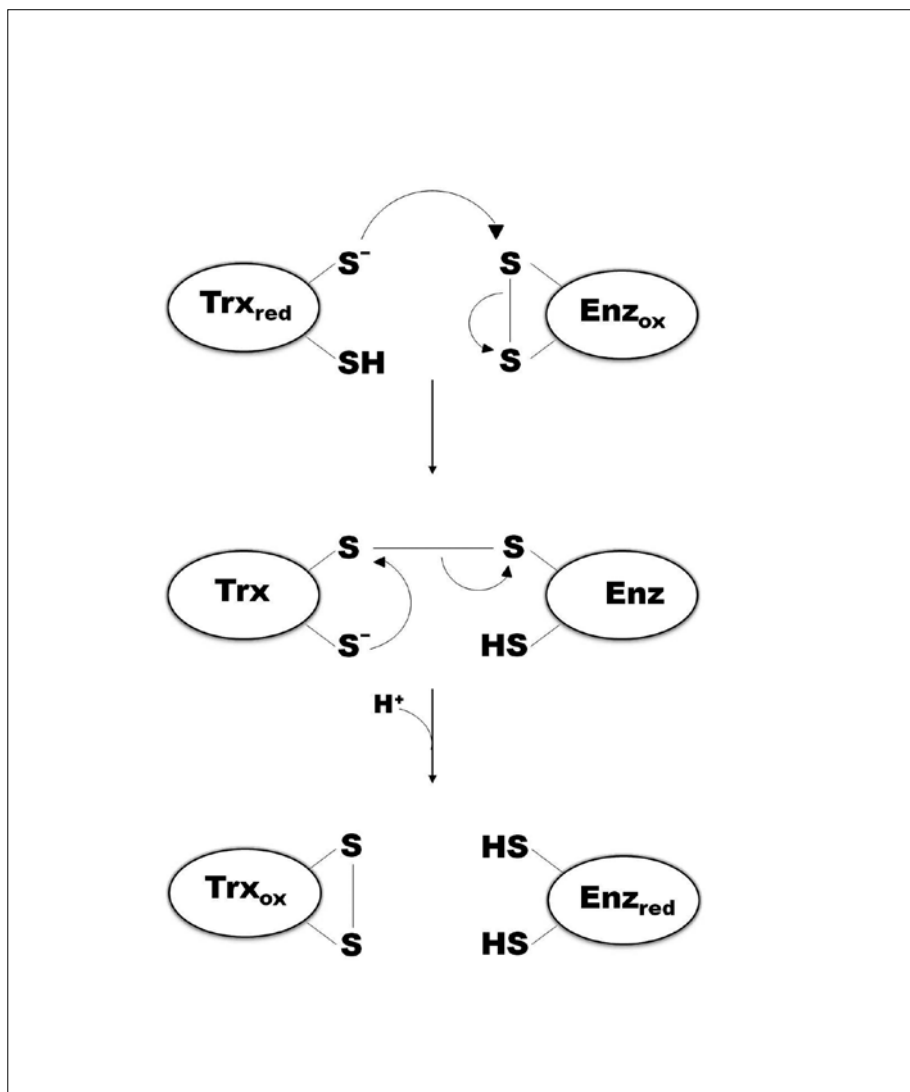


Fig. 4 *Meccanismo di azione delle Trx*

ha un peso molecolare di circa 20-25 kDa ed è composta da una subunità catalitica e una variabile, entrambe codificate dal genoma nucleare. La subunità variabile sembra avere una mera funzione strutturale (Dai et al., 2000) e il suo nome dipende dalla porzione N-terminale che è di lunghezza variabile nelle diverse specie. La subunità catalitica, responsabile del colore giallo-bruno della proteina, contiene un unico *cluster* [4Fe-4S] e presenta

una sequenza primaria conservata che comprende sette cisteine, quattro delle quali coinvolte nel legame con il ferro e 2 coinvolte nella formazione del ponte disolfuro (Schurmann e Jacquot, 2000). La struttura cristallografica della FTR del cianobatterio *Synechocystis sp. PCC 6803* è stata ottenuta con una risoluzione di 1.6 Å (Dai et al., 2000) e ha permesso di individuare una prevalenza di filamenti  $\beta$  nella subunità variabile e di  $\alpha$ -eliche in quella catalitica. Le due subunità si dispongono una sopra l'altra così da formare una struttura di forma lenticolare. Lo spessore della porzione centrale del disco è di circa 10 Å ed è qui che sono localizzate le strutture funzionalmente importanti: il *cluster* Fe-S e, adiacente a esso, il ponte disolfuro attivo. Il *cluster* Fe-S risulta accessibile solo da un lato, ossia quello di legame con la Fd, mentre il ponte disolfuro è accessibile dalla parte opposta, nel sito di legame della Trx. Questa particolare struttura rende possibile il legame contemporaneo dell'FTR con la Fd, che dona l'elettrone, e con la Trx, che lo accetta. Queste interazioni sono favorite dalla presenza nel sito di legame della Fd di quattro residui carichi positivamente e di residui idrofobici nel sito di legame della Trx (Schurmann, 2000).

### 3.1.3 La tioredossina

Le tioredossine (Trx) sono piccole ossidoreduttasi di circa 12 kDa presenti in tutti gli organismi viventi, eccetto alcuni patogeni umani (Buchanan e Balmer, 2005). Le Trx sono caratterizzate da un motivo strutturale, denominato *Trx-fold*, costituito da 4  $\alpha$ -eliche che circondano 5 filamenti  $\beta$ . Il ruolo prevalente svolto dalle Trx consiste nella modulazione enzimatica, attuata mediante la riduzione dei ponti disolfuro presenti su proteine bersaglio. Tale funzione è da attribuire alla presenza di due Cys reattive nel sito attivo dell'enzima (all'interno della sequenza WC[G/P]PC) che possono formare un ponte disolfuro cataliticamente attivo. Il meccanismo di riduzione dei disolfuri in proteine bersaglio, consiste in un attacco nucleofilo da parte della Cys N-terminale del sito attivo della Trx sul ponte disolfuro della proteina bersaglio con conseguente formazione di un eterodisolfuro transitorio. L'attacco della Cys C-terminale della Trx sull'eterodisolfuro porta alla liberazione della proteina target in forma ridotta (*i.e.* ditiolica) e alla formazione di un disolfuro nella Trx (*i.e.* Trx ossidata) (Collet e Messens, 2010) (fig. 4). La forma ridotta della Trx viene rigenerata mediante donatori di elettroni diversi a seconda del comparto cellulare in questione. Nei tessuti fotosintetici, le Trx sono ridotte dalla FTR, con elettroni proveniente dalla Fd foto-ridotta dal fotosistema I,

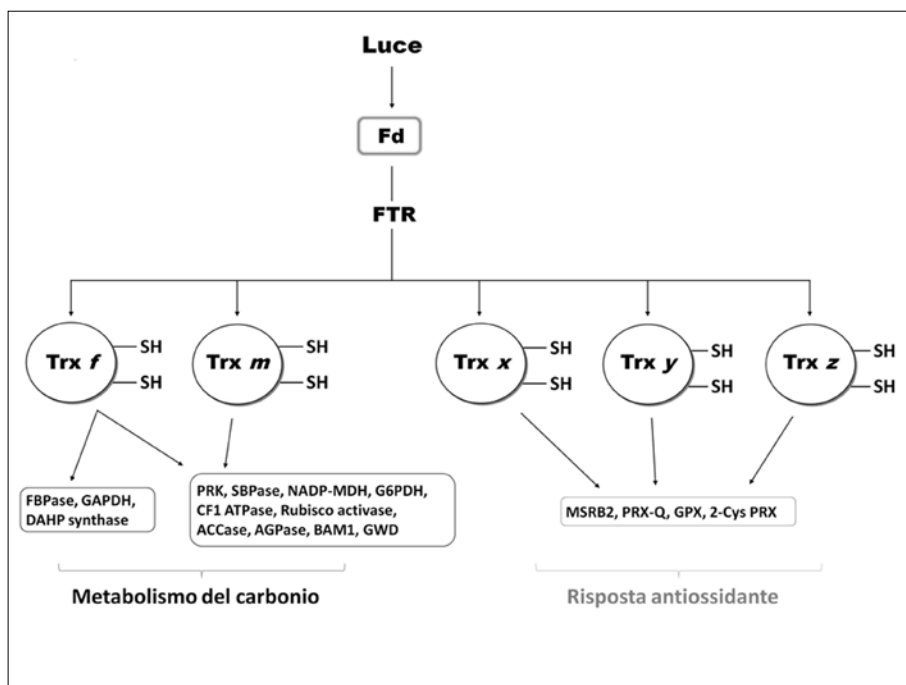


Fig. 5 Rappresentazione delle diverse classi di Trx cloroplastiche e della loro specificità sulla base delle informazioni note. Le Trx della classe *f* e *m* sono specifiche per il metabolismo del carbonio mentre le Trx *x*, *y* e *z* risultano specifiche per la risposta antiossidante

mentre nei tessuti non fotosintetici, le Trx ridotte sono rigenerate grazie al NADPH attraverso la NADPH tioredossina reduttasi (NTR).

Inizialmente, nelle piante furono identificate due sole isoforme cloroplastiche di Trx, la *m* e la *f*, le quali sembravano avere un ruolo limitato alla regolazione redox di pochi enzimi coinvolti nel metabolismo del carbonio (Schurmann e Jacquot, 2000). Studi più recenti hanno dimostrato come, nelle piante superiori, le Trx siano presenti anche nel citosol, nei mitocondri, nel nucleo e nel reticolo endoplasmatico (Buchanan e Balmer, 2005). Nel genoma di due organismi fotosintetici modello, l'angiosperma *Arabidopsis thaliana* e l'alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, sono stati identificati geni che codificano rispettivamente per 20 e 6 differenti Trx, le quali possono essere raggruppate in diverse classi (Buchanan e Balmer, 2005). Il raggruppamento delle Trx in classi è basato principalmente sulle differenze di identità di sequenza. Le diverse classi di Trx, e di conseguenza le diverse isoforme, presentano una caratteristica localizzazione intracellulare. Le Trx di tipo *h*, che sono le più numerose, sono distribuite in



diversi compartimenti quali il citosol, il nucleo, il reticolo endoplasmatico e i mitocondri; le Trx di tipo *o* sono anch'esse presenti nei mitocondri. Nei cloroplasti invece, oltre alle classi *f* e *m*, sono presenti le classi *x*, *y* e *z* (Lemaire et al., 2003; Chibani et al., 2012) (fig. 5).

### 3.2 *TioredoSSine cloroplastiche: bersagli e specificità*

#### 3.2.1 I bersagli delle Trx: la situazione fino agli inizi del millennio

Durante il decennio 1990-2000 si è molto indagato sulla regolazione Trx-dipendente di diversi enzimi bersaglio e sull'identificazione delle Cys coinvolte in tale regolazione. Le prime evidenze sperimentali avevano dimostrato come i principali enzimi coinvolti nella regolazione redox mediata da Cys fossero alcuni enzimi del Ciclo di Calvin-Benson, ma non era noto se tale regolazione fosse estendibile ad altri enzimi cloroplastici (Lemaire et al., 2007). Per tali informazioni, rese possibili solo grazie all'avvento di nuove metodiche basate sull'approccio proteomico, si dovrà aspettare almeno un altro decennio (vedi paragrafo 3.2.2). Come descritto in precedenza, le prime Trx scoperte, e a lungo ritenute le uniche dei cloroplasti, sono state quelle di tipo *f* e *m*, chiamate così perché originariamente individuate come Trx rispettivamente specifiche nel riattivare la fruttosio-1,6-bisfosfato fosfatasi (FBPasi) e la malato deidrogenasi NADPH-dipendente (NADP-MDH) (Schurmann e Jacquot, 2000), enzimi entrambi coinvolti nel metabolismo del carbonio nei cloroplasti stessi. Oltre alla FBPasi, anche altri enzimi del Ciclo di Calvin-Benson vengono regolati specificamente o preferenzialmente dalla Trx *f*, tra questi la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GADPH), la sedoeptulosio-1,7-bisfosfato fosfatasi (SBPasi), la fosforibulochinasi (PRK) e la Rubisco attivasi (Schurmann e Jacquot, 2000) (fig. 6). La Rubisco attivasi non partecipa direttamente al Ciclo di Calvin-Benson, ma ne influenza profondamente l'attività regolando lo stato di attivazione della Rubisco. Analisi comparative tra le sequenze degli enzimi cloroplastici regolati dalle Trx e le corrispondenti isoforme localizzate nel citosol hanno dimostrato come la sequenza che permette la regolazione da tioredossine delle isoforme cloroplastiche sia stata acquisita nel corso dell'evoluzione (Ruelland e Miginiac-Maslow, 1999). Nel caso della NADP-MDH, le sequenze contenenti le Cys regolative costituiscono delle estensioni N- e C-terminali, tipiche dell'isoforma cloroplastica, ma assenti nell'isoforma citosolica. Anche nell'isoforma più abbondante della GAPDH dei cloroplasti ( $A_2B_2$ ), si ritrova un'estensione C-terminale regolativa nelle subunità di tipo B ma non nelle subunità di tipo

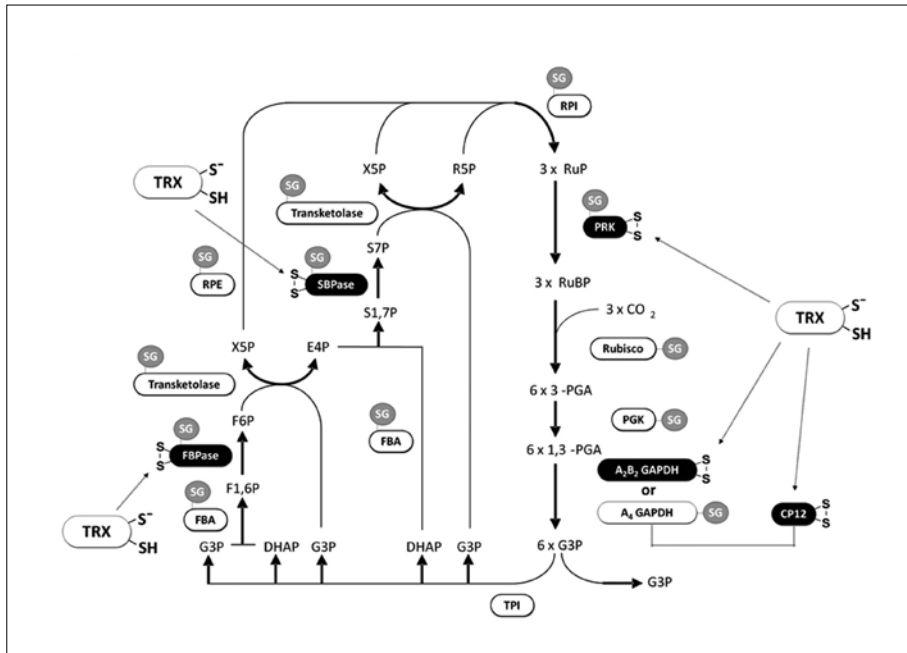


Fig. 6 *Regolazione redox degli enzimi del ciclo di Calvin-Benson. Tutti gli enzimi del ciclo sono stati identificati come bersagli potenziali della regolazione Trx-dipendente basata sull'interscambio ditiolo/disolfuro (bersagli conosciuti, riquadro nero e scritta bianca; bersagli potenziali, riquadro bianco con bordo nero e scritta nera) e/o della glutattonilazione (SG in riquadro grigio). FBA, fruttosio-1,6-bisfosfato aldolasi; FBPasi, fruttosio-1,6-bisfosfato fosfatasi; GAPDH, gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi; PGK, fosfoglicerato chinasi; PRK, fosforibulochinasi; RPE, ribulosio fosfato-3-epimerasi; RPI, ribosio-5-fosfato isomerasi; Rubisco, ribulosio-1,5-bisfosfato carbossilasi/ossigenasi; SBPasi, sedoepulosio-1,7-bisfosfato fosfatasi; TPI, trioso fosfato isomerasi; 3-PGA, 3-fosfoglicerato; DHAP, diidrossiacetone fosfato; E4P, eritroso-4-fosfato; F1,6P, fruttosio-1,6-bisfosfato; F6P, fruttosio-6-fosfato; G3P, gliceraldeide-3-fosfato; R5P, ribosio-5-fosfato; RuBP, ribulosio-1,5-bisfosfato; RuP, ribulosio-5-fosfato; S1,7P, sedoepulosio-1,7-bisfosfato; S7P, sedoepulosio-7-fosfato; X5P, xilulosio-5-fosfato*

A, né nelle subunità di tipo C dell'isoforma citosolica (Fermani et al., 2007). Viceversa, nel caso della FBPasi, le Cys regolative sono inserite all'interno della sequenza e non si riconoscono delle vere e proprie sequenze aggiuntive.

### 3.2.2 I bersagli delle Trx: dal 2000 a oggi

Non si dispone, a tutt'oggi, di un quadro complessivo degli enzimi cloroplastici regolati dalle Trx e ciò comporta una forte limitazione nella comprensio-

ne della regolazione redox mediata da queste proteine. Tuttavia con l'avvento di metodologie proteomiche basate sull'utilizzo di cromatografia ad affinità e spettrometria di massa, sono stati identificati nell'ultimo decennio circa 400 potenziali proteine bersaglio coinvolte in numerosi processi metabolici (Montrichard et al., 2009; Buchanan e Balmer, 2005). I risultati ottenuti hanno permesso una maggiore comprensione del ruolo delle Trx, tanto nelle piante terrestri quanto nelle alghe e nei cianobatteri (Montrichard et al., 2009; Lemaire et al., 2007). Questi studi hanno identificato come potenziali bersagli della regolazione da parte delle Trx diversi enzimi coinvolti nella biosintesi degli isoprenoidi, dei tetrapirroli, delle vitamine (in particolare della tiamina o vitamina B1), nell'assemblaggio/folding proteico, nella degradazione dell'amido, nella glicolisi, nell'equilibrio bicarbonato/ $\text{CO}_2$ , nella degradazione proteica, nel metabolismo dello zolfo, nel ciclo ossidativo dei pentosi fosfati, nel metabolismo dell'azoto e nella replicazione del DNA. Inoltre, sono stati identificati anche tutti gli 11 enzimi del ciclo di Calvin-Benson, oltre a due proteine regolative a esso associate: la già citata Rubisco attivasi e il CP12 (piccola proteina destrutturata che regola l'attività di GAPDH e PRK, Trost et al., 2006) (fig. 6). Possiamo quindi prevedere che la regolazione redox possa potenzialmente controllare numerosi processi metabolici, anche molto diversi tra loro, non solo all'interno dei cloroplasti, ma in molti se non tutti i compartimenti della cellula vegetale.

### 3.2.3 La specificità delle Trx

La visione che si possedeva fino alla fine degli anni 1990 del ruolo delle Trx era relativamente semplice. Le sole Trx note appartenevano alle classi *h*, *m* e *f*. Mentre la prima comprende isoforme localizzate sia nel citosol che nei mitocondri, le ultime due sono esclusive del cloroplasto. Il sequenziamento del genoma di *Arabidopsis* ha svelato una situazione più complessa, soprattutto per quanto riguarda i plastidi. Infatti, oltre alle Trx *f* e *m*, sono state scoperte altre classi di Trx cloroplastiche denominate *x*, *y* e *z* (fig. 5). Inoltre, è stato anche evidenziato che ognuna di queste classi contiene una o più forme isoenzimatiche (2 per la *f*, 4 per la *m*, 1 per la *x*, 2 per la *y* e 1 per la *z*) (Collin et al., 2003, 2004; Chibani et al., 2012). Anche l'analisi del genoma di *Chlamydomonas* ha evidenziato una situazione analoga a quella riscontrata in *Arabidopsis*, con le classiche Trx cloroplastiche di tipo *f*, *e*, *m*, e le due classi aggiuntive *x* e *y* (Lemaire et al., 2003, 2004). La molteplicità di Trx negli organismi fotosintetici ha generato domande relative alla loro

specificità e alla loro possibile ridondanza funzionale. In effetti, non è stato facile assegnare una funzione specifica a ogni membro delle varie classi. Per investigare la specificità delle diverse Trx verso determinati enzimi bersaglio è necessario svolgere studi biochimici *in vitro* con le proteine purificate. I primi studi sono stati svolti testando l'efficienza di diverse Trx cloroplastiche nell'attivare i due enzimi modello, la FBPasi e la NADP-MDH. Mentre la regolazione del primo enzima è strettamente dipendente dalla Trx *f* (Collin et al., 2003, 2004), la NADP-MDH ha una specificità meno stringente. Infatti, questo enzima viene attivato da entrambe le classi seppure con una maggiore efficienza da parte della Trx *f*. Il ruolo delle Trx *f* e *m* è stato ulteriormente confermato da studi recenti che hanno evidenziato come queste due classi di Trx siano in grado di regolare l'attività di numerosi enzimi coinvolti nel metabolismo del carbonio (Lemaire et al., 2007; Marri et al., 2009; Née et al., 2009; Valerio et al., 2011) (fig. 5). Al contrario delle Trx *f* e *m*, le classi *x*, *y* e *z* sono coinvolte nella risposta antiossidante. Queste tre classi di Trx sono risultate infatti efficienti donatori di elettroni per alcuni enzimi coinvolti nella risposta allo stress ossidativo, come la 2-cys perossiredossina (2-Cys-Prx) e la perossiredossina Q (Prx Q), la glutatione perossidasi (Gpx) e la metionina sulfossido reduttasi di tipo B2 (MSRB2) (Lemaire et al., 2007; Chibani et al., 2012) (fig. 5).

#### 4. REGOLAZIONE ENZIMATICA ROS-DIPENDENTE

Come descritto in precedenza, alcune cisteine proteiche, oltre a essere coinvolte nella formazione di ponti disolfuro, possono andare incontro a diverse tipologie di modificazioni redox dipendenti dalle ROS. La capacità di una particolare cisteina proteica di subire modificazioni redox è strettamente dipendente dallo stato di deprotonazione del tiolo che ne influenza la sensibilità all'attacco da parte delle ROS, in particolare del perossido d'idrogeno ( $H_2O_2$ ) (Dalle-Donne et al., 2007; Zaffagnini et al., 2012b). La reazione del perossido d'idrogeno con una cisteina reattiva porta alla formazione di diversi stati di ossidazione. Il gruppo tiolico della cisteina può essere infatti ossidato ad acido sulfenico (-SOH, ossidazione primaria), ad acido sulfinico (-SO<sub>2</sub>H) o sulfonico (-SO<sub>3</sub>H) (fig. 1). La forma sulfenica di una cisteina rappresenta una modificazione reversibile e instabile che tende facilmente a subire ulteriori *step* d'ossidazione ad acido sulfinico e sulfonico che vengono considerati modificazioni irreversibili. Alternativamente, la cisteina sulfenica può interagire con eventuali tioli vicini formando un ponte disolfuro intramolecolare, o

con il glutatione ridotto formando un ponte disolfuro misto (*i.e.* glutationilazione).

#### 4.1 La S-glutationilazione

La S-glutationilazione è una modificazione post-traduzionale di tipo redox che avviene principalmente in condizioni di stress ossidativo e che consiste nella formazione di un ponte disolfuro misto tra un tiolo proteico e una molecola di glutatione ridotto (Dalle-Donne et al., 2007) (fig. 2). La S-glutationilazione costituisce principalmente un meccanismo di protezione di specifiche cisteine nei confronti dell'ossidazione irreversibile. Infatti, uno dei meccanismi possibili per formare questo ponte disolfuro misto, è la reazione del GSH con una cisteina sulfenica, reazione che ne previene la sovra-ossidazione. Oltre a questa funzione di protezione, la S-glutationilazione può costituire anche un meccanismo di regolazione dell'attività della proteina bersaglio sia che la cisteina glutationilata sia direttamente coinvolta nel processo catalitico della proteina sia che si trovi in prossimità dei residui coinvolti nella catalisi (Dalle-Donne et al., 2007).

La S-glutationilazione può avvenire attraverso diversi meccanismi non enzimatici che coinvolgono reazioni di scambio tiolo/disolfuro o l'attivazione dei residui di cisteina (Zaffagnini et al., 2012a). Le reazioni di scambio tiolo/disolfuro coinvolgono il glutatione ossidato (GSSG) che è in grado di reagire con i tioli proteici determinandone la glutationilazione e liberando una molecola di GSH. Tuttavia questo meccanismo è poco probabile che avvenga *in vivo* dove i livelli fisiologici di GSSG sono molto inferiori a quelli normalmente utilizzati negli esperimenti di S-glutationilazione *in vitro* (Zaffagnini et al., 2012b). Viceversa, una cisteina acida che diventa sulfenica in presenza di perossido d'idrogeno può subire il successivo attacco da parte del GSH con conseguente formazione di un ponte disolfuro misto e liberazione di una molecola d'acqua. Oltre alla cisteina della proteina bersaglio, anche la cisteina del glutatione può subire modificazioni che ne aumentano la reattività. Forme ossidate del glutatione, come il glutatione sulfenato (GSOH) e il glutatione disolfuro monossido [GS(O)SG], sono infatti considerate mediatori alternativi e più efficienti del GSSG nell'indurre la S-glutationilazione (Gao et al., 2009).

Mentre la S-glutationilazione può avvenire attraverso diversi meccanismi, la reazione inversa, denominata deglutinationilazione, è affidata a piccole proteine appartenenti alla famiglia multigenica delle ossidoreduttasi omologhe alle Trx, chiamate glutaredossine (Grx).

#### 4.2 I bersagli cloroplastici della S-glutationilazione

Un esempio di particolare rilievo riguardante la segnalazione redox mediata dalla glutationilazione coinvolge la Trx *f* e il ciclo di Calvin-Benson. Questa classe di Trx cloroplastiche è caratterizzata dalla presenza di una cisteina addizionale che non ha funzioni catalitiche ma che è localizzata in prossimità del sito attivo (Michelet et al., 2005). Questo residuo di cisteina è strettamente conservato in tutte le Trx della classe *f* ed è assente nelle altre Trx cloroplastiche. Il trattamento della Trx *f* con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e GSH determina la glutationilazione specifica di questo residuo di cisteina addizionale, e la Trx *f* è la sola Trx cloroplastica a essere sensibile a questo tipo di modificazione redox. È interessante notare che la glutationilazione della cisteina addizionale non altera la capacità della Trx *f* a effettuare reazioni di scambio ditiolo/disolfuro, ma ostacola fortemente la sua interazione strutturale e funzionale con l'FTR (Michelet et al., 2005). Infatti, la Trx *f* glutationilata non viene ridotta in modo efficace dall'FTR e ciò altera negativamente la sua funzione di collegamento tra le reazioni luminose della fotosintesi e il ciclo di Calvin-Benson, essendo la Trx *f* l'unica tioredossina capace di regolare l'attività di due enzimi del ciclo di Calvin-Benson, la GAPDH e la FBPasi. Inoltre, la Trx *f* agisce anche come donatore di elettroni preferenziale per l'attivazione di altri enzimi del medesimo ciclo (Lemaire et al., 2007; Marri et al., 2009) e per l'inibizione del ciclo dei pentosi fosfati, necessaria da evitare cicli futili nel cloroplasto alla luce (Née et al., 2009). Nonostante la glutationilazione della Trx *f* non sia stata confermata *in vivo*, possiamo comunque ipotizzare che glutationilazione della Trx *f* sia una modificazione redox che contribuisce alla down-regolazione del ciclo di Calvin-Benson in condizioni di stress ossidativo.

Oltre a questo meccanismo regolativo indiretto, la glutationilazione può anche avere un effetto diretto sul ciclo di Calvin-Benson influenzando l'attività dei suoi enzimi. Infatti, è stato dimostrato che alcuni enzimi del ciclo quali la GAPDH, la trioso fosfato isomerasi e la fruttosio-1,6-bisfosfato aldolasi vengono inibiti mediante glutationilazione e che tale inibizione è reversibile (Ito et al., 2003; Zaffagnini et al., 2007). Inoltre, tutti gli enzimi del ciclo sono potenziali bersaglio della glutationilazione (Dixon et al., 2005; Zaffagnini et al., 2012c) (fig. 6). anche se l'effetto di questa modificazione redox sull'attività enzimatica rimane in molti casi da stabilire. Nel complesso, i risultati ottenuti fino a oggi ci permettono di ipotizzare che la glutationilazione possa costituire un meccanismo di regolazione del ciclo di Calvin-Benson in risposta all'insorgenza di condizioni di stress e che tale regolazione

possa indurre una segnalazione redox che permette alla cellula di adattarsi alle nuove condizioni intracellulari.

## 5. CONCLUSIONI

Sembra ormai chiaro che la regolazione luce-dipendente (*i.e.* mediata dalle Trx) del ciclo di Calvin-Benson interagisca con la glutationilazione ROS-dipendente formando un'intricata rete di relazioni (*network*), la cui comprensione è ancora a uno stadio embrionale. Questo *network* è basato principalmente sul fatto che numerosi enzimi sono stati individuati come potenziali target di entrambe le modificazioni redox. Studi futuri dovranno essere svolti allo scopo di studiare e caratterizzare i meccanismi molecolari che stanno alla base delle due diverse tipologie di regolazione redox, confermandone il ruolo nella modulazione delle attività enzimatiche coinvolte nell'assimilazione del carbonio. Si dovrà inoltre chiarire quale sia l'effettivo ruolo fisiologico della glutationilazione nella regolazione dell'assimilazione fotosintetica del carbonio in condizioni di stress.

## RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano l'Accademia dei Georgofili e il prof. Amedeo Alpi per l'invito a presentare i propri dati sperimentali durante questa giornata di studio sul cloroplasto, un compartimento sub-cellulare estremamente interessante perché unico e fondamentale per le piante e ad alto "potenziale" energetico. Inoltre, gli autori ringraziano il progetto PRIN 2008 del Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca per aver finanziato parte della ricerca presentata in questa relazione.

## RIASSUNTO

La regolazione luce-dipendente dell'attività di diversi enzimi dei cloroplasti è un meccanismo di regolazione redox piuttosto noto che coinvolge le tioredossine (Trx) e le reazioni di scambio ditioilo/disolfuro con enzimi bersaglio. Un secondo tipo di modificazione redox post-traduzionale, denominata glutationilazione, sta emergendo in questi anni come ulteriore meccanismo di regolazione attivo nelle piante e in particolare nei cloroplasti.

In questo studio, dopo aver introdotto le basi molecolari della regolazione redox, verrà presentato il sistema delle tioredossine dei cloroplasti con dettagli sui suoi componenti e sulla rivoluzione genomica e proteomica che ha permesso di identificare ulteriori

classi di tioredossine e nuove potenziali proteine bersaglio. In seguito, si parlerà della glutathionilazione proteica al fine di individuarne i meccanismi molecolari e il suo ruolo come meccanismo di regolazione redox degli enzimi cloroplastici. Infine, verrà discussa l'interazione tra la regolazione Trx-dipendente e quella mediata dalla glutathionilazione all'interno dei cloroplasti, con particolare enfasi sulla regolazione redox del ciclo di Calvin-Benson.

#### ABSTRACT

Light-dependent modulation of chloroplast enzyme activities is a well established mechanism of redox regulation that involves thioredoxins (Trxs) and dithiol/disulfide exchange reactions. Recently, another post-translational redox modification, termed glutathionylation, is emerging as an additional mechanism of redox regulation in plants and in chloroplast in particular.

In this study, we first introduce the molecular basis of redox regulation and present the chloroplastic thioredoxin system from its discovery to the genomic and proteomic revolution that allowed the identification of additional chloroplastic thioredoxins and new potential TRX targets. Then, we introduce protein glutathionylation in order to pinpoint its possible molecular mechanisms and its role as a redox regulatory mechanism of chloroplastic enzymes. Finally, we discuss the possible interplay between TRX system and glutathionylation in chloroplasts, with emphasis on the redox regulation of Calvin-Benson cycle in response to both light and oxidative stress conditions.

#### RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- BUCHANAN B.B., BALMER Y. (2005): *Redox regulation: a broadening horizon*, «Annu. Rev. Plant Biol.», 56, pp. 187-220.
- CHIBANI K., TARRAGO L., GUALBERTO J.M., WINGSLE G., REY P., JACQUOT J.P., ROUHIER N. (2012): *Atypical thioredoxins in poplar: the glutathione-dependent thioredoxin-like 2.1 supports the activity of target enzymes possessing a single redox active cysteine*, «Plant Physiol.», 159, pp. 592-605.
- COLLET J.F., MESSENS J. (2010): *Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins*, «Antioxid Redox Signal», 13, pp. 1205-16.
- COLLIN V., ISSAKIDIS-BOURGUET E., MARCHAND C., HIRASAWA M., LANCELIN J.M., KNAFF D.B., MIGINIAC-MASLOW M. (2003): *The Arabidopsis plastidial thioredoxins: new functions and new insights into specificity*, «J. Biol. Chem.», 278, pp. 23747-52.
- COLLIN V., LAMKEMEYER P., MIGINIAC-MASLOW M., HIRASAWA M., KNAFF D.B., DIETZ K.J., ISSAKIDIS-BOURGUET E. (2004): *Characterization of plastidial thioredoxins from Arabidopsis belonging to the new  $\gamma$ -type*, «Plant Physiol.», 136, pp. 4088-95.
- DAI S., SCHWENDTMAYER C., SCHÜRMANN P., RAMASWAMY S., EKLUND H. (2000): *Redox signaling in chloroplasts: cleavage of disulfides by an iron-sulfur cluster*, «Science», 285, pp. 655-8.
- DALLE-DONNE I., ROSSI R., GIUSTARINI D., COLOMBO R., MILZANI A. (2007): *S-glutathionylation in protein redox regulation*, «Free Radic. Biol. Med.», 43, pp. 883-898.



- DIXON DP., SKIPSEY M., GRUNDY NM., EDWARDS R. (2005): *Stress-induced protein S-glutathionylation in Arabidopsis*, «Plant Physiol.», 138, pp. 2233-2244.
- FERMANI S., SPARLA F., FALINI G., MARTELLI PL., CASADIO R., PUPILLO P., RIPAMONTI A., TROST P. (2007): *Molecular mechanism of thioredoxin regulation in photosynthetic A2B2-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», 104, pp. 11109-11114.
- FOYER C.H., NOCTOR G. (2005): *Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses*, «Plant Cell», 17, pp. 1866-75.
- GAO XH., BEDHOMME M., VEYEL D., ZAFFAGNINI M., LEMAIRE SD. (2009): *Methods for analysis of protein glutathionylation and their application to photosynthetic organisms*, «Mol. Plant», 2, pp. 218-235.
- ITO H., IWABUCHI M., OGAWA K. (2003): *The sugar-metabolic enzymes aldolase and triose-phosphate isomerase are targets of glutathionylation in Arabidopsis thaliana: detection using biotinylated glutathione*, «Plant Cell Physiol.», 44, pp. 655-660.
- JACOB C., KNIGHT I., WINYARD P.G. (2006): *Aspects of the biological redox chemistry of cysteine: from simple redox responses to sophisticated signalling pathways*, «Biol. Chem.», 387, pp. 1385-97.
- LEMAIRE S.D., COLLIN V., KERYER E., QUESADA A., MIGINIAC-MASLOW M. (2003): *Characterization of thioredoxin  $\gamma$ , a new type of thioredoxin identified in the genome of Chlamydomonas reinhardtii*, «FEBS Letters», 545, pp. 87-92.
- LEMAIRE S.D., MICHELET L., ZAFFAGNINI M., MASSOT V., ISSAKIDIS-BOURGUET E. (2007): *Thioredoxins in chloroplasts*, «Curr. Genet.», 51, pp. 343-365.
- MARRI L., ZAFFAGNINI M., COLLIN V., ISSAKIDIS-BOURGUET E., LEMAIRE SD., PUPILLO P., SPARLA F., MIGINIAC-MASLOW M., TROST P. (2009): *Prompt and easy activation by specific thioredoxins of calvin cycle enzymes of Arabidopsis thaliana associated in the GAP-DH/CP12/PRK supramolecular complex*, «Mol. Plant», 2, pp. 259-269.
- MICHELET L., ZAFFAGNINI M., MARCHAND C., COLLIN V., DECOTTIGNIES P., TSAN P., LANCELIN JM., TROST P., MIGINIAC-MASLOW M., NOCTOR G., LEMAIRE SD. (2005): *Glutathionylation of chloroplast thioredoxin f is a redox signaling mechanism in plants*, «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», 102, pp. 16478-16483.
- MONTRICHARD F., ALKHALFIOU F., YANO H., VENSEL W.H., HURKMAN W.J., BUCHANAN B.B. (2009): *Thioredoxin targets in plants: the first 30 years*, «J. Proteomics», 72, pp. 452-74.
- NÉE G., ZAFFAGNINI M., TROST P., ISSAKIDIS-BOURGUET E. (2009): *Redox regulation of chloroplastic glucose-6-phosphate dehydrogenase: a new role for f-type thioredoxin*, «FEBS Letters», 583, pp. 2827-2832.
- ROUHIER N., GELHAYE E., GUALBERTO J.M., JORDY M.N., DE FAY E., HIRASAWA M., DUPLESSIS S., LEMAIRE S.D., FREY P., MARTIN F., MANIERI W., KNAFF D.B., JACQUOT J.P. (2004): *Poplar peroxiredoxin Q. A thioredoxin-linked chloroplast antioxidant functional in pathogen defense*, «Plant Physiol.», 134, pp. 1027-38.
- RUELLAND E., MIGINIAC-MASLOW M. (1999): *Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins: activation or relief from inhibition?*, «Trends Plant Sci.», 4, pp. 136-141.
- SCHEIBE R. (1991): *Redox-modulation of chloroplast enzymes: a common principle for individual control*, «Plant Physiol.», 96, pp. 1-3.
- SCHURMANN P. (2003): *Redox signaling in the chloroplast: the ferredoxin/thioredoxin system*, «Antioxid. Redox Signal.», 5, pp. 69- 78.
- SCHURMANN P., JACQUOT J.P. (2000): *Plant thioredoxin systems revisited*, «Annu Rev Plant Physiol Plant Mol. Biol.», 51, pp. 371-400.

- TROST P., FERMANI S., MARRI L., ZAFFAGNINI M., FALINI G., SCAGLIARINI S., PUPILLO P., SPARLA F. (2006): *Thioredoxin-dependent regulation of photosynthetic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: autonomous vs. CP12-dependent mechanisms*, «Photosynth. Research», 89, pp. 263-275.
- VALERIO C., COSTA A., MARRI L., ISSAKIDIS-BOURGUET E., PUPILLO P., TROST P., SPARLA F. (2011): *Thioredoxin-regulated beta-amylase (BAM1) triggers diurnal starch degradation in guard cells, and in mesophyll cells under osmotic stress*, «J. Exp. Bot.», 62, pp. 545-555.
- WINTERBOURN C.C., HAMPTON M.B. (2008): *Thiol chemistry and specificity in redox signaling*, «Free Radic. Biol. Med.», 45, pp. 549-561.
- ZAFFAGNINI M., MICHELET L., MARCHAND C., SPARLA F., DECOTTIGNIES P., LE MARCHAL P., MIGINIAC-MASLOW M., NOCTOR G., TROST P., LEMAIRE S.D. (2007): *The thioredoxin-independent isoform of chloroplastic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is selectively regulated by glutathionylation*, «FEBS J.», 274, pp. 212-226.
- ZAFFAGNINI M., BEDHOMME M., MARCHAND C.H., MORISSE S., TROST P., LEMAIRE S.D. (2012a): *Redox regulation in photosynthetic organism: focus on glutathionylation*, «Antioxid. Redox Signal.», 16, pp. 567-86.
- ZAFFAGNINI M., BEDHOMME M., LEMAIRE S.D., TROST P. (2012b): *The emerging roles of protein glutathionylation in chloroplasts*, «Plant Sci.», 185-186, pp. 86-96.
- ZAFFAGNINI M., BEDHOMME M., GRONI H., MARCHAND C.H., PUPPO C., GONTERO B., CASSIER-CHAUVAT C., DECOTTIGNIES P., LEMAIRE S.D. (2012c): *Glutathionylation in the photosynthetic model organism Chlamydomonas reinhardtii: a proteomic survey*, «Mol. Cell. Proteomics», <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M111.014142>

MATTEO BALLOTTARI\*, ALESSANDRA SCALA\*, LINDA BIANCO\*\*,  
CARMINE MANCONE\*\*\*, MARCO TRIPODI\*\*\*, GIOVANNI GIULIANO\*\*\*\*,  
GAETANO PERROTTA\*\*, ROBERTO BASSI\*

## Analisi proteomica della cromoplastogenesi nella bacca di *Solanum lycopersicon*

### INTRODUZIONE

La transizione cloroplasto-cromoplasto, anche detta cromoplastogenesi, è un evento che contraddistingue la formazione e la maturazione dei frutti.

Tutti i frutti carnosi possono essere raggruppati in due tipologie di forme ovvero la drupa e la bacca. La drupa racchiude un unico seme, avvolto da tessuti sclerificati derivanti dall'endocarpo: il cosiddetto nocciolo. La bacca, invece, ha al suo interno numerosi semi, ciascuno dei quali protetto da un tegumento. Oltre a queste classi principali di frutti, esistono anche i falsi frutti: ne sono un esempio i frutti delle *Rosaceae* e la fragola, definiti così in quanto derivano dal rigonfiamento del ricettacolo, porzione terminale del fusto, su cui si inserisce il fiore, ma che non fa parte di questo.

La maturazione dei frutti carnosi prevede delle modifiche fisico-chimiche mirate, che portano il frutto a diventare edule e attraente, come strategia per la dispersione dei semi contenuti al suo interno. Una di queste modifiche è il cosiddetto *softening* ovvero l'ammorbidimento del tessuto del pericarpo, il quale è costituito principalmente da cellule parenchimatiche, racchiuse da uno strato di microfibrille di cellulosa, sospese in una matrice di glicoproteine, acqua, pectine ed emicellulose. In particolare, le emicellulose rappresentano il 90% della parete cellulare. Il *softening* è determinato da espansione cellulare e dalla digestione di parte della parete e della lamella mediana presente tra le cellule, la cui degradazione in

\* Dipartimento di Biotecnologie, Università di Verona

\*\* ENEA-Trisaia Research Center, Rotondella (Matera)

\*\*\* National Institute for Infectious Diseases "L. Spallanzani", IRCCS, Roma

\*\*\*\* ENEA-Casaccia Research Centre, Roma

particolare porta alla perdita di adesione tra di esse (Smith et al., 1988; Giovannoni et al., 1989).

Il contenuto in carboidrati dei frutti carnosì dipende principalmente da due fattori: le condizioni ambientali presenti durante il processo di sviluppo e di maturazione e la cultivar analizzata. In pomodoro, i carboidrati maggiormente presenti sono saccarosio, glucosio e fruttosio con un grande accumulo di esosi, caratteristica conseguente al processo di domesticazione. Evidenze sperimentali dimostrano come il metabolismo degli zuccheri, abbia un ruolo centrale nel processo di maturazione in quanto un cambiamento nella loro composizione influenza anche la dimensione del frutto (Klann et al., 1996; D'Aoust et al., 1999).

Un altro studio, approntato per stabilire il profilo metabolico del frutto in questione, ha permesso di caratterizzare da un punto di vista metabolico tre stadi di sviluppo della maturazione (verde, arancio, rosso) monitorando il livello di più di 70 metaboliti primari (Roessner-Tunali et al., 2003). Le differenze maggiori sono state riscontrate tra il pomodoro verde e quello rosso in cui vi è un aumento di glucosio, fruttosio e degli esosi principali, dei componenti della parete, degli aminoacidi aromatici, di aspartato, lisina, metionina e cisteina e di tutti i pigmenti eccetto la clorofilla. Al contrario, è stata registrata una diminuzione degli acidi tricarbossilici (TCA), del saccarosio, degli esosi fosfati e della maggior parte dei polialcoli. Si può quindi affermare che i differenti stadi di maturazione possano essere distinti sulla base della composizione dei metaboliti primari e che, progredendo nello sviluppo, la fosforilazione degli zuccheri esosi diminuisca radicalmente.

Il metabolismo dei fotosintati nel frutto è stato studiato tramite l'inibizione di una fruttosio bisfosfatasi plastidiale (Obiadalla-Ali et al., 2004), enzima coinvolto nell'utilizzo metabolico dei triosi fosfati prodotti durante la fotosintesi. Il fenotipo ottenuto nelle linee transgeniche ha mostrato una diminuzione delle dimensioni del frutto, suggerendo che il metabolismo degli zuccheri nel frutto sia fondamentale, non solo per le caratteristiche organolettiche, ma anche per la formazione e lo sviluppo completo di questo organo. Per quanto concerne la regolazione della glicolisi e la trasformazione degli esosi fosfati in acidi organici nel frutto di pomodoro, i dati presenti in letteratura sono scarsi così come quelli sulla regolazione del ciclo dei TCA.

È stato stimato che il frutto di pomodoro contenga almeno 400 diversi composti volatili. In questo vasto gruppo di metaboliti, gli esteri, sintetizzati dall'enzima alcohol acetiltrasferasi, sono la classe più comunemente rilevata e la loro eterogeneità è dovuta alla variabilità dei precursori disponibili come substrato. La fonte maggiore di questi precursori è il metabolismo del piruvato, con la sua conversione in acetil-CoA per opera della piruvato deidrogenasi,

in acetaldeide grazie alla piruvato decarbossilasi, oppure in etanolo per azione della alcohol deidrogenasi.

I pigmenti che conferiscono ai frutti la colorazione che li rende allettanti, sono principalmente carotenoidi e flavonoli. Essi derivano dal metabolismo dell'acetil CoA e dal piruvato.

In pomodoro sono presenti vari carotenoidi tra cui più abbondante è il licopene, seguito dal fitoene, fitofluene,  $\zeta$ -carotene,  $\gamma$ -carotene,  $\beta$ -carotene, neurosporene e luteina (Khachik et al., 2002), contenuti principalmente nei plastidi.

I plastidi sono organelli subcellulari presenti nelle piante e nelle alghe che rappresentano una delle principali caratteristiche che contraddistinguono la cellula vegetale dalla cellula animale.

Sono responsabili della fotosintesi, dello stoccaggio di un'ampia gamma di prodotti, e sono coinvolti nella sintesi di molecole implicate nell'architettura e nel funzionamento delle cellule vegetali. Come i mitocondri, i plastidi sono organelli semiautonimi, racchiusi da una doppia membrana, contenenti un proprio patrimonio genetico e un sistema di espressione genica.

I cloroplasti sono plastidi verdi fotosintetici, responsabili della cattura della luce e della sua conversione in energia chimica. Hanno una struttura emisferica o a forma di lente con un diametro di circa 5-10  $\mu\text{m}$  e uno spessore di 3-4  $\mu\text{m}$  (fig. 1). I cloroplasti si trovano in tutti i tessuti verdi, principalmente nelle cellule del mesofillo fogliare, in numero variabile da poche decine a qualche centinaia per singola cellula. Il loro numero varia a seconda della specie, del tessuto, delle condizioni di crescita e dello stadio di sviluppo delle cellule in cui sono presenti. Ad esempio, una cellula del mesofillo di *Arabidopsis thaliana* contiene all'incirca 120 cloroplasti.

I cromoplasti contengono livelli elevati di caroteni e xantofille che conferiscono le colorazioni rosso, arancio e giallo a fiori, frutti, radici e foglie senescenti. Di norma, questi organelli si sviluppano da proplastidi, come ad esempio nella radice di carota, oppure da una ulteriore differenziazione dei cloroplasti, presenti nei tessuti dei frutti carnosì durante la maturazione. In entrambi i casi si ha la formazione di strutture per l'accumulo dei carotenoidi che si differenziano in strutture plastoglobulari, cristalline, a fibrille, tubolari definiti plastoglobuli (Camara et al., 1995). Lo sviluppo dei cromoplasti è accompagnato dalla massiccia induzione degli enzimi della via di biosintesi dei carotenoidi.

I cromoplasti vengono solitamente descritti come organelli fotosinteticamente inattivi, contenenti carotenoidi che conferiscono a fiori e frutti la caratteristica colorazione gialla, arancione o rossa e vengono considerati come l'ultima fase del ciclo di sviluppo dei plastidi (Ljubesic et al., 1991).

Similmente ai cloroplasti, i cromoplasti contengono alcune copie di DNA circolare e sono in grado di duplicarsi nelle prime fasi della loro maturazione. Durante questo processo di sviluppo, i ribosomi del macchinario di traduzione plastidio-specifico vengono gradualmente smantellati di modo che gli enzimi per la sintesi dei carotenoidi vengono codificati dal genoma nucleare, tradotti dai ribosomi citoplasmatici e successivamente importati. Il più importante cambiamento strutturale che avviene durante la cromoplastogenesi consiste nella degradazione dell'apparato fotosintetico presenti nei cloroplasti che si differenziano in cromoplasti. Esistono varie tipologie di smantellamento, la più diffusa delle quali è caratterizzata, da una tappa iniziale di *unstacking*, processo per cui i tilacoidi perdono la loro struttura impilata, tipica dei grana.

Nel pepo (*Cucurbita pepo*) in maturazione, i tilacoidi dei grana perdono il loro lumen e formano agglomerati al cui interno sono presenti particelle isometriche di circa 8nm di diametro, distanziate da 12-13nm e disposte in un pattern esagonale (Ljubesic et al., 1991). Queste particelle scompaiono con il progredire della maturazione. Un comportamento simile è osservabile anche dopo il trattamento con l'erbicida aminotriazolo, il quale blocca la ciclizzazione dei caroteni, impedendo così la formazione delle xantofille, pigmenti essenziali per i meccanismi di protezione della cellula vegetale dalla luce assorbita in eccesso. La mancanza di xantofille causa la foto-ossidazione delle clorofilla, con conseguente inattivazione e degradazione dei centri di reazione, mentre le proteine antenna si appressano con un pattern esagonale. Lo stress ossidativo è dunque una componente fondamentale che scatena quella che è la transizione del cloroplasto in cromoplasto.

Durante la cromoplastogenesi, contemporaneamente alla degradazione del sistema tilacoidale, viene avviata la sintesi de novo di carotenoidi all'interno di varie strutture specializzate che iniziano a formarsi in questa fase di transizione, tra cui i plastoglobuli, i quali si presentano come piccole gocce lipidiche (da 0.1  $\mu\text{m}$  fino a qualche  $\mu\text{m}$ ). Nei plastoglobuli oltre ai lipidi, soprattutto triacilgliceroli, possono essere contenuti anche vari caroteni e xantofille. Negli stadi finali della differenziazione dei cromoplasti i carotenoidi si possono accumulare in strutture differenti, come cristalli o fibrille. In alcuni casi, ad esempio nei petali, si sviluppano all'interno dei cromoplasti particolari membrane chiamate CIMs (*Chromoplast Internal Membranes*) che si dispongono in strati concentrici a ridosso dell'envelope. Infatti le CIMs si originano da invaginazioni della membrana più interna di quest'ultima e non dalla degradazione dei tilacoidi fotosintetici, come è stato dimostrato da saggi di marcatura con diaminobenzidina (Wrischer, 1989). In questo tipo di

membrane sono stati individuati enzimi della sintesi dei carotenoidi (Kreuz et al, 1982). In alcuni cromoplasti, come quelli di zucca, sono state osservate anche membrane che derivano dalla degradazione dei tilacoidi, seppur non contenenti clorofilla. Queste strutture scompaiono progressivamente con il progredire della maturazione. Un'altra tipologia di membrane che si può trovare è il *reticolo cromoplastico*, consistente di una rete di strutture tubulari ramificate di circa 30nm di diametro, originate dalla membrana più interna dell'envelope. Come nelle altre tipologie di plastidio, questa membrana ha una doppia funzione: trasporto in entrambe le direzioni di metaboliti, principalmente carotenoidi, e sito di sintesi delle strutture membranali. Durante la maturazione dei cromoplasti, la sintesi di carotenoidi può raggiungere livelli tali da portare la cristallizzazione dei prodotti. Un esempio di questo fenomeno è stato riscontrato nei petali di *Narcissus pseudonarcissus* e nei frutti di *Solanum lycopersicon* che accumulano, rispettivamente,  $\beta$ -carotene e licopene. I cristalli si formano nel lumen tilacoidale, durante la transizione da cloroplasto a cromoplasto e rimangono invaginati in una membrana quando i tilacoidi sono completamente degradati (Hlousek et Ljubesic, 1988; Bathgate et al, 1985). I tubuli o fibrille sono altre strutture, cromoplasto-specifiche, che contengono carotenoidi e che si configurano come cilindri molto lunghi (10  $\mu$ m) e sottili (20-40nm) spesso in contatto con i plastoglobuli. I tubuli, inoltre, non contengono solamente carotenoidi, ma anche galattolipidi e proteine specifiche dei cromoplasti (Sitte et al, 1980).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato analizzare la transizione da cloroplasto a cromoplasto, la cosiddetta cromoplastogenesi, tramite un approccio di tipo proteomico e fisiologico nella bacca di *Solanum lycopersicum*.

È stato scelto il frutto di questa solanacea in quanto il pomodoro è considerata la pianta modello per studiare la maturazione dei frutti carnosì ed è appunto durante questo processo di sviluppo che nel frutto i cloroplasti, fotosinteticamente attivi, si trasformano in cromoplasti, che accumulano carotenoidi, lipidi e una serie di composti secondari a vario grado di volatilità che conferiscono gusto e aroma al frutto. La conoscenza di quali messaggeri e di quali prodotti genici vengano accumulati e di quali metaboliti vengano prodotti durante la maturazione, potrà permettere, tramite la correlazione di questi parametri con l'evoluzione strutturale e organolettica della bacca, il miglioramento biotecnologico del prodotto "pomodoro".

Al momento la conoscenza del frutto di *S. lycopersicum* è molto frammentaria ed è stata condotta soprattutto sull'intero frutto con risultati in termine di prodotti genici riscontrati, identificati e quantificati durante lo sviluppo. Questi risultati insoddisfacenti ci hanno suggerito di concentrare il nostro lavoro su uno specifico organello: il plastidio. Infatti, pur non esaurendo tutti i fenomeni della maturazione, questo organello è sede del metabolismo dei lipidi e degli isoprenoidi, che sono i principali responsabili dei cambiamenti organolettici del frutto.

È il caso di sottolineare che questo studio, pur di una certa complessità, è ancora in una fase iniziale, in cui ci siamo focalizzati sul confronto delle tecniche potenzialmente impiegabili e sulla verifica dei risultati da esse ottenuti. In particolare sono state confrontate due strategie alternative: la MudPIT e la più classica 2D-PAGE/MS.

### *Caratterizzazione preliminare*

Allo scopo di identificare i cambiamenti strutturali macroscopici presenti all'interno del plastidio durante la cromoplastogenesi, frutto di pomodoro a diversi stadi di maturazione sono stati analizzati al microscopio elettronico. Sono state quindi analizzate al microscopio elettronico sezioni del pericarpo di pomodori agli stadi estremi della maturazione, ovvero verde piccolo, caratterizzato dalla presenza di cloroplasti, e rosso maturo, caratterizzato invece dalla presenza di cromoplasti (fig. 1).

Come si può osservare in figura 1 nel cloroplasto sono presenti i grana connessi dalle stroma lamelle e alcuni plastoglobuli di ridotte dimensioni. Nel cromoplasto maturo, invece, il sistema interno di tilacoidi del cloroplasto viene perso a favore della formazione di strutture preposte all'accumulo dei carotenoidi: plastoglobuli, tubuli e le CIMs (Chromoplast Internal Membranes). Le tecniche di analisi proteomica devono essere condotte su campioni prelevati da pool omogenei degli "oggetti biologici" che si vogliono confrontare. Lo sviluppo della pianta e dei frutti in serra è un fenomeno dipendente dalle condizioni colturali. Per poter quindi integrare vari esperimenti, effettuati sul materiale ottenuto da raccolti effettuati in tempi diversi, è stato approntato un sistema di campionamento delle bacche, scegliendo diversi stadi di maturazione, tramite la valutazione di particolari caratteristiche quali l'analisi colorimetrica e fenotipica (fig. 2):

- *Pomodori verdi piccoli (VP)* sono caratterizzati da dimensioni ridotte (altezza dell'asse maggiore del frutto di ~ 3.4 cm, volume ~13cm<sup>3</sup>), il colo-



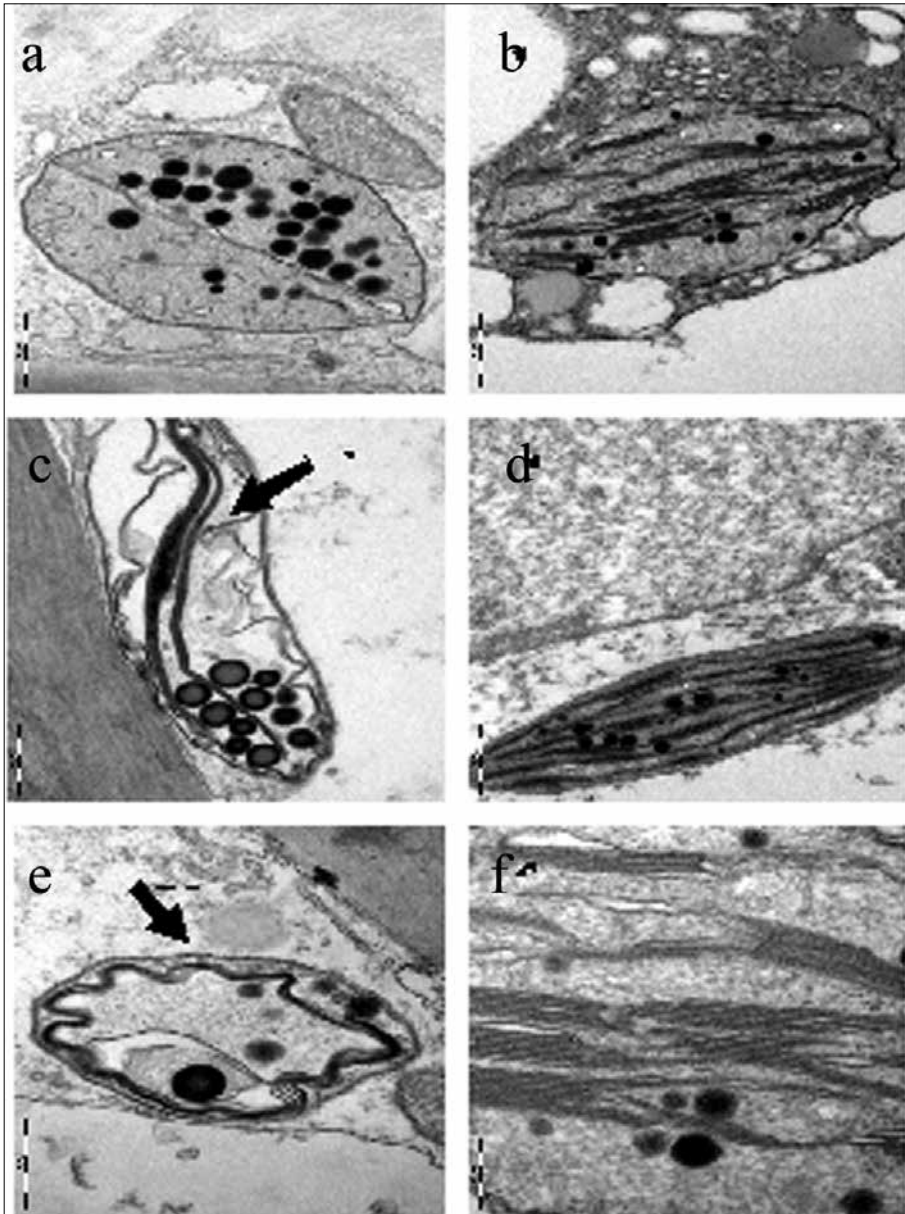


Fig. 1 sezioni di tessuti di pomodoro al microscopio elettronico. In b, d e f cloroplasti da frutto VP; in a, c ed e cromoplasti da frutto R

re ha un picco di assorbimento nella regione del rosso a 677nm dovuto alla presenza di clorofille la cui quantità è leggermente inferiore a quella

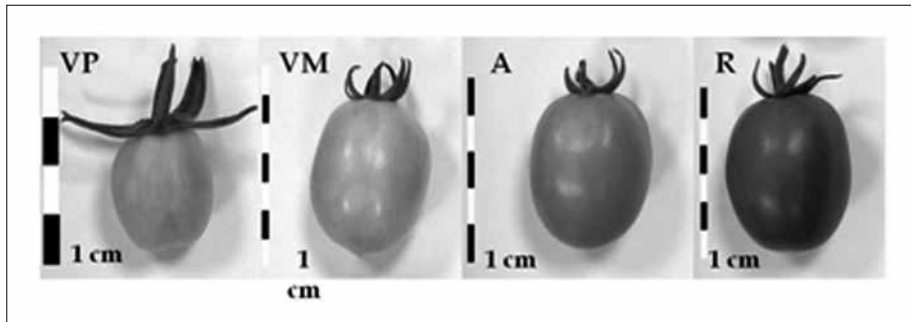


Fig. 2 Stadi maturazione della bacca di pomodoro da cui sono stati purificati i plastidi anaizzati in questo lavoro (VP, verde piccolo; VM, verde maturo, A, arancione; R, rosso)

riscontrata nella foglia. A livello microscopico si osserva la caratteristica organizzazione strutturale delle membrane all'interno del cloroplasto. Per quanto riguarda i pigmenti, la composizione in xantofille è simile a quella della foglia, eccezione fatta per la luteina che diminuisce. Il  $\beta$ -carotene aumenta rispetto alla quantità presente nella foglia, mentre le clorofille diminuiscono leggermente (tab. 1).

- *Pomodori verdi maturi (VM)* sono caratterizzati dal raggiungimento delle seguenti dimensioni: altezza dell'asse maggiore del frutto  $\sim 4.3\text{cm}$ , volume  $\sim 26\text{cm}^3$ , il colore ha un picco di assorbimento nella regione del rosso a  $677\text{nm}$  dovuto alla presenza di clorofille in quantità praticamente uguale a quella dei pomodori verdi piccoli. Il licopene inizia ad accumularsi in questo stadio ed è visibile come un picco a  $545\text{nm}$  nello spettro di riflettanza. Rispetto allo stadio precedente si riscontra un lieve aumento della violaxantina (tab. 1).
- *Pomodori arancio (A)* sono caratterizzati dal quasi completo raggiungimento delle dimensioni finali (altezza dell'asse maggiore del frutto  $\sim 4.2\text{cm}$ , volume  $\sim 28\text{cm}^3$ ), ha un picco di assorbimento nella regione blu dello spettro a  $545\text{nm}$  dovuto alla degradazione della maggior parte delle clorofille e all'accumulo di licopene. Questo dato rispecchia la composizione dei pigmenti con le clorofille totali che diminuiscono di  $\sim 60$  volte e il licopene che aumenta di  $\sim 8$  volte rispetto al frutto verde maturo (tab. 1).
- *Pomodoro rosso (R)* è caratterizzato dal completo raggiungimento delle dimensioni finali (altezza dell'asse maggiore del frutto  $\sim 4.3\text{cm}$ , volume  $\sim 29\text{cm}^3$ ), dall'aver completato il processo di maturazione, il colore ha un picco di assorbimento, maggiore di quello del campione arancio, nella regione blu dello spettro a  $565$  dovuto al massiccio accumulo di

licopene. A livello microscopico i cromoplasti hanno perso le strutture interne caratteristiche dei cloroplasti, hanno un numero maggiore di plastoglobuli e presentano formazioni di membrane che accumulano i carotenoidi, principalmente il licopene, come risulta dalla composizione in pigmenti (tab. 1).

La maturazione del frutto quindi comporta profondi cambiamenti strutturali a carico dei plastidi, con forte riduzione di clorofilla e aumento dei carotenoidi. Si osserva la formazione di strutture atte alla loro compartimentalizzazione come plastoglobuli, tubuli e CIMs (cfr. introduzione) visibili nel campione rosso.

### *Purificazione dei plastidi e separazione in frazione solubile e di membrana*

Dopo aver caratterizzato i 4 stadi di sviluppo da un punto di vista fenotipico, sono stati raccolti frutti che presentassero uno stadio di maturazione uniforme tra i quattro scelti. Da tali frutti sono stati quindi utilizzati per l'isolamento di plastidi intatti grazie a omogeneizzazione dei tessuti freschi in un apposito buffer e centrifugazione in gradiente. I plastidi integri vanno dunque a collocarsi nel gradiente di Percoll tra le due soluzioni a densità diversa: le membrane plastidiali, liberatesi invece a seguito dell'eventuale rottura di parte di plasmidi integri, formano una banda all'interno della soluzione meno densa e distinguibile da quella dei plastidi intatti. Gli altri costituenti cellulari contaminanti vanno a formare un pellet sul fondo del gradiente.

### *Analisi dei pigmenti*

La composizione in pigmenti dei plastidi intatti purificati è stata valutata andando a estrarre con acetone o dietilere queste molecole dalla frazione di membrana di ogni stadio di maturazione. Questi solventi non sono risultati abbastanza idrofobici per estrarre in modo completo il licopene, il cui progressivo accumulo inizia durante la transizione cloroplasto-cromoplasto. È stata utilizzata, per ovviare a questo problema, una miscela di esano, etanolo e acetone. La composizione in pigmenti della foglia, usata come controllo, e dei pomodori nei diversi stadi di sviluppo è riportata in tabella 1. Durante il passaggio dallo stadio verde maturo, VM, a quello arancio, A, ovvero in concomitanza con la transizione cloroplasto-cromoplasto vi è una forte diminuzione non solo della clorofilla a e b, quindi delle clorofille totali, ma anche

CAMPIONE	NEO	VIOLA	ANTERA	LUTE	ZEAX	LICOPENE	B CAR2	CHLA	CHLB	CHLA/B	TOT CAR	TOT CHL	NEO/ B CAR
FOGLIA	1,55	4,76	0,00	45,74	0,00	0,00	46,40	465,11	173,56	2,68	100,00	638,67	0,034
<i>errore</i>	0,32	0,48		1,17			2,28	63,36	22,03	0,03		85,38	0,008
VP	1,01	4,12	0,00	22,53	0,00	0,00	71,98	322,90	81,94	4,19	100,00	404,84	0,015
<i>errore</i>	0,80	2,70		9,34			12,71	130,12	47,74	0,85		177,86	0,014
VM	1,38	5,44	0,00	21,04	0,00	11,25	59,70	393,20	91,89	4,28	100,00	485,09	0,023
<i>errore</i>	0,10	1,54		3,11		1,51	3,19	19,40	4,40	0,01		23,81	0,000
A	0,00	0,03	0,07	0,37	0,04	91,49	8,00	3,63	4,07	1,37	100,00	7,71	0,001
<i>errore</i>	0,01	0,00	0,05	0,47	0,06	1,04	0,46	0,15	3,45	1,12		3,60	0,001
R	0,00	0,00	0,00	0,03	0,26	89,17	10,54	4,52	4,26	1,01	100,00	8,77	0,000
<i>errore</i>				0,04	0,22	3,61	3,44	4,03	0,55	0,82		4,57	

Tab. 1 Analisi HPLC dei pigmenti contenuti nei plastidi purificati dai quattro stadi di sviluppo del frutto analizzati comparati con i pigmenti contenuti nei cloroplasti nelle foglie di pomodori

delle xantofille neoxantina, violaxantina e luteina. Inoltre per quanto riguarda il licopene, il suo accumulo aumenta fortemente nei campioni A e R, sebbene in piccola quantità, questo carotenoide sia rilevabile anche nello stadio VM.

### *Analisi proteomica: 2D-PAGE/MS*

Il metodo che viene utilizzato maggiormente per lo studio dei proteomi complessi è la 2D-PAGE in quanto il potere di risoluzione delle singole proteine è molto alto. Durante la 2D-PAGE la miscela proteica viene separata in prima dimensione per isoelettrofocalizzazione (IEF) in base alla carica, più precisamente in base al punto isoelettrico, e in seconda dimensione per SDS-PAGE, in base alla massa di ciascuna proteina. Queste due caratteristiche infatti sono completamente ortogonali e permettono di ottenere una elevata risoluzione. Inoltre la 2D-PAGE prevede che per ogni campione siano fatte più repliche, il che conferisce al metodo rilevanza dal punto di vista statistico ed elevata riproducibilità. Infine, grazie allo specifico software PDQuest, è possibile seguire i livelli di espressione di specifiche proteine nelle mappe dei campioni analizzati. I diversi campioni ottenuti da frutti di pomodoro con un diverso stadio di maturazione sono separati su mappe bidimensionali, in cui la prima dimensione è costituita da isoelettrofocalizzazione su IPG in un intervallo di pH 3-8, mentre la seconda dimensione è costituita da un gel denaturante SDS-PAGE. Ogni stadio di sviluppo della bacca di pomodoro è stato analizzato tramite separazione bidimensionale eseguita in tre repliche simultanee, in modo da mediare eventuali variazioni sperimentali (fig. 3).

### *Analisi delle mappe bidimensionali*

Le mappe bidimensionali così prodotte sono state confrontate tra loro in modo da individuare quegli spot presenti in maniera differenziale nei diversi campioni. In particolare, all'interno della complessità delle diverse proteine espresse, è stato eseguito il confronto tra ogni stadio di maturazione, verde piccolo VP, arancio A e rosso R, con il campione verde maturo VM considerato come campione di riferimento. Il numero di spot individuato per ogni campione, ottenuto calcolando la media del numero delle macchie proteiche presenti in ognuna delle 3 repliche, per i campioni VP, A e R e nelle 9 repliche del campione VM è stato rispettivamente di  $126 \pm 18$ ,  $252 \pm 4$ ,  $395 \pm 5$  e  $242 \pm 19$ . Una volta identificati tutte le macchie proteiche di ogni gel, le repliche di un campione sono virtualmente sovrapposte e confrontate con quelle di un campione differente: solo

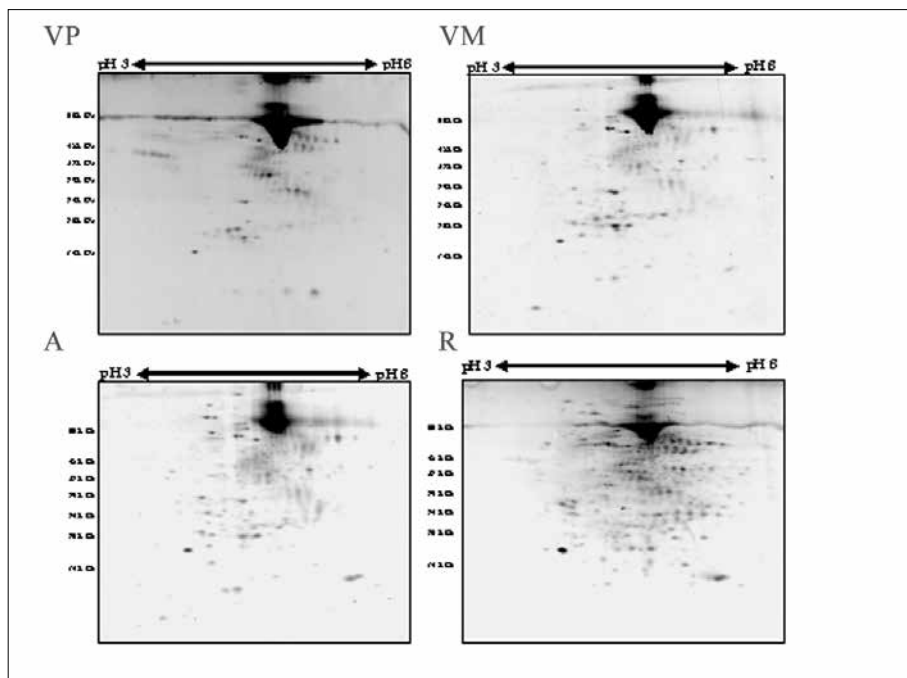


Fig. 3 Stadi maturazione della bacca di pomodoro da cui sono stati purificati i plastidi analizzati in questo lavoro (VP, verde piccolo; VM, verde maturo, A, arancione; R, rosso)

quegli spot che hanno lo stesso comportamento in tutte le repliche possono essere considerati validati per le analisi seguenti. Al termine del lavoro, si ottiene un'immagine virtuale in cui sono indicati tutti gli spot individuati tra le varie mappe bidimensionali: il cosiddetto Mastergel (fig. 4). Questa procedura permette di svolgere l'analisi qualitativa e di evidenziare spot appartenenti ai diversi stadi di maturazione in maniera specifica o conservativa. L'analisi 2D SDS-PAGE permette inoltre di valutare da un punto di vista quantitativo l'abbondanza nei diversi campioni degli spot individuati. Analisi tramite spettrometria di massa delle macchie proteiche identificate dalle mappe bidimensionali delle bacche di pomodoro nei diversi stadi di sviluppo, ha portato all'identificazione di 81 diverse proteine, visualizzate sul Mastergel.

#### *Analisi delle mappe bidimensionali 2D-PAGE*

Dall'analisi dei matchset, sono state individuate 459 proteine espresse nei vari stadi di maturazione in modo qualitativamente differenziale come rappresen-

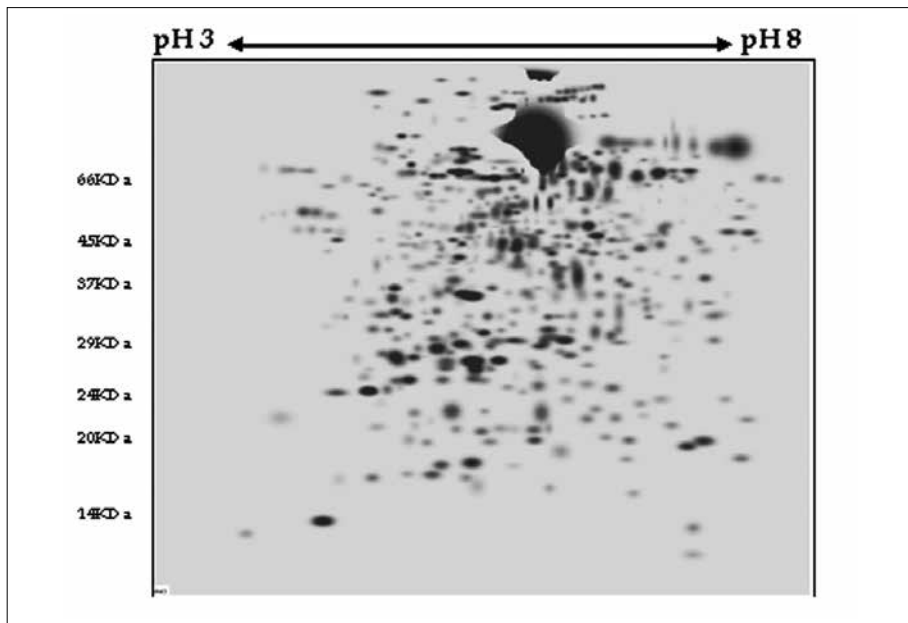


Fig. 4 Mappa Mastergel ottenuta dalla analisi tramite software PDquest delle mappe dei diversi stadi di sviluppo del frutto rappresentate in figura 3

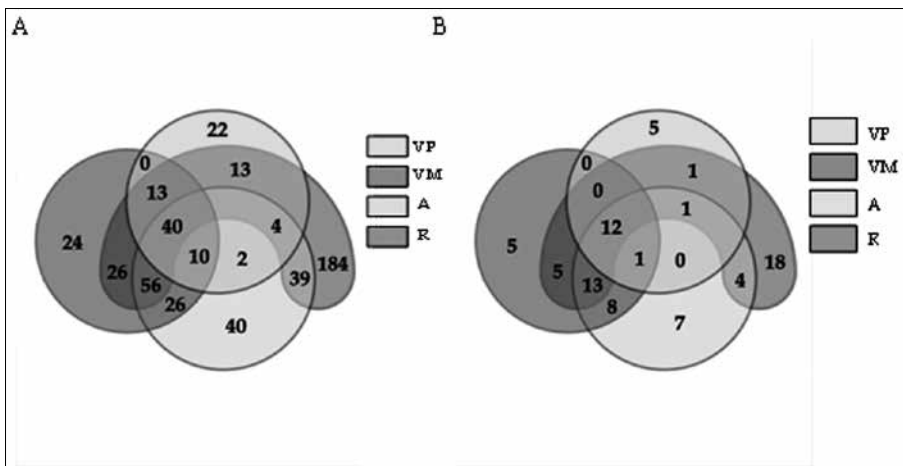


Fig. 5 A) Diagramma di Euler-Venn che rappresenta il numero di proteine identificate per MS presenti solo in uno, solo in due, solo in tre stadi di sviluppo o in tutti gli stadi di sviluppo. B) Diagramma di Euler-Venn che rappresenta il numero di proteine individuate con analisi PDQuest presenti solo in uno, solo in due, solo in tre stadi di sviluppo o in tutti gli stadi di sviluppo

tato in figura 5A. Solamente 40 spot sono risultati conservati nei matchset dei quattro stadi di maturazione. Questo significa che all'interno del plastidio vi sono enormi modificazioni a livello proteico durante la transizione da cloroplasto a cromoplasto, che portano ad avere numero molto basso di proteine comuni riferibili a funzioni "housekeeping" plastidiali come sintesi proteica, biosintesi dei lipidi e metabolismo energetico.

Le 81 proteine identificate dopo analisi MS rappresentano il 16 % degli spot individuati dopo l'analisi delle immagini delle mappe al PDQuest.

In particolare la suddivisione delle proteine identificate nei diversi stadi di sviluppo è rappresentata nella figura 5B.

Successivamente è stata valutata la sequenza degli spot identificati; tramite l'ausilio del software TargetP, è stato possibile identificare quali proteine avessero la pre-sequenza per la localizzazione nel plastidio e quali ne fossero prive. Il recupero in banca dati del trascritto non processato ha permesso di confermare o meno la localizzazione plastidiale e quindi di eliminare dalla successiva analisi i polipeptidi extra-plastidiali (38%). Le proteine plastidiali identificate con certezza nei diversi stadi di sviluppo sono riportate di seguito:

- *Verde piccolo (VP)*: RubisCO (subunità Large e Small), catalasi, superossido dismutasi, aldolasi, subunità alfa della ATPasi, ATP sintasi, ATP sintasi (subunità beta), PSII 23kDa, CP29, ferredossina-NADPH riduttasi, plastocianina, OEC (Oxygen Evolving Complex), PAP (Plastid lipid Associated Protein), Chaperonina 21
- *Verde maturo (VM)*: RubisCO, subunità small della RubisCO, Rubisco Binding Protein (chaperonina), superossido dismutasi, amido fosforilasi, piruvato difosfato dichinasi (PPDK) (Parsley et al., 2006 nelle piante C3 fornisce PEP per gluconeogenesi), putative thiazole biosynthetic protein, fruttosio 1,6 bisfosfato aldolasi, fruttochinasi 3, fosforibulochinasi, subunità alfa della ATPasi, PSII 23kDa, subunità beta della ATP sintasi, CP29, ferredossina-NADPH riduttasi, subunità delta e epsilon della ATP sintasi, subunità epsilon della ATPasi, plastocianina, Oxygen Evolving Complex (OEC), cisteina sintasi, PAP (Plastid lipid Associated Protein), chaperonina 21, chaperonina 10, ribonucleoproteina 33kDa (processamento e splicing dell'mRNA nei cloroplasti Li Y et al., 1993)
- *Arancio (A)*: RubisCO, RubisCO Binding Protein, Subunità Large della RubisCO, superossido dismutasi, chloroplast elongation factor, amido fosforilasi, piruvato difosfato dichinasi (PPDK), thiazole biosynthetic protein, fruttosio 1,6 bisfosfato aldolasi, fruttochinasi 3, subunità alfa della ATPase, PSII 23kDa, subunità beta della ATP sintasi, CP29, ferredossina NADPH riduttasi, subunità epsilon della ATP sintasi, subunità epsilon



della ATPasi, subunità delta della ATP sintasi, plastocianina, Oxygen evolve Complex (OEC), PAP (Plastid lipid Associated Protein), chaperonina 60, chaperonina 21, small HSP, chaperonina 10 (gruppo 20), proteasi Clp ATP dipendente, ribonucleoproteina

- *Rosso (R)*: RubisCO, RubisCO binding protein, subunità Large della Rubisco, superossido dismutasi, lipossigenasi B, amido fosforilasi, piruvato di fosfato dichinasi (PPDK), thiazole biosintetic protein, fruttosio 1,6 bisfosfato aldolasi, gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi, subunità alfa della ATPase, subunità delta della ATP sintasi, PSII 23kDa, subunità beta della ATP sintasi, CP29, ferrodossina NADPH riduttasi, subunità epsilon della ATP sintasi, Oxygen evolve Complex (OEC), cisteina sintasi, PAP (Plastid lipid Associated Protein), chaperonina 21, endopeptidasi Clp, ribonucleoproteina.

Tra le proteine individuate come contaminanti molte sono di origine mitocondriale, altre fanno parte del pool dell'ER e dell'apparato di Golgi, altre ancora del citoscheletro e del citoplasma. Nel caso dei compartimenti cellulari, questi hanno caratteristiche di sedimentazione simili a quelle dei plastidi e, probabilmente, a causa di ciò sono andati a collocarsi nella stessa posizione, durante la separazione in gradiente. Sarà pertanto necessario procedere a un'analisi diretta per microscopia elettronica della banda recuperata da gradiente per confermare questa ipotesi. Per quanto riguarda invece le proteine citoplasmatiche e del citoscheletro, si può supporre che si trovassero adese sulla superficie del plastidio durante la purificazione. È comunque possibile che l'attribuzione di una parte cospicua del proteoma, individuato come "non plastidiale", sia frutto di eccessiva prudenza in quanto il genoma di *Solanum lycopersicum* non è stato ancora completamente sequenziato, ed è quindi possibile che sia avvenuta l'identificazione di un frammento conservato con una proteina omologa con localizzazione non plastidiale. Infatti i peptidi di import, sulla cui presenza vengono fatte le attribuzioni, vengono eliminati dopo il raggiungimento del sito finale di localizzazione delle proteine plastidiali.

Pur su un numero basso di dati, si può notare la comparsa e l'accumulo di chaperonine e di PAP (Plastid lipid Associated Proteins) durante lo sviluppo del cromoplasto, cosa che è in accordo con i dati pubblicati da Pozueta-Romero (Romero et al., 1997) da cui risulta che il gene codificante per la una PAP di *C. annuum*, sebbene sia espresso a bassi livelli nell'intera pianta, venga trascritto massicciamente solo durante le ultime fasi dello sviluppo del frutto.

Inoltre, è molto strano notare la presenza di CP29 anche nei campioni arancione e rosso quando la degradazione del fotosistema II è ormai completa. Ciò fa pensare che CP29, oltre al suo ruolo di antenna, abbia anche altre funzioni, al momento sconosciute.

Nonostante i vantaggi della 2D-PAGE, questo metodo ha mostrato alcuni svantaggi per quanto riguarda la rappresentatività delle mappe con rispetto al campione analizzato. Nonostante lavori precedenti del laboratorio avessero mostrato la possibilità di ottenere buone mappe della frazione proteica membranale (Caffarri et al., 2005; Frigerio et al., 2007) la scelta fatta nel nostro studio di analizzare il proteoma del cloroplasto, contenente sia proteine solubili che di membrana, ha portato a mappe che contengono soprattutto proteine solubili o subunità estrinseche di proteine di membrana, mentre le proteine intrinseche di membrana appaiono poco rappresentate, nonostante tutti i dati in nostro possesso indichino che, almeno nei campioni VP e VM, le proteine dell'apparato fotosintetico (di membrana) siano presenti in grandi quantità e siano pienamente funzionali. In linea di principio sarebbe stato possibile effettuare il pre-frazionamento, andando a separare la frazione solubile e di membrana, prima della 2D-PAGE, ma tale schema sperimentale avrebbe portato al raddoppio del numero dei gel e un aumento sostanziale delle spot da analizzare individualmente. Tale carico di lavoro renderebbe la ricerca onerosa e difficilmente effettuabile in tempi e costi ragionevoli. Concludiamo che il metodo di analisi 2D-PAGE/MS produce dati rappresentativi del proteoma plastidiale solo dopo pre-frazionamento della frazione solubile e di quella di membrana, mentre quando entrambe sono separate nella stessa mappa bidimensionale, si ottiene una forte selezione quantitativa contro le proteine di membrana, anche se condizioni di solubilizzazione e separazione sono ottimizzate per l'analisi di questa classe di polipeptidi (Caffarri et al., 2005; Frigerio et al., 2007). Le tappe che appaiono particolarmente soggette a questa selezione sono la solubilizzazione e l'adsorbimento sul gel IEF. A ciò si aggiunge il fatto che, all'interno del proteoma, esistono gruppi di proteine la cui abbondanza è molto bassa, altri che sono caratterizzati dall'avere un pI estremo e quindi difficilmente focalizzabili in prima dimensione, altri gruppi presentano masse molecolari molto grandi o molto piccole la cui risoluzione nelle mappe non risulta sufficientemente alta. Un'altra problematica correlata alla 2D-PAGE è che i gel sono facilmente contaminabili da cheratina, la quale va a inficiare l'identificazione successiva, producendo una bassa efficienza di identificazione delle macchie proteiche tagliate dai gel rispetto alla quantità di lavoro necessaria all'analisi stessa. Concludiamo che la tecnica di 2D-PAGE/MS, pur essendo in linea di principio quella in grado di dare una visione complessiva e accurata del proteoma, risulta applicabile con buoni risultati solo se le risorse disponibili per l'analisi sono grandi e il tempo poco limitante.

### *Analisi MudPIT*

L'utilizzo della MudPIT permette di eliminare buona parte di questi svantaggi, è applicabile a tutte le tipologie di proteine suddette e permette di identificarne un numero maggiore rispetto alla 2D-PAGE, anche se in modo semi-quantitativo. Infatti, nella *shotgun proteomic*, complesse miscele di proteine vengono digerite in peptidi che sono analizzati da vari tipologie di spettrometria di massa e infine particolari algoritmi permettono di determinare il contenuto della miscela iniziale.

Dopo il passaggio di digestione della miscela di proteine, estratte dal campione biologico d'interesse, i peptidi sono separati grazie a tecniche di cromatografia multidimensionale prima di essere sottoposti ad analisi di massa o di massa/ massa.

In questo studio vengono analizzati con *shotgun proteomic* solamente i campioni provenienti dagli stadi estremi della maturazione, ovvero VP e R, che mostrano differenze più marcate.

Nella frazione di membrana sono state individuate 286 proteine così ripartite:

- 120 plastidiali (42%) di cui 86 nel VP, 22 nel R, 12 sia nel VP che nel R
- 166 di altra localizzazione (58%) di cui 47 nel VP, 101 nel R, 18 sia nel VP che nel R

Nella frazione solubile sono state individuate 189 proteine solubili con le seguenti ripartizioni:

- 82 plastidiali (43.4%) di cui 58 nel VP, 13 nel R, 11 sia nel VP che nel R
- 107 di altra localizzazione (56.6%) di cui 24 nel VP, 79 nel R e 4 sia nel VP che nel R.

Si può notare che la maggior incidenza di contaminanti è stata riscontrata nel campione rosso. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che i cromoplasti sono meno stabili dei cloroplasti e durante l'omogenizzazione del pericarpo si associno più facilmente ad altri componenti cellulari.

Sia le proteine di membrana che quelle della frazione solubile sono state suddivise in classi funzionali sulla base della via metabolica di appartenenza e/o della funzione svolta (fig. 6).

Dalla figura 6 è possibile notare come nei campioni A e R vi sia una forte diminuzione dei geni che codificano per le proteine che costituiscono l'apparato fotosintetico (settima colonna), mentre aumenti l'espressione di chaperonine e di heat shock protein (terza colonna) come e di proteine coinvolte nel metabolismo dei lipidi (decima colonna). È possibile notare come, durante la maturazione all'interno dei plastidi vi è una diminuzione delle attività del metabolismo



minante. In generale si può vedere una diminuzione della RubisCO con la maturazione. In particolare la subunità Small si ritrova solo nel campione VP e VM. Per l'analisi MudPIT, la RubisCO subunità Large è stata eliminata tramite pre-frazionamento per SDS PAGE. In ogni caso è possibile trovare questa proteina anche nella frazione solubile di VP e R, in quantità chiaramente maggiore nel campione verde rispetto a quella presente nel campione rosso. In particolare la RubisCO attivasi, determinante per la funzione della RubisCO si ritrova solo nel campione VP. La RubisCO attivasi mantiene il sito catalitico della Rubisco libero ed è influenzata dal rapporto ATP/ADP (Parry et al., 2008).

Gli altri enzimi del ciclo di Calvin sono stati individuati principalmente tramite MudPIT e sono presenti solo nello stadio VP, tranne la fosfoglicerato kinasi (presente sia in VP che R) e la fruttosio 1,6 bisfosfato aldolasi (dati 2D-PAGE/MS). Quest'ultima, tuttavia, ha un ruolo anche nella glicolisi che, come descritto in seguito, aumenta nello stadio R. La fase oscura della fotosintesi sembra, quindi, non essere più attiva a seguito della transizione cloroplasto-cromoplasto.

#### Fase luminosa della fotosintesi

Per quanto riguarda le proteine facenti parte dell'apparato fotosintetico, dai dati di 2D-PAGE/MS, la ferredossina-NADP reduttasi è presente in tutti gli stadi, la plastocianina in tutti eccetto nel R, la subunità C del PSI nel VM e l'ATP sintasi viene ritrovata in tutti gli stadi. In particolare l'ATP sintasi aumenta con l'avanzare della maturazione come viene riportato in letteratura (Asim Siddique et al., 2006). Altre proteine operanti durante la fase luminosa sono l'Oxygen Evolving Complex (OEC) e in particolare la subunità di 33Kda, ritrovata sia in pomodoro rosso che in peperone rosso (Faurobert, 2007; Summer et al., 1999). Dai nostri dati di 2D-PAGE/MS, l'OEC è presente in tutti gli stadi, con un picco nel VM.

La proteina antenna CP29 è stata ritrovata in tutti gli stadi, anche se in quantità molto ridotta nel campione A e in quello R. Tuttavia, dai dati ottenuti con MudPIT, tutte le proteine coinvolte nella fase luminosa della fotosintesi sono presenti solo nel campione VP, fatta eccezione per l'ATP sintasi, presente anche nei cromoplasti. In particolare CP29 viene ritrovato in diversi picchi, ma sempre appartenenti al campione VP. Questo dato è stato verificato con Western blot e commentato in seguito. Anche la ferredossina NADP reduttasi e l'OEC non sono stati identificati nel campione R tramite 2D-LC/MS.

Durante la maturazione, oltre al ciclo di Calvin, anche la fase luminosa della fotosintesi sembra essere abolita: infatti sia componenti delle antenne periferiche (CP24, CP29, LHCI) che componenti dei core complex (CP43, CP47, D2, PSI-C), vengono ritrovati solo nei campioni verdi.

Il campione arancione rappresenta un caso interessante, in cui plastocianina e ferredossina NADP-reduttasi, coinvolta nel trasporto ciclico (Shahak 1981 BBA), e PSI (da Western blot) sono presenti. La presenza contemporanea di queste proteine suggerisce una possibile attività del PSI tramite trasporto ciclico, come discusso più avanti. L'unico componente della fase luminosa a non essere toccato è l'ATP sintasi, un complesso proteico che agisce sia nella fotofosforilazione lineare che in quella ciclica.

Qual è il ruolo di questa ATP sintasi? Si può postulare che nel cromoplasto svolga un ruolo inverso, cioè idrolizzi ATP per produrre  $\Delta pH$ , con cui spingere l'import di proteine. Summer e Cline, nel lavoro del 1999, hanno dimostrato che la via di import tramite  $\Delta pH$  è attiva nei cromoplasti. Questa ipotesi è confermata dalla presenza di V-ATPasi nel campione rosso. È perciò possibile che nel cromoplasto si instauri un trasporto non-fotosintetico di protoni nel lumen al fine di permettere l'import di pre-proteine dal citoplasma. Questo fenomeno potrebbe anche spiegare l'alta percentuale di polipeptidi non plastidiali ritrovati sia con la 2D-PAGE, sia con la MudPIT.

#### Metabolismo primario: aumento della glicolisi nel cromoplasto

Nella transizione cloro-cromoplasto (e in particolare nei due stadi centrali VM e A) avviene una degradazione di amido (presenza del ssp 2901 del precursore dell'amido forsforilasi) e glicolisi (gliceraldeide 3-p- deidrogenasi, fruttosio-1,6-bisfosfato aldolasi) per produrre ATP e piruvato precursori di varie vie metaboliche secondarie (dati di 2D-PAGE/MS). Risultati, confermati anche da analisi MudPIT, che tuttavia mostrano la presenza di amido fosforilasi ( $\alpha$ -1,4 glucan phosphorylase L-1) nello stadio VP. Questo è spiegabile in quanto nel campione verde piccolo, infatti, essendo ridotto l'apparato fotosintetico, per produrre ATP il frutto ricorre alla degradazione dell'amido. Questo evento si verifica specialmente negli stadi VM e A, mentre diminuisce in quello R. La glicolisi, quindi, fornisce ATP, data la forte diminuzione delle proteine fotosintetiche e si accompagna, nello stadio A, alla produzione di ATP, probabilmente tramite il trasporto ciclico. Inoltre l'ATP può essere idrolizzato dalle ATPasi per produrre  $\Delta pH$  in modo da favorire il trasporto di proteine all'interno

del cromoplasto come descritto da Summer e Cline nel loro lavoro del 1999.

### Enzimi biosintetici di clorofilla e carotenoidi

Tutti gli enzimi per la sintesi delle clorofille sono presenti solo nel campione VP, mentre gli enzimi per la sintesi dei carotenoidi aumentano nel campione R, in particolare fitoene sintasi e fitoene desaturasi che sono coinvolte nell'accumulo di carotenoidi, in particolare licopene (dati MudPIT). Quindi il proteoma rispecchia perfettamente i dati sui metaboliti isoprenoidi determinati negli stessi campioni (tab. 1).

### Detossificazione dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS)

Dai dati ottenuti tramite 2D-PAGE/MS risulta che la catalasi (CAT), è presente solo nello stadio VP, mentre sono state identificate due superossido dismutasi (SOD): una espressa solo nello stadio R e in quello A (ssp5102), l'altra (ssp5101) invece risulta presente in tutti i campioni, ma con un picco nel campione A. La presenza di SOD sia nel cloroplasto che nel cromoplasto è confermata (dati MudPIT), mentre quella della ascorbato perossidasi è riscontrata solo nel campione VP, così come quella della tioredossina perossidasi e della perossiredossina Q.

Questo è in accordo con quanto dimostrato nel lavoro di Jimenez (Jimenez et al., 2002), in cui si riscontra il massimo di attività della CAT e della APX nel campione verde piccolo, mentre la SOD mostra un'attività costante durante tutta la maturazione.

Per quanto riguarda, invece, la SOD durante il processo di *ripening*, la sua presenza è riportata in maniera discordante in diversi lavori, precedenti a quello di Jimenez (Jimenez et al., 2002).

Dai nostri dati l'APX, la cui attività anche è stata rilevata anche nello stadio rosso (Faurobert et al., 2007), è presente nel plastidio solo nel primo stadio di sviluppo, cioè nel VP. Tuttavia, nello stadio R, aumenta l'ascorbato perossidasi citosolica, indicando una possibile diversa localizzazione di questa funzione.

Nella transizione cloroplasto-cromoplasto, quindi, vi è una diversa attività dei vari enzimi coinvolti nella detossificazione dei ROS.

La riduzione dell'attività e la diminuzione delle quantità di catalasi, asco-

bato perossidasi e tioredossina possono essere responsabili dell'accumulo di ROS e in particolare di perossido d'idrogeno durante la transizione da cloroplasto a cromoplasto (Jimenez et al., 2002).

I ROS potrebbero avere un ruolo nel regolare l'espressione genica, in particolare è possibile che esercitino un controllo post-traduzionale di geni plastidiali: è noto infatti dalla letteratura (Shao et al., 2007) che questi geni sono controllati in maniera post-traduzionale da queste molecole.

### Metabolismo degli amminoacidi

Nel campione verde, e nel rosso, seppure in quantità trascurabile rispetto al verde, è stato individuato l'enzima per la sintesi di cisteina. Questo aminoacido è il precursore della biosintesi di metionina, glutatione e metaboliti secondari (Bonner et al., 2005), dalla SAM (S-adenosil-metionina) viene prodotto l'etilene (ciclo della metionina), fondamentale per scatenare i processi di *ripening* (cfr. introduzione). In genere abbiamo riscontrato, in accordo con il lavoro di Faurobert et al., 2007, una riduzione degli enzimi coinvolti nel metabolismo degli amminoacidi, eccezione fatta per l'aspartato amino transferasi coinvolta in molte vie metaboliche.

### Degradazione proteica

L'osservazione dei plastidi al microscopio elettronico mostra chiaramente che le strutture granali, tipiche del cloroplasto, sono distrutte e rimpiazzate da altri tipi di membrane con la caratteristica morfologia ondulata, come le CIMs e i tubuli. Inoltre rispetto ai cloroplasti aumentano di numero e dimensione i plastoglobuli, spesso connessi da strutture tubulari.

La endopeptidasi Clp (ATP binding subunit) è presente nello stadio A e in quello R (dati di 2D-PAGE/MS). Questo enzima viene ritrovato anche nel verde piccolo, integrando questi dati con quelli della MudPIT. Le Clp proteasi sono una grande famiglia di proteasi, ATP dipendenti, che nelle piante superiori si trovano localizzate nei cloroplasti. L'enzima solubile, probabilmente a più subunità, presente nello stroma, è codificato in parte dal nucleo (ClpC, subunità ATPasica regolatoria) in parte dal genoma plastidiale (ClpP, subunità proteolitica di tipo serin proteasi). È stata inoltre individuata in pomodoro un'ulteriore subunità proteolitica, codificata dal genoma nucleare, molto simile a ClpP (Schaller and Ryan, 1996). Questa proteasi Clp è coin-



volta nella degradazione di CAO (clorofilla a ossigenasi), enzima finale della via di biosintesi di clorofilla b, che di conseguenza controlla il livello di Chl b e anche il livello di proteine antenna (Nakagawara et al., 2007), infatti senza clorofilla b, le proteine antenna non si ripiegano correttamente.

Altri enzimi proteolitici, la leucina aminopeptidase e due FtsH-like protein (ATP dipendente come Clp proteasi) sono presenti solo nel campione verde (dati MudPIT).

In particolare la FtsH è coinvolta nella degradazione di PSII da foto inibizione (Adam et al., 2001). Noi supponiamo che la proteasi FtsH, la leucina aminopeptidase e la proteasi Clp inizino la rimozione delle strutture fotosintetiche nel cloroplasto, mentre nel cromoplasto la proteasi Clp completa la loro demolizione, andando ad attaccare la clorofilla a ossigenasi (CAO), responsabile della sintesi di clorofilla b.

Per sostenere questa ipotesi ci basiamo sul fatto che in letteratura è riportata la degradazione di CAO da parte della proteasi Clp. Le proteine antenna, inoltre, sono le sole a legare clorofilla di tipo b. Ne consegue che la riduzione dell'ossigenasi riduce la quantità di clorofilla disponibile per il *folding* di queste proteine, senza la quale tale processo non avviene. L'attività della proteasi Clp, quindi, riduce l'abbondanza delle proteine antenna fotosintetiche. Un'ulteriore evidenza che supporta la suddetta ipotesi consiste nel fatto che la mutazione *chlorina* in orzo e *Arbidopsis*, in cui la funzione della clorofilla a ossigenasi è soppressa, provoca la scomparsa delle proteine antenna (Dall'Osto et al., Dati non pubblicati).

Infine le proteasi Clp e FtsH potrebbero avere un ruolo nella biogenesi dei plastidi: infatti, negli ezioplasti questi enzimi rappresentano la maggior parte delle proteine presenti, come è riportato in letteratura (Kanervo et al., 2008), e in particolare la proteasi Clp è ritrovata anche nei proplastidi (Asim Siddique et al., 2006), progenitori delle altre tipologie di questi organelli.

### Plastid lipid Associated proteins (PAP)

Dai dati derivanti dalla 2D-PAGE/MS si osserva un accumulo di PAP (Plastid lipid Associated Proteins) parallelo alla maturazione, mentre dai dati di shotgun proteomic vi è un sostanziale aumento di CHRC (famiglia delle PAP) nello stadio R. CHRC è coinvolta nella compartimentalizzazione dei carotenoidi nelle strutture plastoglobulari. Evidenze per questa ipotesi si trovano nel fatto che i livelli di trascritto e di proteina aumentano parallelamente all'accumulo di carotenoidi (Deruere et al., 1994) e che un omologo di

CHRC è stato identificato sulla superficie dei plastoglobuli. L'accumulo dei membri di questa famiglia di proteine è accelerato da vari stress: es. CDSP34 di *S. tuberosum* viene accumulato in condizioni di stress ossidativo (Monte et al., 1999). Inoltre noi abbiamo una plastid lipid associated protein 1 nello stadio verde piccolo e una lipid associated protein 3 in quello rosso. Questo potrebbe significare che esistono varie isoforme di queste proteine, specifiche per lo stadio di sviluppo in cui vengono espresse, che potrebbero avere addirittura con funzioni diverse: nei primi stadi di sviluppo potrebbero organizzare e immagazzinare i carotenoidi, mentre le isoforme degli stadi successivi potrebbero avere un ruolo nella protezione dallo stress ossidativo. Sarà interessante procedere a silenziare queste funzioni tramite *RNA interference* per verificare un possibile effetto nella organizzazione del licopene nei cromoplasti o nella fotosintesi.

### Metabolismo dei lipidi

Per quanto riguarda il metabolismo dei lipidi, si riscontra l'accumulo di lipossigenasi nel campione rosso, in linea con il dato riportato da Faurobert et al., 2004. La presenza di questi enzimi è determinante nella sintesi dell'acido jasmonico, un importante messaggero cellulare, coinvolto nella regolazione di molti processi come la risposta a stress biotici e abiotici, ad esempio il danno per eccesso di luce o lo stress idrico.

Oltre alla sintesi di questo ormone, la presenza di lipossigenasi e di altri enzimi coinvolti nel metabolismo lipidico, potrebbe presupporre la presenza di una tappa di degradazione e modificazione delle membrane con la maturazione. Infatti nel campione rosso sparisce anche la carbossil trasferasi, coinvolta nella sintesi delle membrane, e aumentano altri enzimi degradativi, come le acido grasso idrossilasi, citocromo P450 dipendenti.

### Chaperonine e HSP

Le chaperonine e le HSP si accumulano principalmente nel campione A (dati 2D-PAGE/MS). In particolare la HSP 60 è presente solo nello stadio R, risultato contrastante con quelli precedentemente riportati in letteratura (Faurobert et al., 2004). Tuttavia, dai dati MudPIT, questa heat shock protein è presente anche nel campione VP. Sempre dai dati ottenuti da 2D-PAGE/MS la HSP 21 è presente in tutti gli stadi, in quantità maggiore

nel VM e nel A, come la HSP10 (sempre facente parte della famiglia delle small HSP).

In particolare, da quanto emerge dai risultati della MudPIT si accumula nel campione A e varie nel R, una small heat shock protein. A giudicare dal numero di sequenze appartenenti a chaperonine o a HSP, la loro funzione è indispensabile al processo di sviluppo del cromoplasto, anche se questo non è sottoposto a stress da calore (inteso come condizione di induzione quando queste classi di proteine furono scoperte) ma piuttosto di stress ossidativo.

La tesi che le HSP possano essere coinvolte in molti sistemi in sviluppo è già stata proposta (Christians et al., 2003). Il caso della bacca del pomodoro sembra una situazione estrema, con ben 16 tra HSP e chaperonine riscontrate. Anche qui sarà necessario ricorrere a RNA-i per verificare il ruolo delle HSP più espresse nella cromoplastogenesi.

In pomodoro, la HSP 70 è regolata in modo sviluppo specifico (Duck et al., 1989). Nel database TIGR EST la sua espressione è concomitante allo stadio di transizione da cloroplasto a cromoplasto ed è stata individuata anche in cromoplasti di peperone.

Il ruolo di queste proteine è probabilmente quello di prevenire l'aggregazione di proteine denaturate e/o di facilitare il corretto ripiegamento delle proteine aggregate durante lo stress ossidativo nel frutto. Questo stesso ruolo è stato suggerito per le HSP (Sun et al., 2002). Oltre a ciò Neta-Sharir (Neta-Sharir et al., 2005) ha dimostrato che la HSP 21 protegge il PSII da stress ossidativo-temperatura dipendente, ma anche promuove l'accumulo di carotenoidi durante lo sviluppo del frutto. Un'altra small HSP (vis1) è coinvolta nella de-polimerizzazione della pectina durante il ripening, determinando la particolare viscosità del frutto di pomodoro.

Un ruolo particolare potrebbe essere svolto dalla chaperonina DnaJ: il gene Or di cavolfiore, espresso in patata causa la differenziazione di cromoplasti (Li et Van Eck, 2007). Questa proteina ha in comune con DnaJ un motivo di tipo "Cys rich zinc finger" (Giuliano et Diretto, 2007). La proteina DnaJ potrebbe quindi essere coinvolta nella divisione dei cloro/cromoplasti durante lo sviluppo del frutto, come ipotizzato dal lavoro di G. Giuliano e G. Diretto.

### Proteine "unknown"

Nella frazione di membrana dell'analisi MudPIT sono presenti 22 proteine definite "unknown", di cui solamente 4 sono presenti nel campione R, men-

tre tra le proteine solubili, quelle con funzione sconosciuta sono così ripartite: 6 nel campione VP, 2 in quello R e 2 conservate in entrambi gli stadi di sviluppo.

Queste potrebbero rappresentare proteine con funzioni specifiche durante la cromoplastogenesi, ipotesi che verrà verificata in futuro con mutagenesi o RNA-interference.

I dati derivanti dalla *shotgun proteomic* mostrano dunque che tra le proteine di membrana, durante la transizione da cloroplasto a cromoplasto, vi è una forte diminuzione delle proteine fotosintetiche, mentre vi è un aumento dell'espressione di HSP, chaperonine e di proteine coinvolte nel metabolismo dei lipidi (citocromo P450 idrossilasi e lipossigenasi). Tra le proteine solubili, durante la transizione tra cloroplasto e cromoplasto, vi è diminuzione delle attività del metabolismo primario, del ciclo di Calvin e del metabolismo degli aminoacidi, mentre aumentano le proteine PAP, associate ai lipidi e coinvolte nella formazione delle strutture che immagazzinano i carotenoidi, come, ad esempio, i plastoglobuli (Leitner-Dagan et al., 2006).

## CONCLUSIONI

In questo lavoro abbiamo studiato le modificazioni del plastidio associate alla maturazione della bacca di pomodoro attraverso misure proteomiche, fisiologiche e di specifici metaboliti. La cromoplasto genesi è associata alla degradazione progressiva dell'apparato foto sintetico e alla comparsa di "plastid lipid associated proteins". La funzione di queste proteine è sconosciuta ma diversi lavori le associano alla organizzazione dei pigmenti nei cromoplasti di petali e frutti. Le PAP, in virtù della loro aumentata espressione in diverse condizione di stress, potrebbero essere funzionalmente associate al gruppo delle "heat shock proteins" (Leitner-Dagan et al., 2006) L'accumulo di HSP durante tutto il processo della cromoplastogenesi è l'aspetto più sorprendente di questo lavoro in quanto sono stati trovate almeno 16 di questa famiglia solo nel proteoma plastidico e il loro accumulo è associato agli stadi arancione e rosso in cui il processo di sviluppo subisce una drastica accelerazione. Inoltre, anche nella frazione considerata "contaminante" la presenza di membri di questa famiglia è massiccia, con una trentina di proteine identificate. Non è da escludere che queste possano trovarsi associate alla membrana esterna del plastidio, come abbiamo precedentemente postulato. Noi proponiamo che le proteine HSP abbiano un ruolo importante nello sviluppo come già

ipotizzato nello sviluppo embrionale (Christians et al., 2003) e nello sviluppo del seme (Dafny-Yelin, 2008). L'analisi proteomica è risultata interessante per proporre ipotesi sul processo di maturazione. Nel proseguo del lavoro intendiamo procedere alla verifica di tali ipotesi, attraverso l'inibizione della sintesi di alcune delle proteine identificate per RNA-interference. Dal punto di vista metodologico, il confronto tra i due metodi impiegati, 2D-PAGE e shotgun proteomic, ha confermato che la seconda tecnica permette di ottenere dati più rappresentativi dello stato del proteoma in analisi e richiede un minore investimento rispetto alla prima.

#### RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato finanziato dal fondo FIRB RBLA0345SF002.

#### RIASSUNTO

La differenziazione dei plastidi dal cloroplasto al cromoplasto è stata studiata nei frutti di *Solanum lycopersicum*, applicando un approccio di analisi proteomica combinato. In particolare sono state applicate le tecniche proteomiche 2D-PAGE/MS e MudPIT LC / MS su plastidi isolati da quattro stadi diversi di maturazione della bacca di pomodoro, ottenendo l'identificazione di 556 proteine, tra cui 233 con localizzazione plastidiale. I nostri risultati permettono di chiarire la distribuzione durante la maturazione dei frutti di prodotti genici coinvolti in diverse funzioni metaboliche, come zuccheri, lipidi, aminoacidi, proteine, assimilazione di azoto e zolfo, biosintesi di tetrapirroli e carotenoidi, la fotosintesi e gli stress abiotici. In particolare le proteine fotosintetiche sono accumulate in tutte le fasi di maturazione, anche se fortemente ridotte nei frutti rossi maturi.

#### ABSTRACT

Plastid differentiation from chloroplast to chromoplast has been studied in *Solanum lycopersicum* fruits, applying a combined proteomic approach. In particular 2D-PAGE/MS and MudPIT LC/MS proteomic analysis performed on plastids isolated from four different fruit ripening stages, allowed identifying 556 tomato proteins, among which 233 with plastid localization. Our results elucidate the distribution during fruit ripening of gene products involved in different metabolic functions as sugars, lipids, amino acids, protein, nitrogen and sulphur metabolism, tetrapyrroles and carotenoids biosynthesis, photosynthesis and abiotic stress. In particular photosynthetic proteins are accumulated in all ripening stages, even if strongly reduced in mature red fruits.

## BIBLIOGRAFIA

- ADAM Z., OSTERSETZER O. (2001): *Degradation of unassembled and damaged thylakoid proteins*, «Biochemical Society Transactions», 29, pp. 427-430.
- ASIM SIDDIQUE M., GROSSMANN J., GRUISSEM W., BAGINSKY S. (2006): *Proteome analysis of bell pepper (Capsicum annuum L.) chromoplasts*, «Plant Cell Physiology», 47, 12, pp. 1663-1673.
- BALLOTTARI M., DALL'OSTO L., MOROSINOTTO T., BASSI R. (2007): *Contrasting behavior of higher plant photosystem I and II antenna systems during acclimation*, «J. Biol. Chem.», 282, 12, pp. 8947-58.
- BOUVIER F., BACKHAUS R.A., CAMARA B. (1998): *Induction and control of chromoplast specific carotenoid genes by oxydative stress*, «The Journal of Biological Chemistry», 273, 46, pp. 30651-30659.
- CAFFARRI S., FRIGERIO S., OLIVIERI E., RIGHETTI P.G., BASSI R. (2005): *Differential accumulation of Lhcb gene products in thylakoid membranes of Zea mays plants grown under contrasting light and temperature conditions*, «Proteomics», 5, pp. 758-768.
- CAMARA B., HUGUENEY P., BOUVIER F., KUNZ M., MONEGER R. (1995): *Biochemistry and molecular biology of chromoplast development*, «International Review of Cytology», 163, pp. 175-247.
- CARRARI F., FERNIE A.R. (2006): *Metabolic regulation underlying tomato fruit development*, «Journal of Experimental Botany», 50, 9, pp. 1883-1897.
- CHASTAIN C.J., FRIES J.P., VOGEL J.A., RANDKLEV C.L., VOSSEN A.P., DITTMER S.K., WATKINS E.E., FIEDLER L.J., WACKER S.A., MEINHOVER K.C., SARATH G., CHOLLET R. (2002): *Pyruvate, Orthophosphate Dikinase in Leaves and Chloroplasts of C3 Plants Undergoes Light-/Dark-Induced Reversible Phosphorylation1*, «Plant Physiology», 128, pp. 1368-1378.
- CHRISTIANS E.S., ZHOU Q., RENARD J., BENJAMIN I.J. (2003): *Heat shock proteins in mammalian development*, «Semin. Cell. Dev. Biol.», 14, 5, pp. 283-90.
- CROCE R., CANINO G., ROS F., BASSI R. (2002): *Chromophore organization in the higher plant Photosystem II antenna protein CP26*, «Biochemistry», 41, pp. 7334-7343.
- DAFNY-YELIN M., TZFIRA T., VAINSTEIN A., ADAM Z. (2008): *Non-redundant functions of sHSP-CIs in acquired thermotolerance and their role in early seed development in Arabidopsis*, «Plant Molecular Biology», 67, pp. 363-373.
- DEBASHISH BHATTACHARYA, LINDA MEDLIN (1998): *Algal Phylogeny and the Origin of Land Plants*, «Plant. Physiol.», 116, pp. 9-15.
- FAUROBERT M., MIHR C., BERTIN N., PAWLOWSKI T., NEGRONI L., SOMMERER N., CAUSSE M. (2007): *Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening*, «Plant. Physiol.», 143, pp. 1327-1346.
- FRIGERIO S., CAMPOLI C., ZORZAN S., FANTONI L.I., CROSATTI C., DREPPER F., HAEHNEL W., CATTIVELLI L., MOROSINOTTO T., BASSI R. (2007): *Photosynthetic antenna size in higher plants is controlled by the plastoquinone redox state at the post-transcriptional rather than transcriptional level*, «J. Biol. Chem.», 282, 40, pp. 29457-69.
- GIANAZZA E., CHILLEMI F., DURANTI M., RIGHETTI P.G. (1983): *Analytical and preparative isoelectric focusing of peptides in immobilized pH gradients*, «J. Biochem. Biophys. Methods», 8, pp. 339-351.
- GIOVANNONI J.J. (2004): *Genetic regulation of fruit development and ripening*, «The Plant Cell», 16, pp. 170-180, Supplement 2004.
- GIULIANO G., DIRETTO G. (2007): *Of chromoplasts and chaperones*, «Trend in plant science», 12, 12, pp. 529-531.

- GORDON, J.A., JENCKS, W.P. (1963): *The relationship of structure to the effectiveness of denaturing agents for proteins*, «Biochemistry», 2, pp. 47-57.
- HAGEL P., GERDING J.J., FIEGGEN W., BLOEMENDAL H. (1971): *Cyanate formation in solutions of urea. I. Calculation of cyanate concentrations at different temperature and pH*, «Biochim. Biophys. Acta», 243, pp. 366-373.
- HEBER U., WALKER D. (1992): *Concerning a dual function of coupled cyclic electron transport in leaves*, «Plant Physiology», 100, pp. 1621-1626.
- HERBERT B.R., MOLLOY M.P., GOOLEY A.A., WALSH B.J., BRYSON W.G., WILLIAMS, K.L. (1998): *Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent*, «Electrophoresis», 19, pp. 845-851.
- JIMENEZ A., CREISSEN G., KULAR B., FIRMIN J., ROBINSON S., VERHOEYEN M., MUL-LINEAUX P. (2002): *Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening*, «Planta», 214, pp. 751-758.
- KANERVO E., SINGH M., SUORSA M., PAAKKARINEN V., ARO E., BATTCHIKOVA N., ARO EM. (2008): *Expression of protein complexes and individual proteins upon transition of etio-plasts to chloroplasts in pea (Pisum sativum)* «Plant Cell Physiol.», 49, 3, pp. 396-410.
- KHACHIK F., CARVALHO L., BERNSTEIN P. S., MUIR G.J., DA-YOU ZHAO, KATZ N.B. (2002): *Chemistry, Distribution, and Metabolism of Tomato Carotenoids and Their Impact on Human Health*, «Experimental Biology and Medicine», 227, pp. 845-851.
- KOHLER R.H., CAO J., ZIPFEL W.R., WEBB W.W., HANSON M.R. (1997): *Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids*, «Science», 276, pp. 2039-2042.
- LEITNER-DAGAN Y., OVADIS M., SHKLARMAN E., ELAD Y., RAV DAVID D., VAINSTEIN A. (2006): *Expression and functional analyses of Plastid Lipid Associated Protein CHRC suggest its role in chromoplastogenesis and stress*, «Plant Physiology», 142, pp. 233-244.
- LI L., VAN ECK J. (2007): *Metabolic engineering of carotenoid accumulation by creating a metabolic sink*, «Transgenic Res. Oct», 16(5), pp. 581-5.
- LJUBESIC N., WRISCHER M., DEVIDE Z. (1991): *Chromoplasts - the last stages in plastid development*, «Int.I. Dev.Biol.», 35, pp. 251-258 .
- MOLLOY M.P., HERBERT B.R., WALSH B.J., TYLER M.I., TRAINI M., SANCHEZ J.C., HOCHSTRASSER D.F., WILLIAMS K.L., GOOLEY A.A. (1998): *Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis*, «Electrophoresis», 19, pp. 837-844.
- MUIR SR., COLLINS GJ., ROBINSON S., HUGHES S., BOVY A., DE VOS CHR., VAN TUNEN AJ., VERHOEYEN ME. (2001): *Over expression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols*, «Nature Biotechnology», 19, pp. 470-474.
- NÄGELE E., VOLLMER M., HÖRTH P., VAD C. (2004): *2D-LC/MS techniques for the identification of proteins in highly complex mixtures*, «Expert Rev. Proteomics», 1(1), pp. 37-46 .
- NETA-SHARIR I., ISAACSON T., LURIE S., WEISS D. (2005): *Dual Role for Tomato Heat Shock Protein 21: Protecting Photosystem II from Oxidative Stress and Promoting Color Changes during Fruit Maturation*, «The Plant Cell», 17, pp. 1829-1838.
- NIYOGI K. K (1999): *Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches*, «Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.», 50, pp. 333-59.
- PARRY A.J., KEYS A.J., MADGWICK P.J., CARMO-SILVA A.E., ANDRALOJC P.J. (2008): *Rubisco regulation: a role for inhibitors*, «Journal of Experimental Botany», 59, 7, pp. 1569-1580.

- POZUETA-ROMERO J., RAFIA F., HOULNÉ C., CHENICLET C., CARDE J.P., SCHANTZ M.L., SCHANTZ R. (1997): *A ubiquitous plant housekeeping gene, PAP, encodes a major protein component of bell pepper chloroplasts*, «Plant Physiol», 115, pp. 1185-1194.
- RABILLOUD T., ADESSI C., GIRAUDÉL A., LUNARDI J. (1997): *Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients*, «Electrophoresis», 18, pp. 307-316.
- RAMAKRISHNA W., DENG Z., DING CK., HANDA AK., OZMINKOWSKI RH JR. (2003): *A novel small heat shock protein gene, vis1, contributes to pectin depolymerization and juice viscosity in tomato fruit*, «Plant Physiol.», 131(2), pp. 725-35.
- RIGHETTI P.G. (1990): *Recent developments in electrophoretic methods*, «J.Chromatogr.», 516, pp. 3-22.
- SCHALLER A., RYAN CA. (1996): *Molecular cloning of a tomato leaf cDNA encoding an aspartic protease, a systemic wound response protein*, «Plant Mol Biol», 31, pp. 1073-1077.
- SHAO N., KRIEGER-LISZKAY A., SCHRODA M., BECK CF. (2007): *A reporter system for the individual detection of hydrogen peroxide and singlet oxygen: its use for the assay of reactive oxygen species produced in vivo*, «Plant Journal», 50 (3), pp. 475-87.
- SOKOLENKO A., LERBS-MANCHE S., ALTSCHMIED L., HERRMANN R.G. (1998): *Clp protease and their diversity in chloroplast*, «Planta», 207, pp. 286-295.
- SUMMER E., CLINE K. (1999): *Red bell pepper chloroplast exhibit in vitro import competency and membrane targeting of passenger proteins from thylakoid Sec and  $\Delta$ pH pathways but not signal recognition particle pathway*, «Plant physiology», 119, pp. 575-584.
- SUN W., VAN MONTAGU M., VERBRUGGEN, N. (2002): *Small heat shock proteins and stress tolerance in plants*, «Biochim. Biophys. Acta», 1577, pp. 1-9.
- SWANSON S.K. AND WASHBURN M.P. (2005): *The continuing evolution of shotgun proteomics*, «Drug Discovery Today», 10, n. 10, pp. 719-725.
- VALLON O., BULTE L., DAINESE P., OLIVE J., BASSI R., WOLLMAN FA. (1991): *Lateral redistribution of cytochrome b6/f complexes along thylakoid membranes upon state transitions* «Proc. Natl. Acad. Sci. U S A», 88(18), pp. 8262-6.
- VERHOEYEN M. E., BOVY A., COLLINS G., MUIR S., ROBINSON S., DE VOS C. H. R. AND COLLIVER S. (2002): *Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway*, «Journal of Experimental Botany», 53, 377, pp. 2099-2106.
- WILKINS M.R., GASTEIGER E., SANCHEZ J.C., BAIROCH A., HOCHSTRASSER D.F. (1998): *Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: the effects of protein hydrophobicity and copy number*, «Electrophoresis», 19, pp. 1501-1505.



FRANZ-W. BADECK\*, FULVIA RIZZA\*, ELISABETTA MAZZUCOTELLI\*,  
CATERINA MARÉ\*, FRANCO MIGLIETTA\*\*, ALESSANDRO ZALDEI\*\*,  
LUIGI CATTIVELLI\*

## Il ruolo centrale del cloroplasto nella risposta della produzione vegetale all'incremento della CO<sub>2</sub> atmosferica

La concentrazione atmosferica di anidride carbonica (CO<sub>2</sub>) è in continuo aumento a causa dell'utilizzo dei carburanti fossili, delle emissioni prodotte dalle attività industriali e dei cambiamenti nell'utilizzo del suolo.

Le misure effettuate presso la stazione di Mauna Loa (Hawaii) dimostrano che la concentrazione di CO<sub>2</sub> dell'atmosfera era inferiore a 320 ppm (parti per milione) nel 1958, anno di inizio delle misure ed è arrivata a 393 ppm nel 2011 (fig. 1). In confronto alla variazione naturale osservata nel corso dei cicli glaciale/interglaciale dove si verificavano oscillazioni fra 180 e 280 ppm, gli effetti di deforestazione e industrializzazione hanno condotto a un livello di CO<sub>2</sub> atmosferica fuori dalla gamma di valori preponderanti nel corso dell'evoluzione dell'uomo moderno e delle civiltà umane. Ulteriori incrementi della CO<sub>2</sub> atmosferica sono previsti per il ventunesimo secolo a causa del continuo utilizzo di carburanti fossili e raggiungeranno una concentrazione stimata intorno a 550 ppm a metà del secolo (IPCC, 2000).

Da una parte l'aumento della CO<sub>2</sub> atmosferica è una delle maggiori cause dell'attuale riscaldamento globale antropogenico (IPCC, 2007) e per questo rappresenta una delle principali preoccupazioni rispetto ai cambiamenti globali. D'altra parte, però, la CO<sub>2</sub> atmosferica è la fonte principale di carbonio organico contenuto negli esseri viventi. Attraverso il processo di fotosintesi il carbonio della CO<sub>2</sub> viene catturato, ridotto e assimilato in biomolecole nelle piante. Nella maggior parte delle specie vegetali (piante C3) l'enzima RuBisCO (Ribuloso Bisfosfato Carbossilasi/Ossigenasi), che catalizza la carbos-

\* *Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura, Centro per la Genomica e Postgenomica animale e vegetale (CRA-GPG), Fiorenzuola d'Arda (PC)*

\*\* *Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Biometeorologia (CNR-Ibimet), Firenze*

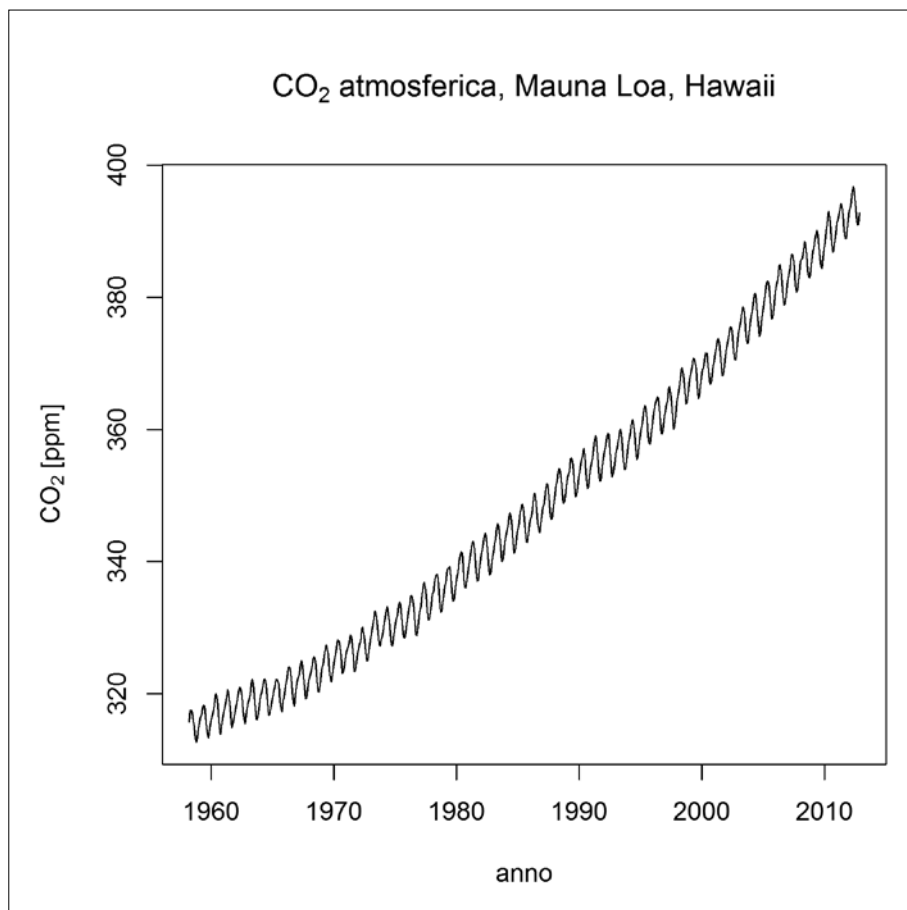


Fig. 1 Concentrazione della CO<sub>2</sub> atmosferica misurata a Mauna Loa (Hawaii), stazione di riferimento caratterizzata da masse d'aria rappresentative per l'emisfero Nord (per informazioni ulteriori vedi Keeling et al., 1995). I dati sono pubblicamente disponibili sul sito: [http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/#mlo\\_data](http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/#mlo_data)

silazione di un zucchero C5 con la CO<sub>2</sub>, lavora a concentrazioni che sono sub-saturanti di CO<sub>2</sub> alla concentrazione atmosferica attuale. Di conseguenza l'aumento storico della CO<sub>2</sub> atmosferica come pure l'ulteriore aumento previsto nelle prossime decadi portano in sé il potenziale per un'assimilazione superiore di carbonio tramite la fotosintesi nelle piante C3 (fig. 2).

Infatti, molti studi relativi agli effetti dell'aumento di CO<sub>2</sub> su fotosintesi e crescita delle piante C3 hanno dimostrato una stimolazione della produzione fotosintetica e successivamente della crescita (vedi review di Ainsworth &

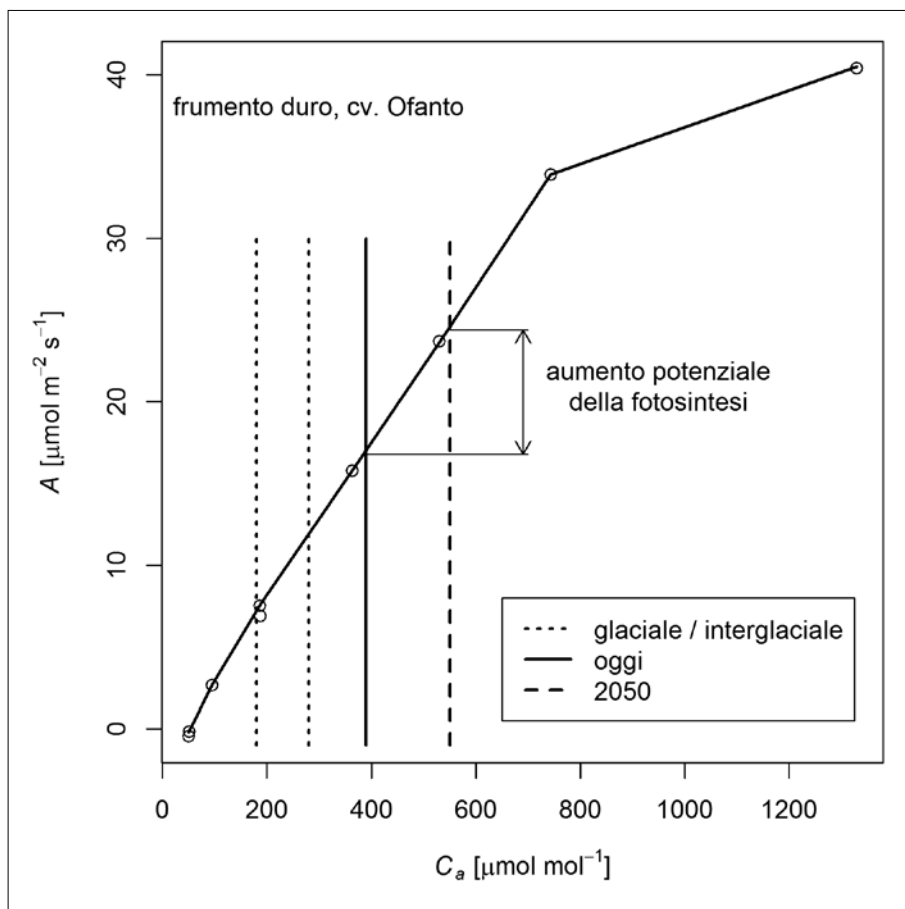


Fig. 2 Risposta della fotosintesi nella varietà Ofanto a  $\text{CO}_2$  ambiente, misurata a  $24^\circ\text{C}$  (temperatura fogliare) e flusso di fotoni fotosinteticamente attivi pari a  $1500 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Le linee verticali segnalano la concentrazione della  $\text{CO}_2$  atmosferica attuale (tratto continuo) e quella prevista per la metà del secolo (linea tratteggiata). Le linee punteggiate indicano il range delle concentrazioni della  $\text{CO}_2$  atmosferica nel corso dei cicli glaciale/interglaciale prima dell'inizio dell'industrializzazione. La freccia indica l'aumento potenziale della fotosintesi, i.e. in assenza della messa in atto da parte delle piante di processi di acclimatamento a una modificata concentrazione della  $\text{CO}_2$  ambiente

Long, 2005). Per le piante coltivate, lo stimolo alla crescita si traduce frequentemente anche in un aumento della resa produttiva (tab. 1). Tuttavia, spesso, il pieno potenziale di questa stimolazione dei processi di assimilazione e crescita atteso sulla base della cinetica della RuBisCO non si realizza completamente a causa di una riduzione della capacità fotosintetica di piante

SPECIE	DF	EFFETTO MEDIO	LIMITE DI CONFIDENZA INFERIORE	LIMITE DI CONFIDENZA SUPERIORE
Frumento tenero	4	1.144	0.984	1.331
Sorgo	11	1.048	0.970	1.132
Cotone	6	1.422	1.237	1.636
Riso	5	1.104	0.936	1.302

Tab. 1 *Risultati di una meta-analisi degli effetti dell'aumento della CO<sub>2</sub> atmosferica sulla resa produttiva di specie coltivate (rapporto fra resa nel trattamento ad alta CO<sub>2</sub> rispetto alla resa in CO<sub>2</sub> ambiente) studiate in sperimentazioni FACE (Free Air Carbon dioxide Enrichment, arricchimento di CO<sub>2</sub> dell'aria aperta) con CO<sub>2</sub> elevata » CO<sub>2</sub> ambiente + 200 ppm (Ainsworth & Long, 2005)*

cresciute a CO<sub>2</sub> elevata (meccanismo chiamato sottoregolazione della fotosintesi o acclimatamento verso il basso). Sono state identificate interazioni degli effetti dell'incremento di CO<sub>2</sub> con la disponibilità di nutrienti e l'efficienza nell'utilizzo d'acqua (vedi review di Leakey et al., 2009). Quindi, se l'aumento della resa produttiva è considerato un fattore che contrasterebbe gli effetti negativi del riscaldamento globale nelle prossime decadi, c'è ancora una considerevole incertezza riguardo la dimensione di questa stimolazione della produzione vegetale (Lobell & Gourdji, 2012).

La stimolazione dell'assimilazione fotosintetica di carbonio è l'effetto diretto principale dell'aumento della CO<sub>2</sub> atmosferica. Alcuni studi dimostrano anche un effetto diretto sulla respirazione (Griffin et al., 1999). Tuttavia le indicazioni rispetto a questo secondo effetto potenziale diretto della CO<sub>2</sub> sono ancora contraddittorie, mentre è evidente l'effetto diretto principale sull'assimilazione fotosintetica. In questo senso il cloroplasto e la fotosintesi si evidenziano come sito centrale dell'interazione delle piante con la concentrazione di CO<sub>2</sub> nell'atmosfera dell'ambiente circostante. Al di là di questo effetto diretto sono stati documentati molti effetti indiretti relativi all'allocazione della biomassa, la composizione biochimica degli organi, il metabolismo secondario (Ainsworth & Long, 2005). La maggior parte di questi sono effetti secondari dovuti a varie interazioni della aumentata quantità di assimilati con i programmi che le piante mettono in atto per il bilanciamento di questi nell'utilizzo di risorse, risposta agli stress e strategie d'allocazione conducendo a variazioni nell'accumulo di biomassa e nell'allocazione a organi, processi di difesa e essudazione. A valle dei cambiamenti nel rapporto domanda/offerta dei carboidrati in piante cresciute a CO<sub>2</sub> elevata ulteriori cambiamenti nel metabolismo causano variazioni nella composizione chimica della biomassa e più specificamente nella qualità degli organi raccolti (vedi review di Taub et al., 2008).

MISURATO SU	NUMERO DI OSSERVAZIONI	EFFETTO MEDIO	LIMITE DI CONFIDENZA INFERIORE	LIMITE DI CONFIDENZA SUPERIORE
granella	87	0.890	0.867	0.913
farina	28	0.94	0.918	0.959

Tab. 2 *Meta-analisi della risposta del contenuto proteico del seme (rapporto fra contenuto nel trattamento ad alta CO<sub>2</sub> rispetto al contenuto in CO<sub>2</sub> ambiente) del frumento tenero a un aumento della CO<sub>2</sub> atmosferica. Le concentrazioni di CO<sub>2</sub> utilizzate variavano tra 315 e 400 ppm nei trattamenti a CO<sub>2</sub> ambiente e tra 540 e 958 ppm nei trattamenti a CO<sub>2</sub> elevata. I dati si riferiscono a sperimentazioni in diversi sistemi sperimentali: FACE, camere di crescita e serre (Taub et al., 2008)*

Per quanto riguarda il frumento duro, la risposta all'aumento della CO<sub>2</sub> atmosferica è ancora poco conosciuta. È importante caratterizzare la risposta di questa specie a questo fattore principale dei cambiamenti globali perché il grano duro è una delle maggiori specie coltivate nel bacino Mediterraneo per numerosi diversi usi (pasta, cous cous, tabulé, pane, pizza, dolci) con un'alta rilevanza economica. È necessario valutare la variabilità genetica della risposta all'aumento della CO<sub>2</sub> atmosferica al fine di identificare i genotipi più promettenti per la selezione di nuove varietà in grado di sfruttare in modo ottimale gli aumentati livelli di CO<sub>2</sub> atmosferica. A questo scopo un esperimento a pieno campo è attualmente in corso nei campi sperimentali del CRA-GPG di Fiorenzuola d'Arda applicando la tecnica FACE (Free Air Carbon dioxide Enrichment) con l'obiettivo di studiare gli effetti dell'aumento della CO<sub>2</sub> atmosferica su crescita, resa e qualità della granella del grano duro (<http://centrodigenomica.entecra.it/research/durumFACE>).

Dieci varietà di grano duro (*Triticum durum*) con caratteri qualitativi contrastanti sono state selezionate per questa sperimentazione (Anco Marzio, Aureo, Cappelli, Ciccio, Claudio, Creso, Ofanto, Saragolla, Simeto, Svevo). Inoltre sono state introdotte nell'esperimento due linee (RIL11 and RIL28) selezionate presso il centro CRA-CER (Centro di Ricerca per la cerealicoltura) di Foggia della popolazione ricombinante derivata dall'incrocio Ofanto x Cappelli, contrastanti per l'efficienza dell'utilizzo d'acqua.

I sistemi FACE sono la migliore tecnica attualmente disponibile per lo studio delle risposte di piante coltivate all'aumento della CO<sub>2</sub> atmosferica in condizioni di pieno campo (Hendrey & Miglietta, 2006). La più recente generazione di sistemi FACE è stata sviluppata dal CNR-IBIMET (<http://www.biosphere.ibimet.cnr.it>) e utilizzata per esporre le piante a 570 ppm di CO<sub>2</sub>. L'anidride carbonica viene rilasciata tramite getti di CO<sub>2</sub> a velocità ultra-sonica da tubi installati in recinti ottagonali. Le unità sperimentali sono parcelle di 2.2 x 1.36 m. Il trattamento FACE viene applicato a 4 ottagoni inscritti in

cerchi di 14 m di diametro. Questi 4 sistemi FACE come i 4 sistemi controllo a CO<sub>2</sub> ambiente contengono ciascuno due parcelle replicate per ognuno dei 12 genotipi. La fumigazione con CO<sub>2</sub> viene effettuata dall'alba al tramonto quando i campi non sono coperti di neve. Nella prova allestita in campo nel corso della stagione 2011-2012 la fumigazione è iniziata il 15 novembre 2011, 27 giorni dopo la semina (DAS) e proseguita fino a completamento della senescenza fogliare.

La fotosintesi a luce saturante misurata nel periodo da 190 a 203 DAS a concentrazione di CO<sub>2</sub> identica alla concentrazione nella quale sono cresciute le piante, i.e. ambiente negli ottagoni di controllo e 570 ppm negli ottagoni FACE, dimostra una notevole variabilità genetica per i 12 genotipi di frumento duro (fig. 3). Alcuni genotipi come le due RIL e Claudio assimilano approssimativamente la stessa quantità di carbonio nei due ambienti indicando che il processo fotosintetico si è fortemente acclimatato verso una capacità fotosintetica più bassa durante la crescita a CO<sub>2</sub> elevata. Per altri sette genotipi l'assimilazione ha registrato incrementi fra ca. 10 e 20 per cento, cioè si è verificato un acclimatemento parziale, mentre Saragolla e Simeto assimilano a tassi vicino alla risposta potenziale attesa in base alla risposta istantanea misurata nelle piante cresciute in un'atmosfera a CO<sub>2</sub> ambiente (fig. 2). La fotosintesi a CO<sub>2</sub> elevata procede a conduttanza stomatica (medie dei genotipi fra 0.17 e 0.34 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) più bassa che a CO<sub>2</sub> ambiente (medie fra 0.31 e 0.41 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Il rapporto assimilazione fotosintetica a CO<sub>2</sub> elevata / CO<sub>2</sub> ambiente è altamente correlato con il rapporto della concentrazione CO<sub>2</sub> elevata / CO<sub>2</sub> ambiente ( $r = 0.934$ ). L'assimilazione elevata associata a conduttanza stomatica ridotta conduce a un incremento dell'efficienza nell'uso d'acqua (definita come assimilazione/traspirazione) da +30.3 a +59.8%.

Questi risultati indicano un'ampia variabilità genetica nella risposta della fotosintesi all'aumento di anidride carbonica nell'atmosfera. Inoltre sono paragonabili con la gamma dei risultati sintetizzati con la meta-analisi di Ainsworth & Long (2005) in cui è riportato un aumento medio della fotosintesi a luce saturante del 36.3 % per cinque specie graminacee C3 studiate in tre esperimenti FACE, accompagnato da una riduzione media della conduttanza stomatica del 22.2 % (6 specie) e un aumento dell'efficienza dell'uso d'acqua di 25.8% (3 specie). Per i genotipi di grano duro che hanno mostrato un acclimatemento ridotto si è evidenziata una risposta vicina alle medie trovate con questa meta-analisi. Invece quelli con acclimatemento più accentuato presentano un'assimilazione più invariata, conduttanza stomatica più ridotta e un incremento nell'efficienza d'uso d'acqua più elevato.

Questi risultati ottenuti con l'analisi della fotosintesi nell'epoca della

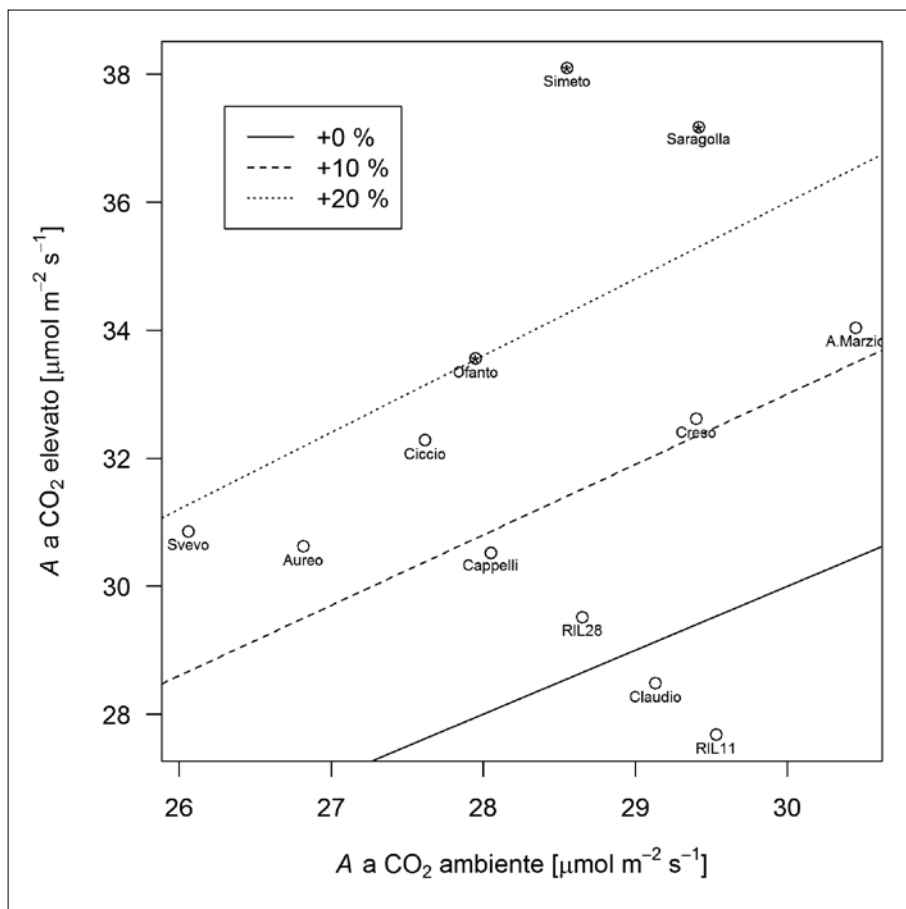


Fig. 3 Fotosintesi della foglia bandiera misurata a luce saturante in epoca di spigatura fra 190 e 203 giorni dopo la semina (26 aprile a 9 maggio)

spigatura dimostrano l'alta variabilità genetica in una finestra di tempo di sviluppo ben preciso. Fino a questa fase fenologica lo sviluppo delle piante a CO<sub>2</sub> elevata aveva permesso una chiusura della copertura vegetale più rapida, un assorbimento della luce fotosinteticamente attiva più elevata (evidenziate con misure di riflettanza spettrale e analisi di fotografie digitale, Badeck et al., 2012), un'altezza maggiore e foglie più grandi delle piante cresciute a CO<sub>2</sub> elevata. Complessivamente questi risultati dimostrano che tutti i genotipi di grano duro hanno prodotto nel trattamento a CO<sub>2</sub> elevata una quantità maggiore di biomassa nella fase vegetativa dello sviluppo. L'incremento dell'assimilazione fotosintetica è evidentemente combinato con strategie d'allocazione variabili che conducono a un acclimatamento

della fotosintesi più o meno accentuato nelle diverse fasi di sviluppo. La produzione finale di biomassa e la resa produttiva dei 12 genotipi studiati con la sperimentazione FACE saranno analizzate in ulteriori lavori. La qualità e la metabolomica della granella saranno analizzati al CRA-CER di Foggia e all'ENEA di Roma, entrambi partner nel progetto DuCO. Inoltre, presso il centro CRA-GPG sarà eseguita l'analisi trascrittomica di campioni di foglie bandiera per alcune varietà selezionate.

## CONCLUSIONI

- 1) In frumento duro l'aumento della fotosintesi in condizioni di elevata  $\text{CO}_2$  e luce saturante è risultato paragonabile a quello di altre specie coltivate.
- 2) Esiste una diversità genetica notevole nella risposta alla  $\text{CO}_2$  dei processi fisiologici (fotosintesi a luce saturante, conduttanza stomatica, efficienza nell'uso dell'acqua).
- 3) I risultati preliminari relativi alla crescita indicano un maggiore accumulo di biomassa, anch'esso con diversità genetica notevole che può essere sfruttata per la selezione di varietà del futuro.
- 4) Il dispositivo FACE come attualmente installato a Fiorenzuola rappresenta una infrastruttura ottimale e si presta a essere sfruttato per ulteriori sperimentazioni nel prossimo futuro.
- 5) La notevole superficie investita attualmente nella sperimentazione FACE a Fiorenzuola d'Arda fornisce opportunità per collaborazioni con altri gruppi di ricerca su molti aspetti della risposta dell'ecosistema di grano duro coltivato a elevata  $\text{CO}_2$  atmosferica. Attualmente sono in atto collaborazioni con altri gruppi di ricerca per lo studio della risposta degli organismi nella rizosfera e dell'origine di carbonio nei fitoliti utilizzando campioni prelevati nell'esperimento FACE.

## RINGRAZIAMENTI

Ringraziamo la "Fondazione in rete per la ricerca agroalimentare" per il finanziamento del progetto DuCO (Durum wheat adaptation to global change: effect of elevated  $\text{CO}_2$  on yield and quality traits) nell'ambito del programma AGER: agroalimentare e ricerca (<http://www.progettoager.it>). Ringraziamo i numerosi colleghi del CRA-GPG e del CNR-IBIMET che hanno contribuito con le rispettive competenze alla pianificazione, alla costruzione e al



mantenimento della sperimentazione FACE. Un particolare ringraziamento a Antonio Michele Stanca per l'incoraggiamento e i suoi preziosi suggerimenti.

#### RIASSUNTO

L'aumento continuo della concentrazione di anidride carbonica (CO<sub>2</sub>) nell'atmosfera è un aspetto principale dei cambiamenti globali antropogenici attualmente in corso. Le future rese produttive in agricoltura dipenderanno dai cambiamenti del clima ma anche dalla stimolazione della fotosintesi che rappresenta il principale effetto diretto degli aumentati livelli di della CO<sub>2</sub> atmosferica sulle piante. La risposta del frumento duro all'aumento della CO<sub>2</sub> atmosferica non è ancora ben conosciuta allo stato attuale e necessita di essere analizzata allo scopo di selezionare varietà idonee alle condizioni atmosferiche attese per la metà del 21° secolo. In questo lavoro riportiamo i risultati relativi alla risposta della fotosintesi fogliare in 12 genotipi di frumento duro studiati in un esperimento FACE (Free Air Carbon Dioxide Enrichment – arricchimento in CO<sub>2</sub> dell'aria aperta). Le risposte ottenute rientrano nella gamma dei risultati già riportati in letteratura per il frumento tenero e dimostrano una variabilità genetica elevata suggerendo una buona base per la selezione di varietà capaci di adattarsi alle condizioni atmosferiche previste per il futuro.

#### ABSTRACT

The continuously rising atmospheric CO<sub>2</sub> content is a major element of the ongoing anthropogenic global changes. Future agricultural yields depend on the changing physical climate but also on the stimulation of photosynthesis by elevated levels of atmospheric CO<sub>2</sub> the main direct effect of CO<sub>2</sub> on plants. The response of durum wheat to increasing atmospheric CO<sub>2</sub> is currently not well known and needs to be characterised for the purpose of selection of varieties well suited for the atmospheric conditions expected for Mid-21<sup>st</sup> Century. We report on the leaf photosynthetic response of 12 durum wheat genotypes studied with a FACE (Free Air Carbon Dioxide Enrichment) experiment. It was in the range of responses previously found for soft wheat and showed a high genetic variability suggesting a good basis for selection of well adapted varieties.

#### REFERENZE

- AINSWORTH E.A., LONG S.P. (2005): *What have we learned from 15 years of free-air CO<sub>2</sub> enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO<sub>2</sub>*, «New Phytologist», 165, pp. 351-371.
- BADECK F.-W., RIZZA F., MARÉ C., CATTIVELLI L., ZALDEI A., MIGLIETTA F. (2012): *Durum wheat growth under elevated CO<sub>2</sub>: first results of a FACE experiment*, in VENTURA F., PIERI L. eds., Atti del XV convegno nazionale di agrometeorologia. Nuovi scenari agro

- ambientali: fenologia, produzioni agrarie ed avversità, Palermo, 5-6-7 giugno 2012, Patron editore, Bologna, pp. 15-16.
- GRIFFIN K.L., SIMS D.A., SEEMANN J.R. (1999): *Altered night-time CO<sub>2</sub> concentration affects the growth, physiology and biochemistry of soybean*, «Plant Cell And Environment», 22, pp. 91-99.
- HENDREY G.R., MIGLIETTA F. (2006): *FACE Technology: Past, Present, and Future*, in *Managed Ecosystems and CO<sub>2</sub>: Case Studies, Processes, and Perspectives* (eds S.P.L. J. Nosberger, R.I. Norby, M. Stitt, G.R. Hendrey, H. Blum), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 15-43.
- IPCC (2000): *Special Report on Emissions Scenarios: A special report of Working Group III of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Nakićenović, N. & Swart, R., eds., Cambridge University Press, Cambridge, 599 pp.
- IPCC (2007): *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (eds.), Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 996 pp.
- KEELING C.D., WHORF T.P., WAHLEN M., VAN DER PFLICHT J. (1995): *Interannual extremes in the rate of rise of atmospheric carbon dioxide since 1980*, «Nature», 375, pp. 666-670.
- LEAKEY A.D.B., AINSWORTH E.A., BERNACCHI C.I., ROGERS A., LONG S.P., ORT D.R. (2009): *Elevated CO<sub>2</sub> effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE*, «Journal of Experimental Botany», 60, pp. 2859-2876.
- LOBELL D.B., GOURDJI S.M. (2012): *The Influence of Climate Change on Global Crop Productivity*, «Plant Physiology», 160, pp. 1686-1697.
- TAUB D.R., MILLER B., ALLEN H. (2008): *Effects of elevated CO<sub>2</sub> on the protein concentration of food crops: a meta-analysis*, «Global Change Biology», 14, pp. 565-575.



Finito di stampare in Firenze  
presso la tipografia editrice Polistampa  
nel luglio 2013