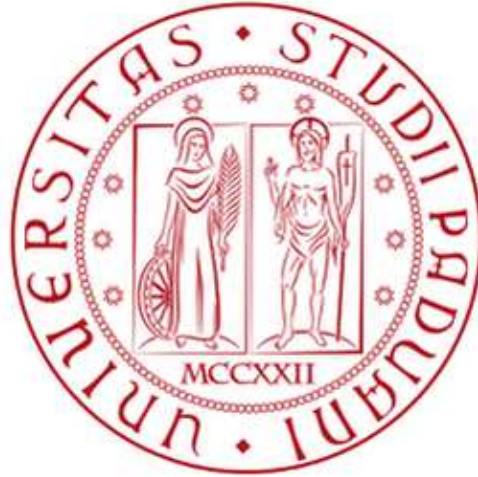


Università degli Studi di Padova  
Dipartimento di Biologia  
Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Industriali



**Coltivazione industriale di nuove specie microalgali  
in reattori biochimici ad alta efficienza:  
potenzialità e caratteristiche di *Picochlorum renovo***

Relatore: Prof.ssa Eleonora Sforza  
Dipartimento di Ingegneria Industriale

Correlatore: Dr. Danilo Marchese  
Dipartimento di Ingegneria Industriale

Controrelatore: Prof. Tomas Morosinotto  
Dipartimento di Biologia

Laureando: Marco Rigato

Anno Accademico 2023/2024





## ABSTRACT

Le microalghe sono considerate come una risorsa preziosa per il futuro sviluppo di processi produttivi sostenibili. Tuttavia, l'estesa applicazione industriale rimane, ancorché realtà, un obiettivo per il futuro. L'efficientamento della loro coltivazione ed il conseguente abbassamento dei costi ad opera delle aziende sono il *leitmotiv* della ricerca scientifica degli ultimi decenni e la scoperta di nuovi *strain* dalle interessanti caratteristiche di crescita può fare da propellente in questo percorso. In tal senso, le alghe appartenenti al genere, recentemente caratterizzato, *Picochlorum* presentano delle performance di crescita superiori rispetto ad altri *strain* di interesse industriale, rendendole ottime candidate per il proseguo della ricerca scientifica al riguardo.

In questo lavoro di tesi, la specie *Picochlorum renovo* è stata coltivata in fotobioreattori operati in continuo per valutare l'effetto di diverse variabili operative sulla sua crescita, al fine di ottimizzare l'efficienza di conversione energetica. È stato trovato che nelle condizioni ottimali questa specie è capace di raggiungere un'alta produttività areale (fino a  $50 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) e di convertire efficientemente l'energia luminosa in biomassa (19%). Inoltre, la spiccata capacità di acclimatazione all'intensità luminosa e la dinamica modulazione dell'accumulo di pigmenti fotosintetici, consente a questa specie di minimizzare il fenomeno del “*self shading*”, mantenendo alta la produttività e l'efficienza in fotobioreattori ad elevato spessore. In ultimo, dato il prevalente accumulo di proteine e carboidrati in questa specie (rispettivamente fino al 47% e al 64%), è stata valutato l'effetto della concentrazione di azoto e dell'intensità luminosa sulla produttività di tali macromolecole.

<b>CAPITOLO 1, INTRODUZIONE.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 CONTESTO AMBIENTALE E SOSTENIBILITÀ.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2 MICROALGHE: INTRODUZIONE E CARATTERISTICHE.....</b>	<b>9</b>
<b>1.3 IL PROCESSO DI FOTOSINTESI.....</b>	<b>10</b>
<i>1.3.1 Pigmenti fotosintetici.....</i>	<i>12</i>
<i>1.3.2 Radiazione luminosa e Photosynthetically Active Radiation (PAR).....</i>	<i>14</i>
<b>1.4 METODI DI COLTIVAZIONE DELLE MICROALGHE.....</b>	<b>15</b>
<i>1.4.1 Sistemi aperti.....</i>	<i>15</i>
<i>1.4.2 Sistemi chiusi.....</i>	<i>18</i>
<b>1.5 MODALITÀ OPERATIVE.....</b>	<b>20</b>
<i>1.5.1 Modalità Batch e Fed-batch.....</i>	<i>20</i>
<i>1.5.2 Modalità in Continuo.....</i>	<i>22</i>
<b>1.6 EFFETTO DELLE VARIABILI OPERATIVE SULLA COLTIVAZIONE MICROALGALE.....</b>	<b>25</b>
<i>1.6.1 Effetto del pH.....</i>	<i>26</i>
<i>1.6.2 Effetto della Temperatura.....</i>	<i>26</i>
<i>1.6.3 Effetto del mescolamento.....</i>	<i>27</i>
<b>1.7 NUOVE SPECIE PER SCOPI INDUSTRIALI.....</b>	<b>27</b>
<i>1.7.1 Picochlorum spp. - Stato dell'arte.....</i>	<i>28</i>
<i>1.7.2 Picochlorum renovo.....</i>	<i>29</i>
<i>1.7.3 Potenzialità future per l'applicazione industriale di P. renovo.....</i>	<i>31</i>
<b>1.8 SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>34</b>
<b>CAPITOLO 2, MATERIALI E METODI.....</b>	<b>35</b>
<b>2.1 SPECIE COLTIVATA E CONDIZIONI DI CRESCITA.....</b>	<b>35</b>
<b>2.2 SISTEMI DI COLTIVAZIONE UTILIZZATI.....</b>	<b>37</b>
<i>2.2.1 Esperimenti in continuo.....</i>	<i>37</i>
<i>2.2.2 Esperimenti in batch.....</i>	<i>40</i>
<i>2.2.3 Respirimetria.....</i>	<i>42</i>
<b>2.3 ESPERIMENTI IN LUCE CONTINUA ROSSO BLU.....</b>	<b>44</b>
<b>2.4 MONITORAGGIO DELLA CRESCITA CELLULARE.....</b>	<b>44</b>
<i>2.4.1 Densità Ottica.....</i>	<i>45</i>
<i>2.4.2 Peso secco.....</i>	<i>45</i>

2.4.3 <i>Conta cellulare</i> .....	46
2.5 BILANCI DI MASSA.....	47
2.5.1 <i>Produttività Volumetrica</i> .....	47
2.5.2 <i>Produttività Areale</i> .....	48
2.5.3 <i>Efficienza Fotosintetica</i> .....	48
2.6 BILANCI DI ENERGIA .....	48
2.7 CALCOLO DEL COEFFICIENTE DI ASSORBIMENTO SPECIFICO .....	50
2.8 MISURE ANALITICHE .....	51
2.8.1 <i>Analisi delle proteine</i> .....	51
2.8.2 <i>Analisi dei carboidrati</i> .....	52
2.8.3 <i>Analisi dei Pigmenti (Clorofille e Carotenoidi)</i> .....	53
2.9 METODOLOGIE STATISTICHE .....	54
2.9.1 <i>Design of Experiments (DoE)</i> .....	54
2.9.2 <i>Analisi Statistica</i> .....	58
<b>CAPITOLO 3, RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>59</b>
<b>3.1 EFFETTO DELL'INTENSITÀ LUMINOSA SULLA CINETICA DI CRESCITA DI <i>P. RENOVO</i></b> .....	59
3.2 ESPERIMENTI IN CONTINUO.....	60
3.2.1 <i>Effetto del tempo di permanenza</i> .....	60
3.2.1.1 <i>Effetto del tempo di permanenza in turbidostat</i> .....	61
3.2.1.2 <i>Effetto del tempo di permanenza in chemostat</i> .....	63
3.2.2 <i>Studio della cinetica di mantenimento in <i>Picochlorum renovo</i></i> .....	68
3.2.2.1 <i>Cinetica di mantenimento in chemostat</i> .....	68
3.2.3 <i>Effetto dell'intensità di luce</i> .....	70
3.2.4 <i>Effetto dello spessore</i> .....	73
3.2.4.1 <i>Effetto dello spessore a 150 <math>\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}</math></i> .....	73
3.2.4.2 <i>Effetto dello spessore a 300 <math>\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}</math></i> .....	75
3.2.4.3 <i>Effetto dell'intensità di luce sullo spessore a 15 cm</i> .....	76
3.2.4.4 <i>Effetto dello spessore di fotobioreattori in serie sulla concentrazione della biomassa</i> .....	78
3.2.5 <i>Effetto della luce rosso blu</i> .....	80
3.2.5.1 <i>Effetto della luce continua rosso-blu</i> .....	80

<i>3.2.6 Caratterizzazione della biomassa microalgale</i> .....	81
<b>3.2.6.1 Effetto del tempo di permanenza sulla composizione della biomassa</b> .....	81
<b>3.2.6.2 Effetto dell'intensità luminosa sulla composizione della biomassa</b> .....	85
<b>3.2.6.3 Effetto dello spessore del fotobioreattore sulla composizione della biomassa</b> .....	88
<b>3.2.6.4 Effetto dello spessore di fotobioreattori in serie sulla composizione della biomassa</b> .....	93
<b>3.3 ESPERIMENTI IN BATCH</b> .....	96
<i>3.3.1 Effetto della luce e della concentrazione di azoto sui carboidrati</i> .....	96
<i>3.3.2 Effetto della luce e della concentrazione di azoto sulla produttività di proteine</i> .....	98
<b>CAPITOLO 4, CONCLUSIONI</b> .....	101
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	103
<b>RINGRAZIAMENTI</b> .....	124

## CAPITOLO 1, INTRODUZIONE

### 1.1 Contesto ambientale e sostenibilità

Dagli inizi della rivoluzione industriale, l'uomo ha sempre incentrato la produzione di energia per i propri fabbisogni sullo sfruttamento di combustibili fossili; ciò ha portato, nel corso dei decenni, all'emissione massiccia di gas serra, quali CO<sub>2</sub> e altri, nell'atmosfera ad un ritmo esponenziale, facendo sì che la questione ambientale diventasse una delle più importanti tematiche da affrontare e portando l'attenzione internazionale di scienziati, governi e industrie sul tema [1].

L'utilizzo massivo di combustibili fossili, come anche, in generale, l'inquinamento e la distruzione degli ecosistemi attuato nell'ultimo secolo, hanno portato l'uomo alla necessità di incentrare enormi risorse per la creazione di processi produttivi (di energia e non solo), sostenibili e a basso impatto ambientale.

Le microalghe vengono studiate da tempo come possibile soluzione da integrare nei moderni processi produttivi [2]. Grazie ai loro organelli fotosintetici, questi organismi sono in grado di convertire l'energia luminosa e la CO<sub>2</sub> atmosferica in energia chimica, ossia biomassa [3].

Le microalghe sono dei microorganismi eucarioti o procarioti che stanno ricevendo importante attenzione nell'ambito della ricerca e della produzione industriale grazie alle caratteristiche che le contraddistinguono. Queste, infatti, crescono rapidamente e in breve tempo sono capaci di accumulare molecole di alto valore come lipidi e acidi grassi essenziali, proteine, carboidrati e pigmenti [4]. Di conseguenza, possono rappresentare un'importante risorsa per la produzione industriale su larga scala di alimenti, cosmetici, mangimi, prodotti terapeutici e nutraceutici, per il trattamento delle acque reflue, per la produzione di biocarburanti e, soprattutto, per la loro carbon-neutralità. Ciò permette loro di essere degli ottimi candidati per la produzione di materie dall'alto valore aggiunto, provocando un impatto minimo sull'ambiente, in termini di emissione di CO<sub>2</sub> [5, 6, 7].

Inoltre, è di estremo rilievo il fatto che questi microrganismi presentano un'efficienza di conversione dell'energia luminosa per la fotosintesi maggiore rispetto agli organismi fotosintetici superiori, come le piante [8]. Difatti, rispetto a



queste ultime, raggiungono produttività comparabili a 5-10 volte quelle ottenute dalle cosiddette piante “*crops*” [9].

Inoltre, non hanno bisogno dello stesso utilizzo di suolo di queste ultime, poiché vengono coltivate in sistemi che ottimizzano lo spazio e non necessitano di elevato apporto idrico, potendo contare anche su acque reflue o di riciclo. Ciò potrebbe avere un impatto non indifferente nel consumo di acqua potabile per la produzione industriale convenzionale.

Tuttavia, al netto di questi vantaggi, esistono ancora delle limitazioni sostanziali allo sviluppo in larga scala di processi industriali efficienti di coltivazione di microalghe, come la non ancora sufficiente efficienza di conversione della luce effettuata dalla biomassa, la possibile contaminazione da agenti biotici e abiotici esterni, la limitazione o l'elevato costo dei nutrienti necessari alla loro crescita, così come l'elevato input energetico per l'operazione del processo stesso [10].

Per fare fronte a queste difficoltà, la ricerca scientifica si sta adoperando per proporre strategie di coltivazione alternative più efficienti. Ad esempio, molto spesso, il concetto di “bioraffineria” prevede l'estrazione sequenziale di sottoprodotti secondari dalla biomassa, rendendo, in questo modo l'utilizzo delle microalghe in ambito industriale molto più competitivo e diversificato.

Sono inoltre state ideate e messe a punto diverse strategie di coltivazione non convenzionali per tali microorganismi, tra cui la coltivazione mixotrofa o eterotrofa o l'immobilizzazione mediante carrier o anche la co-coltura di diverse specie [2]. Infine, l'identificazione e la caratterizzazione di nuove specie può rappresentare un importante contributo: in questi ultimi anni, ad esempio, hanno destato molto interesse le caratteristiche di crescita delle microalghe verdi appartenenti al genere *Picochlorum* spp., le quali hanno mostrato delle produttività molto maggiori rispetto ad altre microalghe di interesse industriale, quali *Nannochloropsis* spp., *Chlorella* spp. o *Spirulina*.

## **1.2 Microalghe: introduzione e caratteristiche**

Le microalghe sono dei microorganismi unicellulari fotosintetici che, comunemente, vengono indicati con il nome di *fitoplancton* e possono essere isolati da habitat molto differenti, dalle acque marine a quelle dolci, fino anche ad habitat

terrestri e dalle condizioni estreme [11]. A seconda della specie, di cui si stima ne possano esser presenti fino ad un milione [12] le microalghe hanno morfologie, fenotipi e metabolismi differenti. Questa molteplicità le rendono importanti da studiare nei vari ambiti della produzione industriale. L'interesse è da attribuire alla capacità di accumulo di interessanti molecole come isoprenoidi, carotenoidi, antiossidanti [13], enzimi, tossine, steroli, peptidi non ribosomiali e acidi grassi polinsaturi [14]. Queste possono avere un valore commerciale di grande rilievo nel mercato, dall'alimentare (come nel caso dei cianobatteri del genere *Spirulina*) al farmaceutico e anche all'ambito ambientale con il biorisanamento.

Ci sono due domini principali a cui ci si riferisce con il termine "microalghe", quello procariotico e quello eucariotico [15]. Ad ognuno appartengono diversi *phyla*, tra cui i più importanti sono *Chlorophyta*, *Cyanobacteria*, *Charophyta*, *Ochrophyta*, *Euglenozoa* e *Mizozoa*. Ogni phylum racchiude svariate classi con, a sua volta, tutte le specie che vi appartengono. Per esempio, al *phylum* dei *Chlorophyta* appartiene la classe *Trebouxiophyceae* [12], la quale racchiude al suo interno i generi *Chlorella* e *Picochlorum*.

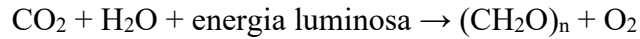
### 1.3 Il processo di fotosintesi

A partire dai primi organismi fotosintetici che si sono sviluppati sulla terra, la reazione predominante, che ha consentito di sviluppare un metabolismo energetico per la loro sopravvivenza, è rappresentata dalla fotosintesi ossigenica. Essa, secondo le stime, si è evoluta circa 2,5 miliardi di anni fa, quando sul pianeta Terra la concentrazione di CO<sub>2</sub> era estremamente elevata, costituendo uno dei più abbondanti gas atmosferici [16]. Proprio questo gas rappresenta la principale fonte di carbonio inorganico che, sfruttando l'energia luminosa proveniente dalla radiazione solare, viene convertito in carbonio organico e quindi carboidrati.

La reazione è catalizzata da uno dei più importanti enzimi che si sono evoluti sulla Terra e che, ancora oggi, è il responsabile della catalizzazione ossigenica, ovvero l'enzima RuBisCO (Ribulosio Bisfosfato Carbossilasi/Ossigenasi).

La RuBisCO, per essere attivata, necessita di un altro enzima, la RuBisCO attivasi, che in presenza di una molecola di CO<sub>2</sub> e di ioni Mg<sup>++</sup> è in grado di attivare la

RuBisCO stessa, portando, dunque, alla fissazione della CO<sub>2</sub> in molecole carboniose più complesse secondo la reazione:



Purtroppo, la RuBisCO, a causa delle diverse concentrazioni relative dei gas atmosferici nel periodo in cui si è evoluta, presenta una velocità catalitica di carbossilazione molto ridotta, data dalla competitività sul sito catalitico con l'O<sub>2</sub> molecolare, la cui concentrazione in atmosfera è maggiore della CO<sub>2</sub>.

Per far fronte a questa limitazione, nel corso dell'evoluzione, gli organismi fotosintetici hanno attuato strategie diverse per convogliare più molecole di CO<sub>2</sub> nelle prossimità della RuBisCO e favorire la reazione di carbossilazione: ne sono un esempio la costituzione dei CCM (*CO<sub>2</sub> Concentrating Mechanism*), tipico dei cianobatteri, o il Pirenoide, struttura sub-cellulare tipica degli organismi eucarioti [17]. In questo modo si è cercato di evitare il prevalere dell'attività di ossigenasi della RuBisCO, che porta alla formazione del 2-Fosfoglicolato: questa è, infatti, una molecola tossica per la cellula e il suo smaltimento, mediante il processo di fotorespirazione, comporta un dispendio energetico ulteriore [18].

Le microalghe, dunque, riescono a fissare la CO<sub>2</sub> con maggiore efficienza proprio grazie a questi complessi e si stima che siano responsabili della fissazione di più del 30% della CO<sub>2</sub> globale [11].

A giocare un ruolo attivo nel processo di fotosintesi sono degli apparati proteici che interagiscono con i pigmenti fotosintetici a formare grossi complessi chiamati Fotosistemi. Ne esistono di due tipi in natura, ovvero il Fotosistema I (PSI) e il Fotosistema II (PSII). Ubiquitari delle membrane tilacoidali [19], essi si compongono anche di un "*Light-Harvesting-Complex*" (LHC), composto da interazioni tra proteine, clorofille e altre varietà di pigmenti, che sono dimensionalmente organizzati in modo da permettere l'arrivo degli elettroni allo stato eccitato ai centri di reazione [20].

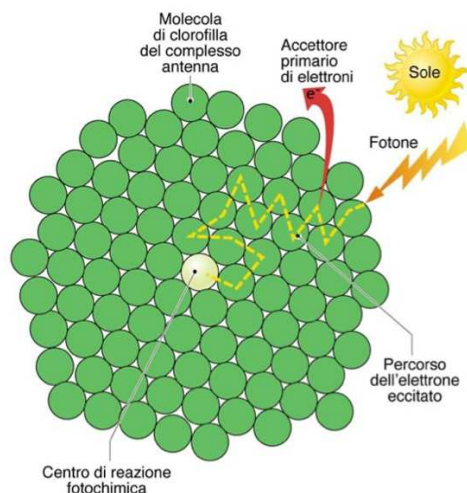


Figura 1.1: Schema di interazione del fotone luminoso con i sistemi antenna dei fotosistemi che portano l'energia luminosa fino ai centri di reazioni, posti centralmente al complesso LHC [21].

### 1.3.1 Pigmenti fotosintetici

Gli elementi chiave nel processo di fotosintesi sono i pigmenti fotosintetici, molecole in grado di assorbire specifiche lunghezze d'onda dello spettro del visibile riuscendo a ricavare da queste, energia chimica. Tra i principali pigmenti fotosintetici ritroviamo le Clorofille, presenti in piante verdi, cianobatteri e microalghe. Nonostante la *Clorofilla "a"*, sia la più importante nel processo di fotosintesi, vi sono altre clorofille affini, come la *"b"*, che sono implicate nell'ampliamento dello spettro di assorbimento di luce.

Tutte le clorofille, comunque, hanno in comune le seguenti strutture molecolari:

- Anello tetrapirrolico: costituito da 4 atomi di carbonio e 1 di azoto, al centro dell'anello è situato uno ione  $Mg^{++}$  [22].
- Catena Fitolitica: catena idrofobica che permette l'ancoraggio della clorofilla nelle membrane tilacoidali.

Le clorofille assorbono principalmente fotoni nel range di lunghezze del blu (400-470 nm, Picco di Soret) e del rosso (630 ai 700 nm, Picco Q) dello spettro visibile (Figura 1.2) [23].

Vi sono essenzialmente 5 forme di clorofilla:

- *Clorofilla a*: è presente nei centri di reazione delle antenne dei PSI e PSII, è ubiquitaria di piante, alghe, microalghe e cianobatteri. Principalmente deputata all'assorbimento della luce blu-violetto (400-450 nm) e rosso (620-750 nm).
- *Clorofilla b*: presente in piante e alghe verdi, è un pigmento ausiliare, associato al PSII [24], deputato all'assorbimento della luce blu e arancione, consentendo pertanto di ampliare la gamma di luce sfruttabile nella fotosintesi.
- *Clorofille c, d e f*: meno comuni e presenti solo in alcune alghe e cianobatteri, presentano ciascuna delle caratteristiche diverse per lo spettro di assorbimento [25].

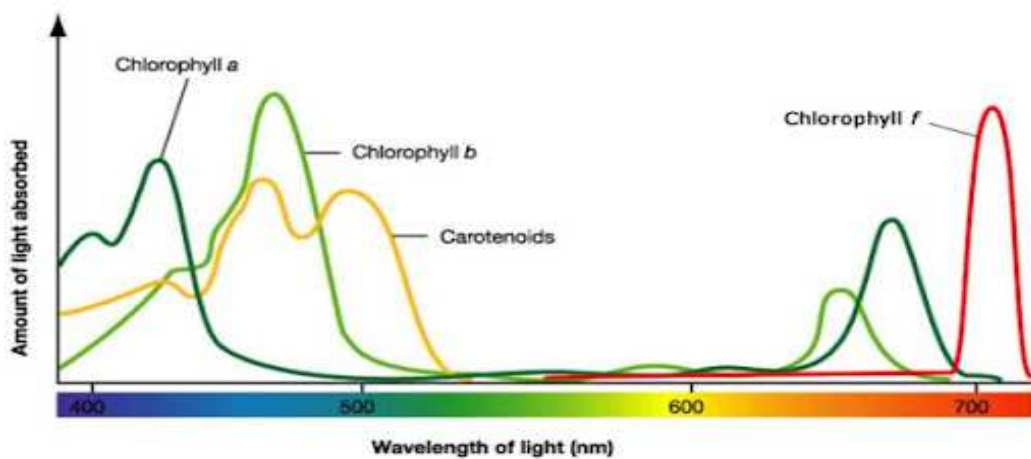


Figura 1.2: Spettro di assorbimento di clorofille e carotenoidi [26].

Il meccanismo di funzionamento della clorofilla, situata nel PSII consente di assorbire la luce, la cui energia viene convogliata nel centro di reazione, grazie alla costituzione dei *Light Harvesting Complex*, che porta all'eccitazione di un elettrone, che si ritrova in uno stato instabile. L'elettrone eccitato viene ceduto ad una molecola accettrice, che fa parte della catena di trasporto degli elettroni con l'accettore finale che è una molecola di  $\text{NADP}^+$ , che si riduce a NADPH. Questo trasporto elettronico genera un gradiente di concentrazione protonico, che porta all'attivazione dell'ATP Sintasi, un macro-complesso enzimatico deputato alla produzione finale di ATP a partire da ADP e  $\text{P}_i$ . Si produce, dunque, energia e ossigeno molecolare, dato dalla reazione di fotolisi, messa in atto per sostituire l'elettrone perso. Successivamente gli elettroni, tramite l'intervento della

plastocianina, vengono convogliati al PSI dove, l'assorbimento di ulteriore luce da parte delle clorofille, consente la reiterazione ciclica del processo appena descritto. L'ATP e il NADPH prodotti grazie all'energia luminosa in questa fase (per questo nota come "Fase Luminosa") permetteranno alla cellula di attuare il metabolismo catabolico indipendente dalla presenza di luce (Ciclo di Calvin) che prevede in primis il processo di fissazione della CO<sub>2</sub> in glucosio (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), sfruttato successivamente per il metabolismo respiratorio della cellula stessa [27].

Altra importante famiglia di pigmenti è rappresentata dai *Carotenoidi*, la classe più variegata di pigmenti (con più di 600 varietà) [28], implicati nell'assorbimento di luce nella lunghezza d'onda del blu e del verde (400-550 nm), permettendo di ampliare lo spettro di assorbimento della luce disponibile per la fotosintesi. Questi rivestono un ruolo di supporto alle clorofille, trasferendo l'energia ai centri di reazione della clorofilla *a*, permettendo di sfruttare al meglio lo spettro di luce assorbita. Sono anche implicati nei processi di protezione degli organismi fotosintetici dal danno foto ossidativo, dato da un'eccessiva esposizione alla luce solare [29]. Infatti, la sovraeccitazione delle clorofille può portare alla generazione di Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS), che possono essere dannosi per la cellula e le sue strutture interne. I carotenoidi, dunque, sono implicati nella dissipazione dell'energia in eccesso generando calore e aiutando a prevenire il danno ossidativo [30]. I carotenoidi, grazie al loro ruolo e attivazione proprio nei momenti di stress cellulari sono un ottimo indicatore di condizioni di crescita sfavorevoli.

### **1.3.2 Radiazione luminosa e Photosynthetically Active Radiation (PAR)**

La luce solare è composta da onde elettromagnetiche di differenti lunghezze d'onda. Quelle comprese tra i 380 e i 750 nm compongono una parte dello spettro elettromagnetico solare noto come spettro del visibile. Entro questo range vi sono le *Photosynthetically Active Radiation* (PAR), le quali, come suggerito dal nome, vengono sfruttate per attuare il processo fotosintetico [31].

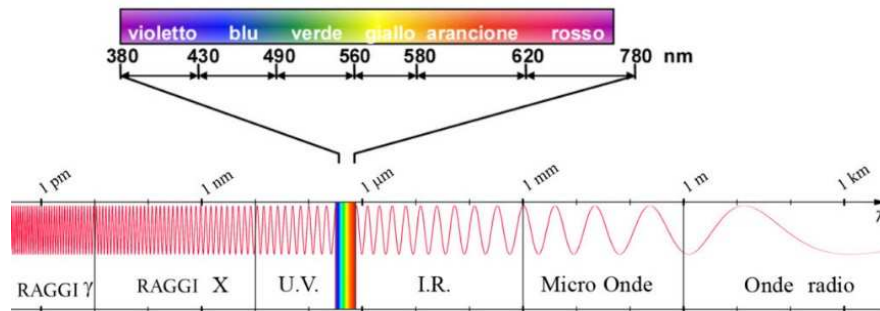


Figura 1.3: Spettro elettromagnetico della radiazione luminosa con evidenza sul range della luce visibile [32].

Infatti, all'interno del PAR si trovano proprio quelle lunghezze d'onda che causano l'eccitazione dei carotenoidi e delle molecole di clorofilla nei centri di reazione, dando inizio al processo fotosintetico vero e proprio [33].

## 1.4 Metodi di coltivazione delle microalghe

L'interesse per lo studio delle microalghe è da cercare in fattori quali:

- la rapidità di crescita e di conseguenza di produzione di biomassa.
- la produzione di molecole bioattive per diversi settori industriali.

Le microalghe possono essere coltivate in sistemi aperti o chiusi. Entrambi presentano dei vantaggi e delle criticità, che bisogna considerare per lo studio di un processo industriale, a seconda del tipo di specie con cui si lavora e del prodotto finale che si vuole ottenere. Ogni sistema presenta anche dei costi e delle modalità operative specifiche

### 1.4.1 Sistemi aperti

Tra i sistemi di coltivazione aperti, i più comunemente utilizzati sono gli “*open pond*”, cioè bacini dalla bassa profondità, che si attesta intorno ai 20-30 cm. Per definizione, i sistemi aperti come i *pond* sfruttano l'energia luminosa per la crescita fotoautotrofica e sono pertanto esposti alle condizioni ambientali di irradianza luminosa e temperatura. I sistemi aperti, dunque, trovano un largo impiego in quelle aree geografiche che presentano un clima mite nel corso dell'anno e molte ore di

luce, essendo queste due variabili molto influenti sulla produttività del processo. Generalmente vengono utilizzati per trattare acque reflue, poiché i costi di installazione e operazione sono più bassi e presentano una richiesta di manutenzione limitata relativamente ad altri sistemi esistenti.

I principali sistemi aperti adoperati sono gli *shallow ponds*, *raceways pond*, *circular ponds* e *unstirred pond* [34].

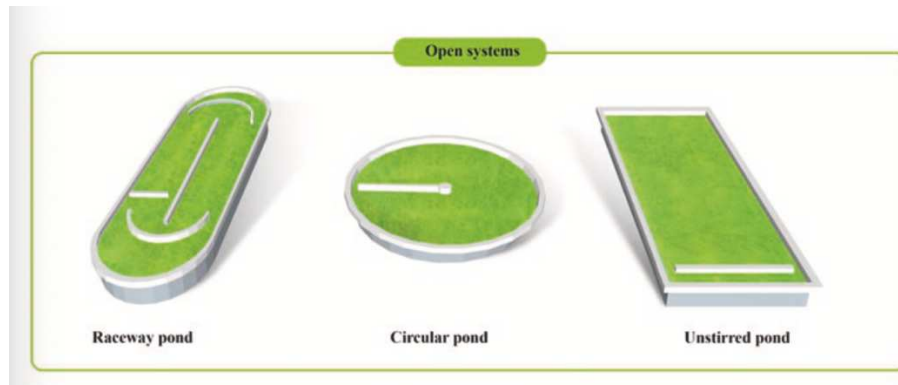


Figura 1.4: Open ponds per la coltivazione microalgale; da sinistra a destra Raceway pond, Circular pond e Unstirred pond [35].

Spesso i tipi di mescolamento per questi bacini utilizzano il flusso gravitazionale, ma possono anche presentare un movimento rotatorio di eliche (note come “*paddle wheels*”) che permettono il mescolamento della coltura.

La diffusione industriale di questi sistemi è principalmente dovuta ai seguenti vantaggi offerti:

- Economicità di processo: essenzialmente il sistema presenta un design molto semplice, che ricopre un'ampia area e che non ha bisogno di un controllo capillare dei parametri che influenzano la crescita microalgale.
- Il dispendio in termini di energia è dato solo dal lavoro di mescolamento del sistema e dal medium che deve essere fornito, a seconda del flusso in entrata che si decide di utilizzare per il ricambio del mezzo. Si può pensare anche di utilizzare acque salmastre o reflue che, di conseguenza, hanno un impatto sul costo di processo molto inferiore rispetto ad acque depurate [36].
- Bassa manutenzione richiesta: non necessitano di scrupolosa manutenzione e, pertanto, sono molto economici per lo scale-up su vasta scala, per ottenere elevate quantità di biomassa.



I sistemi aperti, tuttavia, presentano anche degli svantaggi, che derivano dallo scarso controllo delle variabili operative in gioco e che devono essere tenuti in considerazione. Per esempio, tra gli elementi di rilievo troviamo il fatto che vi è la richiesta di un'ampia superficie per la loro costruzione, che le cellule non sono in grado di sfruttare al massimo la sorgente luminosa solare, poiché esposte continuamente alle variazioni di luce ambientale, che ne rendono incostante l'intensità a seconda del tempo meteorologico e ora della giornata, portando a una diminuzione dell'attività fotosintetica [37]. La temperatura è una variabile che tende ad oscillare visibilmente sia giornalmente che stagionalmente, influenzando in modo importante sul tasso di divisione cellulare; [34]. Vi possono inoltre essere fenomeni di evaporazione della coltura quando si è in stagioni molto calde, come quelle estive, con la perdita di CO<sub>2</sub> nell'atmosfera. Inoltre, i *pond* sono maggiormente suscettibili alle contaminazioni da batteri o altre specie microalgali. Per questo i *pond* vengono maggiormente utilizzati per quegli *strain* microalgali che tollerano maggiormente le oscillazioni delle condizioni esterne o che proliferano preferibilmente in ambienti proibitivi per altre specie, come pH acidi o basici e alte temperature [34].

Sistema di coltivazione	Vantaggi	Svantaggi
Aperti	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Processo economico</li> <li>-Buon scambio gassoso con l'atmosfera</li> <li>-Facile da gestire e da applicare lo scale up</li> <li>-Raffreddamento garantito dall'evaporazione</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Alto rischio di contaminazioni</li> <li>-Volumi di medium dispersi per evaporazione</li> <li>-Limitazione da luce se lo spessore del sistema è elevato</li> </ul>

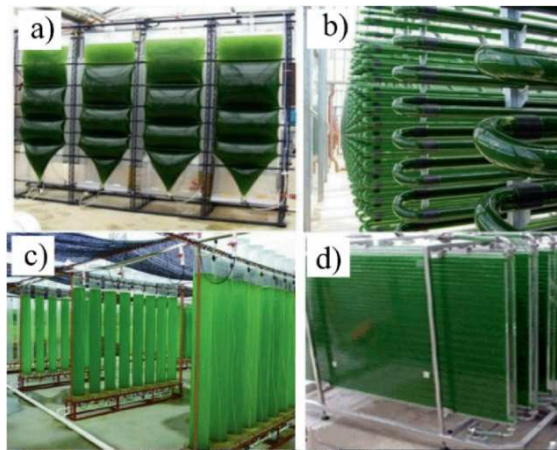
Tabella 1.1: Vantaggi e svantaggi della coltivazione con sistemi aperti [38].

## 1.4.2 Sistemi chiusi

I sistemi di coltivazione chiusi includono tutti quei sistemi confinati e controllati, noti come fotobioreattori (PBR), con design atti a massimizzare la produttività della crescita cellulare.

I sistemi chiusi consentono, rispetto ad un sistema aperto, una massimizzazione della produttività del processo di coltivazione in virtù di un controllo minuzioso di tutte le variabili operative come la temperatura, il pH e l'intensità e la qualità della luce [39].

Esistono diversi tipi di fotobioreattori a seconda della configurazione e del design, tra cui i più sfruttati sono i reattori tubulari orizzontali o verticali, i flat-panel, i bioreattori a sacchi di plastica sospesi o i reattori a serbatoio per fermentazione (Figura 1.5) [38].



*Figura 1.5: Esempi di sistemi di coltivazione chiusi. bioreattori a sacchi di plastica sospesi (a); reattori tubulari (b); reattori a serbatoio per fermentazione (c); flat panel bioreactor (d) [38].*

La scelta di un sistema chiuso porta con sé diversi vantaggi tra cui:

- Monitoraggio e controllo delle variabili: la presenza di sensori per temperatura, pH, ossigeno, CO<sub>2</sub>, permette di monitorare e far azionare i sistemi di insufflazione di aria, di flusso per i nutrienti e di luce, così da permettere di avere le condizioni ottimali da utilizzare per la crescita della specie d'interesse. In questo caso, un sistema chiuso garantisce condizioni di coltura ottimali per la crescita di una determinata specie.

- Produttività elevate: i sistemi chiusi permettono di ottenere produttività molto maggiori rispetto ai sistemi aperti, dato che si è in grado di impostare i parametri di crescita migliori per la specie cellulare d'interesse.
- Minori contaminazioni: confinando il sistema, e limitando il contatto con l'ambiente esterno, si può ovviare al problema delle contaminazioni da altre specie algali o batteriche, in modo da ottenere biomassa di maggior qualità.

Nonostante gli enormi vantaggi che un sistema di coltivazione chiuso può presentare, comunque vi sono delle criticità che portano a fare delle considerazioni sul tipo di processo industriale che bisogna mettere in atto per la coltivazione della specie d'interesse.

Tra gli svantaggi che si attestano nei sistemi chiusi vi è:

- Costi per il design e manutenzione del PBR: i costi di costruzione di un fotobioreattore possono essere elevati, come anche l'energia che esso richiede per il suo funzionamento; la strumentazione ha bisogno di continua manutenzione e la sua operazione richiede personale tecnico preparato e con esperienza.
- Difficoltà di scale up: a fronte di una maggiore complessità strutturale e ingegneristica, bisogna tenere conto della scarsa scalabilità di tali sistemi: aldilà dell'aumento dei costi di gestione, la costruzione di reattori per la larga scala è più complessa.

I fotobioreattori chiusi, oltre che un impiego sulla larga scala, hanno un'interessante applicazione anche a livello di laboratorio, poiché possono essere utilizzati per scopi di ricerca, cioè per studiare e ottimizzare le condizioni di crescita di specie cellulari d'interesse per la produzione industriale.

Sistema di coltivazione	Vantaggi	Svantaggi
Chiuso	-Maggior controllo dei parametri di coltivazione -Alta produttività -Riduzione del rischio di contaminazione	-Alti costi di design e di gestione -Necessario un sistema di raffreddamento -Difficoltà di scale up

	-Minor perdita di CO <sub>2</sub> nel mezzo	
	-Condizioni di coltivazione riproducibili	

Tabella 1.2: Vantaggi e svantaggi dei sistemi di coltivazione chiusi [38].

## 1.5 Modalità operative

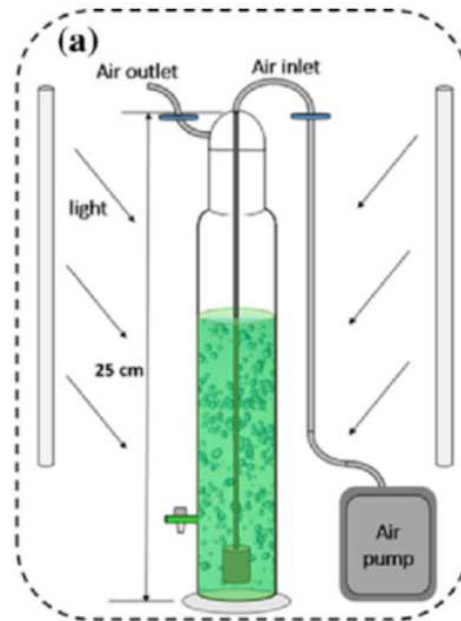
Indipendentemente dalla tipologia di reattore, ci sono diverse modalità per operare un processo di coltivazione industriale. Ognuna presenta caratteristiche che influenzano il controllo del processo, la crescita cellulare e la produttività. Queste modalità si suddividono in:

- Batch
- Fed-batch
- Continuo

### 1.5.1 Modalità Batch e Fed-batch

La modalità di coltivazione in batch è quella maggiormente sfruttata sia a livello laboratoriale che industriale. Questo poiché prevede l'inoculo delle cellule in un volume di medium definito. La crescita cellulare (così come altre misure analitiche) viene monitorata nel tempo. Poiché non vi è supplemento di nutrienti nel corso della crescita cellulare, possono essere distinte diverse fasi caratteristiche dell'operazione di un reattore in batch: al momento dell'inoculo, la concentrazione cellulare non incrementa, poiché le cellule vanno incontro ad una fase di acclimatazione (*fase lag*) alle nuove condizioni; successivamente si assiste ad una fase esponenziale, in cui le cellule iniziano a dividersi e proliferare attivamente. Quando i nutrienti sono consumati, o si sono accumulati prodotti di scarto, vi è l'attenuazione del trend di crescita [40], che culmina con un plateau della concentrazione cellulare stabile nel tempo (fase stazionaria) per poi arrivare alla fase di morte, in cui la concentrazione di biomassa diminuisce progressivamente, a causa dell'accumulo di tossine o scarti

metabolici inibitori così come dal completo esaurimento di macro e micronutrienti essenziali (Figura 1.6).



*Figura 1.6: Caratteristico sistema di coltivazione operato in modalità batch con insufflazione di gas e illuminazione artificiale [41].*

La modalità di coltivazione in Fed-batch è una variante della modalità in batch: essa consiste nell'aggiunta progressiva di nutrienti ad una coltura. Dunque, al contrario della modalità in batch, il volume del reattore viene incrementato nel tempo (Figura 1.7). In questo modo si è in grado di prolungare l'attiva crescita cellulare e quindi aumentare la produttività del sistema. La modalità Fed-batch è anche utile in tutti quei casi in cui è necessario un accumulo più graduale nel tempo di metaboliti di interesse che, però, potrebbero esercitare diretta inibizione sulla crescita o avere un'influenza sulle variabili operative più importanti.

Nonostante il sistema Fed-batch presenti dei vantaggi, le criticità sono da riscontrarsi in un sistema che può essere maggiormente soggetto a contaminazioni. Inoltre, il monitoraggio delle variabili operative principali, quali pH, concentrazione di ossigeno e di nutrienti risulta più impegnativo.

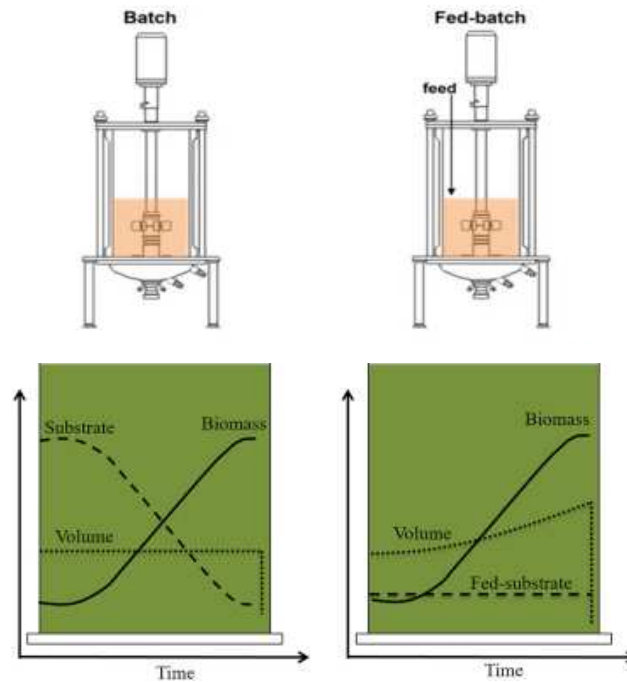


Figura 1.7: Concentrazione di biomassa (curva continua), di nutrienti (curva tratteggiata) e volume del reattore (curva punteggiata) in funzione del tempo in reattori operati in modalità batch (sinistra) e fed-batch (destra) [42, 43].

### 1.5.2 Modalità in Continuo

Nella modalità in continuo il medium viene fornito costantemente all'interno del reattore e contestualmente biomassa e medium esausto escono dal sistema. Il sistema presenta, pertanto, un flusso in entrata ( $Q_e$ ) e un flusso in uscita ( $Q_u$ ) che si eguagliano. Ciò consente il ricambio, nel tempo, del mezzo esausto, della biomassa ed eventuali prodotti di interessi ( $C_{x,u}$ ) con terreno fresco.

Il continuo è quel sistema in cui il volume del reattore ( $V_r$ ) è costante poiché, a parità di densità, si ha che il flusso in ingresso eguaglia il flusso in uscita ( $Q_e = Q_u$ ). Un sistema in continuo, se non vi sono perturbazioni, dopo un certo intervallo di tempo, denominato come fase transitoria, raggiunge quello che viene comunemente definito stato stazionario. Questo avviene poiché la biomassa in uscita dal reattore viene rimpiazzata grazie alla divisione cellulare in atto [44]. Affinché questo avvenga in modo efficiente è necessario scegliere attentamente un tempo di

residenza ( $\tau$ ) ottimale: questo è definito come il rapporto tra il volume del reattore e la portata in ingresso o uscita:

$$\tau \text{ (giorni)} = \frac{V_R}{Q_e} \quad (\text{Eq 1.1})$$

Esso ha un impatto sulla produttività della coltura [45], poiché, con tempi di residenza troppo alti, il processo perde in produttività, poiché ad un aumento della permanenza delle cellule dentro il reattore non corrisponde un aumento del tasso di divisione. Diametralmente, se si impostano tempi di residenza troppo bassi, la velocità di uscita della biomassa dal reattore potrebbe superare quella di divisione cellulare, portando ad un fenomeno noto come *wash-out*.

La modalità in continuo offre migliori produttività e diversi vantaggi rispetto al sistema batch e fed-batch [46]. Ad esempio, la stabilizzazione delle condizioni di coltura a stato stazionario permette di incrementare la produttività del processo, così come permette di standardizzare e riprodurre la qualità della biomassa e/o del prodotto di interesse. Inoltre, anche in ambito di ricerca, il raggiungimento dello stato stazionario consente un più facile studio dell'effetto delle variabili operative sulla crescita microalgale.

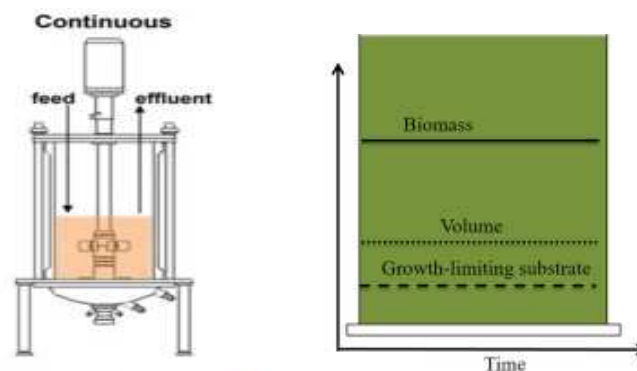


Figura 1.8: Concentrazione di biomassa (curva continua), di nutrienti (curva tratteggiata) e volume del reattore (curva punteggiata) in funzione del tempo in un reattore operato in continuo e a stato stazionario [42, 43].

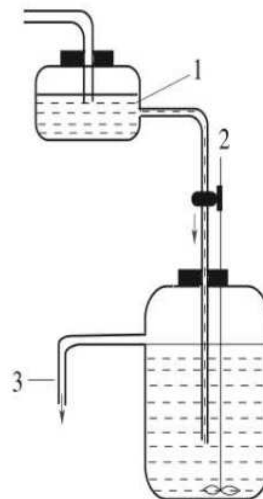
Le criticità di questo sistema consistono, come per il fed-batch, nel necessario continuo monitoraggio dei parametri della coltura, nel rischio di contaminazione e

nel maggior consumo energetico e di manodopera richiesto per il suo funzionamento.

In base al tipo di controllo che possiamo esercitare sul sistema nel raggiungimento dello stato stazionario, si distinguono due sistemi di coltivazione in continuo: il Chemostat e il Turbidostat.

Il chemostat è un tipo di reattore usato sia per studi di laboratorio, per descrivere le performance di crescita di una specie, sia per la realizzazione di impianti industriali. Viene impiegato per produrre, nelle condizioni più favorevoli possibili, biomassa e prodotti d'interesse, che possono essere utilizzati per mettere appunto impianti industriali, come dal semplice *open pond*, alla messa a punto di reattori chiusi. Il chemostat può essere utilizzato sia per applicazioni come la produzione di molecole d'interesse che per applicazioni ambientali come il trattamento delle acque reflue [47, 48, 49].

In un reattore chemostat il tempo di permanenza viene impostato agendo sulle portate in ingresso e in uscita. Per tale ragione è necessario conoscere preventivamente la velocità di crescita della specie d'interesse in modo da evitare il *wash-out* della coltura [50].

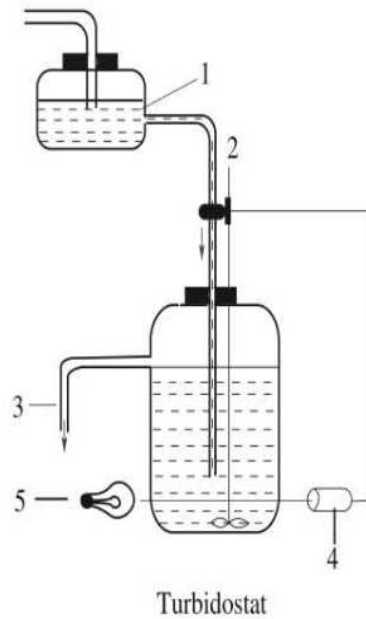


Chemostat

Figura 1.9: Schema di un reattore chemostat: medium fresco (1); valvola di regolazione del flusso in entrata (2); uscita del tipo "troppo-pieno" (3) [51].



Un reattore turbidostat consente, invece, di impostare il tempo di permanenza sulla base della densità cellulare desiderata. Infatti, viene usato un turbidimetro che, una volta settato ad una data densità cellulare di interesse, agisce sul sistema di pompe in ingresso e in uscita per diluirla e ristabilire il valore del set point, mantenendo così la coltura in stato stazionario [52, 53].



*Figura 1.10: Schema rappresentativo di un reattore turbidostat: Medium fresco (1); Valvola di regolazione della portata in entrata (2); Uscita del tipo “troppo-pieno” (3); Sensore di torbidità (4); Sorgente luminosa (5) [51].*

Tra gli svantaggi dell’operare in turbidostat, vi possono essere, come per il chemostat, fenomeni in cui la specie selezionata cresce in forma aggregata [54, 55]. Al contrario, tra i vantaggi più importanti che caratterizzano questo sistema vi è la capacità di minimizzare il *wash-out* [56].

### **1.6 Effetto delle variabili operative sulla coltivazione microalgale**

I reattori biologici servono per permettere una migliore caratterizzazione, sulla scala di laboratorio, di quelle che sono le performance di crescita di una specifica specie, prima di avviare un impianto di produzione industriale.

Un fotobioreattore è progettato in modo da consentire agli organismi fotosintetici al loro interno di sfruttare a pieno la sorgente luminosa e operare un'efficiente attività fotosintetica portando, così, a una produttività di biomassa ottimale [57]. Per consentire una buona illuminazione il fotobioreattore, in generale, viene progettato con materiali trasparenti. Inoltre, le superfici del fotobioreattore devono essere progettate col fine di minimizzare l'aggregazione della biomassa su di esse. Di solito i materiali più utilizzati per la costruzione di un PBR di piccola scala sono vetro, plexiglass, PVC. Devono, inoltre, essere dotati di strumentazione di monitoraggio che garantisca condizioni ottimali per la crescita cellulare, come, ad esempio, sensori di temperatura, di ossigeno, di CO<sub>2</sub> e pH. Oltre a strumenti di monitoraggio, i fotobioreattori necessitano di strumenti di controllo delle variabili sopracitate come valvole per l'insufflazione di aria o CO<sub>2</sub>, per tamponare il pH, e sistemi di raffreddamento o riscaldamento per mantenere stabile la temperatura [59].

### **1.6.1 Effetto del pH**

La maggior parte delle colture cresce a valori di pH attorno a 7-9. Ovviamente, come provato dagli organismi estremofili, vi sono anche specie che possono crescere a range di pH molto inferiori o superiori, come per *Spirulina platensis* [58]. È essenziale che il pH sia finemente regolato per evitare che le cellule vengano influenzate negativamente da una sua acidificazione o basificazione eccessiva. Nelle colture su scala industriale il pH è determinato dalla quantità di CO<sub>2</sub> disciolta nel mezzo [59] ed è influenzato dal *mass transfer* della CO<sub>2</sub> dalla forma gassosa a quella liquida, oltre che dal consumo stesso da parte delle cellule. Per questo, di norma, per mantenere stabile il range operativo di pH si fa uso di specifici tamponi nel medium (come il sistema tampone del bicarbonato) o direttamente dell'insufflazione di CO<sub>2</sub> pura nel mezzo, che consente di apportare un bilanciamento desiderato.

### **1.6.2 Effetto della Temperatura**

È cruciale che in una coltura venga mantenuta la temperatura a cui l'attività metabolica delle microalghe sia ottimale [60]. Le microalghe verdi presentano un

range di temperature a cui poter crescere molto variabile e che viene soprattutto influenzato dalla specie presa in esame. Di norma le microalghe possono tollerare un ampio range di temperature (10 - 40°C). Tuttavia, al fine di massimizzarne la proliferazione è necessario lavorare a temperature di ottimo che, in base allo *strain* in esame, vanno dai 20°C ai 30°C [61, 62] .

Infine, bisogna anche considerare la temperatura come la principale variabile in grado di influenzare la solubilità dei nutrienti e gas disciolti, così come la stabilità di micro- e macronutrienti. È stato dimostrato, inoltre, che all'interno di sistemi chiusi, come i fotobioreattori, senza un adeguato controllo della temperatura, si potrebbe arrivare a raggiungere temperature della coltura superiori o inferiori di 10-30 gradi rispetto a quella ambientale [63].

### **1.6.3 Effetto del mescolamento**

Normalmente la densità delle colture microalgali si attesta intorno a  $10^3$  cellule per mL, con una distanza media tra le cellule di 1000  $\mu\text{m}$ . Nei fotobioreattori su scala industriale, tale densità può arrivare a concentrazioni qualche ordine di grandezza superiore. A tali densità una illuminazione omogenea dell'intero mezzo di coltura non può essere assicurata [64]. Inoltre, ciò incrementa il consumo della  $\text{CO}_2$  e l'accumulo di sostanze di scarto. Per questo, quando si opera in fotobioreattori ad alta efficienza, è fondamentale che vi sia un adeguato mescolamento del mezzo, che consenta di distribuire cellule e nutrienti omogeneamente per massimizzarne la biodisponibilità. Inoltre, un buon mescolamento consente l'illuminazione omogenea della coltura, minimizzando i fenomeni di ombreggiamento (*dark zones*), assicura un efficiente trasferimento di calore e migliora il *mass transfer* delle specie gassose [57].

### **1.7 Nuove specie per scopi industriali**

Nonostante le microalghe siano delle concrete alternative per la produzione di bioenergia e di prodotti dall'alto valore aggiunto, rimangono comunque diverse limitazioni a complicare il passaggio dalla piccola scala del laboratorio a quella industriale.

Il costante miglioramento, grazie alla ricerca scientifica, delle performance di crescita e dell'efficienza di produzione di *strain* già caratterizzati contribuisce al superamento di tali limitazioni.

Tuttavia, non bisogna trascurare il contributo che può essere apportato dall'isolamento e dalla caratterizzazione di nuove specie di interesse. Confrontando il numero di specie di microalghe e cianobatteri classificati a quelle attualmente coltivate in larga scala, c'è ampio spazio per l'ampliamento del catalogo di *strain* dal potenziale successo commerciale. A decretare il successo di una *novel species* sono spesso particolari caratteristiche di crescita (alte velocità di divisione cellulare, tolleranza a variazioni ambientali o estremofilità) che rendono la loro coltivazione vantaggiosa ed efficiente. Talvolta a destare interesse sarebbe, invece, la capacità di produrre e accumulare buone quantità di molecole d'interesse [65, 66].

### **1.7.1 *Picochlorum* spp. - Stato dell'arte**

A giudicare dal volume di pubblicazioni a riguardo degli ultimi anni, a destare un significativo interesse, sono state le microalghe appartenenti al genere *Picochlorum*.

Infatti, i rappresentanti di questo genere microalgale sono degli organismi alofili (buona tolleranza ad ambienti salini) e presentano capacità di sopravvivenza in un range di temperatura abbastanza ampio (0 - 40°C) con optimum di crescita che si stabilisce intorno a 30°C e un'elevata resistenza ad alte intensità luminose. Essi risultano interessanti anche sotto il profilo molecolare: ad esempio, alcuni ceppi tra quelli studiati, sono in grado di accumulare tra il 20% e il 58% di lipidi in biomassa [67]. Inoltre, poiché questa specie possiede un genoma relativamente semplice e compatto (13-14 Mb) [68], il tasso di divisione cellulare risulta sensibilmente maggiore rispetto ad altre specie di interesse industriale [69]. Per tale motivo, e per la grande resilienza e versatilità sopracitate, questi microorganismi possono raggiungere produttività comprese tra 30 e 40 g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> [57, 70, 71] in sistemi aperti, valori ben al di sopra della media registrata (25 g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>) [72].

Non è pertanto strano che le microalghe del genere *Picochlorum* siano state prese in considerazione per una potenziale applicazione industriale, essendo la loro

coltivazione molto produttiva ed efficiente anche in sistemi aperti come gli *open ponds* e anche in condizioni proibitive per altre specie di interesse industriale.

Aldilà della valutazione delle performance di crescita in diverse condizioni, alcune ricerche si sono concentrate, per la sua elevata componente di carboidrati, che può rappresentare il 50% della biomassa totale [73], nell'applicazione di questa microalga nella produzione di fonti rinnovabili di carburante o anche per una possibile applicazione nel campo nutraceutico [67] o per la produzione di mangimi nel campo dell'acquacoltura [74].

### 1.7.2 *Picochlorum renovo*

In questi anni sono stati pubblicati diversi lavori di ricerca volti alla caratterizzazione delle performance di crescita delle varie specie del genere *Picochlorum* come, per esempio, *P. oklahomense*, *P. atomus* o *P. celeri*. Questo, come anticipato, poiché sono capaci di raggiungere produttività areali maggiori [75], se confrontate a quelle ottenute con altre microalghe di interesse industriale, come *Nannochloropsis* spp., *Chlorella* spp., *Dunaliella* spp. e *Spirulina* spp., che risultano essere tra i candidati di spicco per la produzione efficiente in sistemi di coltivazione a basso costo [76, 77, 78, 79].

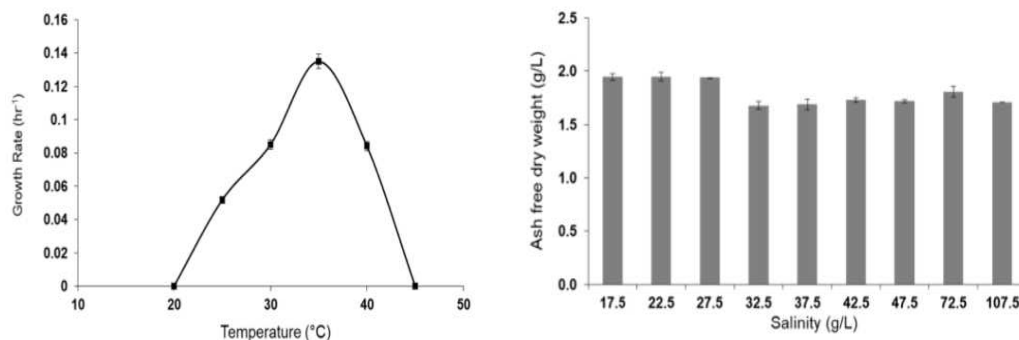


Figura 1.11: A Sx: Range di temperatura entro cui *P. renovo* cresce, con il picco di crescita a 33°C [79]. A Dx: Concentrazione di biomassa di *P. renovo* registrata in funzione della salinità del mezzo di coltura [80].

Di recente, è stata anche isolata una nuova specie appartenente allo stesso genere, classificata sotto il nome di *Picochlorum renovo*, che ha destato particolare

interesse poiché ha raggiunto una produttività media annuale di  $34 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  in modalità batch [80].

Conformemente agli altri rappresentanti del genere *Picochlorum*, alla base di queste performance possiamo ricondurre l'alta velocità di crescita di questa specie (*doubling time*  $\sim 2 \text{ h}$ ) [73]. Questo poiché il genoma di *P. renovo* è estremamente ridotto e si va a suddividere in genoma nucleare, mitocondriale e plastidiale. Il genoma nucleare presenta 14,4 Mbps con un 46,2% in GC content, con 8902 sequenze codificanti proteine. In media sono presenti, nel genoma nucleare, 2,2 esoni e 1,2 introne per gene.

Il genoma plastidiale invece è più ridotto e contiene 74kb mancanti di regioni ripetute e invertite.

Invece, il genoma mitocondriale si compone di 36kb con una densità di sequenze codificanti tra le più alte riportate ad oggi per la classe delle *Trebouxiophyceae* [80] in cui è compreso *P. renovo*.

Questa specie, come si è visto per la maggior parte dei ceppi di *Picochlorum*, inoltre, si è dimostrata tollerante agli stress salini [81], caratteristica importante per tutti quei sistemi in cui l'evaporazione del medium causa oscillazione di tale valore. Infatti, nonostante il picco di crescita sia pressoché riconducibile alla salinità marina (2,7-3,0%), risulta tollerante anche a salinità 5 volte maggiori (Figura 1.11), consentendone una coltivazione anche con l'uso di acque salmastre.

Inoltre, potendo crescere agevolmente a temperature di  $40^\circ\text{C}$  (Figura 1.11), questa specie risulta interessante per la coltivazione in sistemi aperti, dove le variazioni di temperatura in determinati periodi dell'anno o della giornata possono creare enorme stress al microorganismo.

Anche se gli studi di caratterizzazione molecolare specifici per questa specie siano, ad oggi, insufficienti, essa presenta un profilo potenziale di grande interesse per l'applicazione industriale. La sua biomassa, in condizioni ottimali, è composta per il 20% di proteine, 60% di carboidrati e circa 10% di lipidi, caratteristiche che la distingue da altri ceppi dello stesso genere [80].

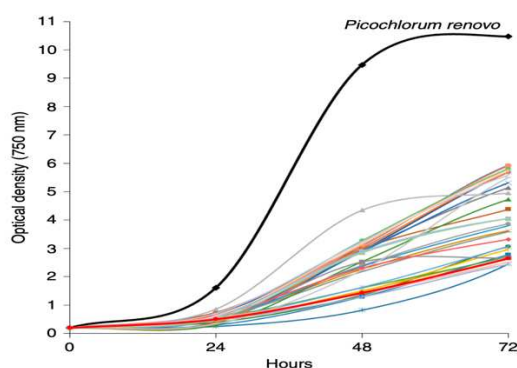


Figura 1.12: confronto delle performance di crescita di *P. renovo* (nero) in modalità batch rispetto ad altre microalghe marine di interesse industriale [79].

### 1.7.3 Potenzialità future per l'applicazione industriale di *P. renovo*

Le microalghe sono una risorsa spendibile soprattutto nel campo della produzione industriale di prodotti dall'alto valore aggiunto. Purtroppo, la valorizzazione di una sola frazione della biomassa non è economicamente vantaggiosa. Per questo si cerca di ottimizzare un processo di produzione biologico cercando di sfruttare il più possibile tutte le componenti della biomassa [82]. In questo modo si può diversificare la produzione e i mercati nei quali trarre guadagno.

Le microalghe hanno la capacità di poter cambiare la composizione della loro biomassa se poste in condizioni di stress. Alcune specie, infatti, tendono in tali condizioni a favorire e sfruttare maggiormente alcuni metabolismi specifici, che, alla fine, portano all'accumulo di carboidrati, lipidi o metaboliti secondari, quali, per esempio, vitamine e pigmenti, che possono avere un'applicazione nella produzione di composti dall'alto valore aggiunto nell'ambito farmaceutico, cosmetico e alimentare.

Per esempio, i carotenoidi sono uno dei prodotti molto richiesti per l'utilizzo di coloranti naturali nell'industria alimentare [83].

Per scegliere al meglio quale potrebbe essere un'idea per la generazione di un guadagno dalla coltivazione di *P. renovo* è importante adottare un approccio che miri a capire gli step da seguire per progettare nel migliore dei modi l'applicabilità industriale per questa specie.

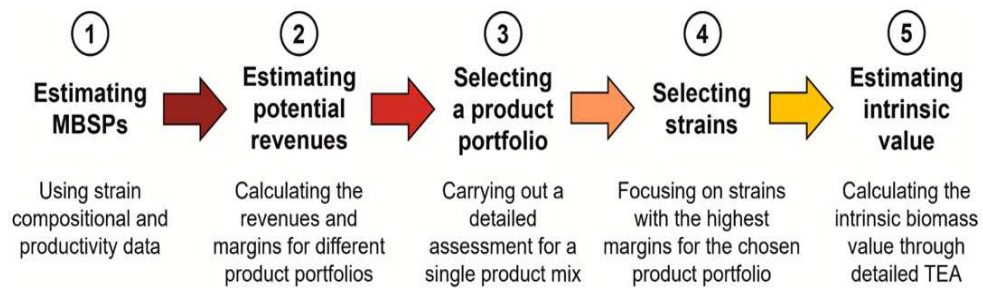


Figura 1.13: Schema di valutazione per la valorizzazione della produttività di una specie cellulare a livello industriale [84].

Come è possibile osservare in Figura 1.13 è necessario che vengano prese in considerazione i seguenti punti:

- Stima del valore che può essere ottenuto dallo sfruttamento della biomassa.
- Stima del potenziale di mercato in termini economici.
- Selezionare una strategia di produzione che vada a valorizzare al meglio il profilo di biomassa della specie.
- Fare una simulazione di processo che includa valorizzazione della biomassa, costi di produzione e potenzialità di mercato.

Una microalga che produce molti carboidrati, e una minore frazione di lipidi e proteine può avere applicazione per un processo che porti ad ottenere come prodotti di primario interesse la produzione di biocarburanti, come il bioetanolo. Con le frazioni minoritarie, quali lipidi, per esempio, si può pensare di produrre composti poliuretanic; la frazione proteica può essere, invece, utilizzata nell'ambito alimentare per la produzione di alimenti altamente proteici.

Dalle informazioni presenti finora, e applicando un approccio prettamente computazionale utilizzando simulazioni di processo tramite Aspen Plus, si può pensare che il profilo di caratterizzazione della biomassa di *P. renovo* possa essere interessante per una possibile applicazione industriale di questo tipo generando un profitto di vendita di 805\$ per tonnellata (\$/ton) di idrocarburo prodotto dai carboidrati e 544 \$/ton e 4080 \$/ton per la rispettiva frazione proteica e lipidica [84].

Questa strategia mira a valorizzare al meglio le componenti tipiche di una microalga che produce molti carboidrati, come nel caso di *P. renovo*, incentrando il focus sulla produzione di combustibili alternativi.



Un'altra strategia che può essere potenzialmente interessante e risulta maggiormente realizzabile da un punto di vista industriale consiste nello sfruttamento della biomassa come biofertilizzante agricolo.

I biofertilizzanti prodotti da microalghe hanno capacità di sostenere la crescita delle piante, mediante il rilascio di nutrienti nel suolo e il rilascio di ormoni della crescita della pianta stessa. La biomassa microalgale, infatti, è composta naturalmente di polisaccaridi, composti antimicrobici e vari metaboliti secondari, talvolta anche secreti nel medium di coltura, che potrebbero incrementare la produttività agricola, oltre ad essere un'alternativa sostenibile ai fertilizzanti tradizionali derivanti da sintesi chimica, che hanno un impatto ambientale negativo [85].

Negli ultimi anni, a causa della maggior sensibilità del consumatore riguardo l'uso di prodotti agricoli sostenibili, il mercato globale dei biofertilizzanti è cresciuto notevolmente [86].

Ad oggi, infatti, questo ha un valore di 3 miliardi di dollari con proiezioni che arrivano a 5,378 miliardi di dollari entro il 2029, con i maggiori consumatori di questi prodotti localizzati in Asia, Europa e Nord America [87].

Ad oggi una strategia che mira alla valorizzazione della biomassa per la produzione di biofertilizzanti può generare un profitto dalla sola biomassa secca di 1000 €/ton con lo sfruttamento del metabolita principale, ovvero carboidrati il cui valore raggiunge i 10 000 €/ton da utilizzare nell'ambito agricolo [88].

Altre strategie di interesse industriale possono vedere la conversione dei carboidrati in biopolimeri per la formazione di plastiche rinnovabili [89] il cui valore di mercato si aggira intorno ai 4 miliardi di dollari con proiezioni di crescita fino a 23 miliardi entro il 2031 [90].

Pertanto, viste le ottime performance di crescita registrate, e le produttività raggiunte, questa specie si pone come un serio candidato nel panorama della coltivazione delle microalghe e, più nel particolare, nella produzione di biocarburanti e biofertilizzanti, come anche nell'ambito alimentare, cosmetico e nella produzione di polimeri.

## 1.8 Scopo della tesi

La diffusione globale delle microalghe e dei loro prodotti presenta ancora delle considerevoli sfide, relative principalmente agli elevati costi di produzione e alle instabilità delle colture. La caratterizzazione di nuovi *strain* dalle caratteristiche compatibili con tali problematiche rappresenta uno dei possibili propulsori allo sviluppo di questo settore. La specie di microalga verde *Picochlorum renovo* si pone come un candidato più che valido per lo sviluppo di un processo industriale ad alta produttività ed efficienza. Tuttavia, data la recente scoperta, i dati a nostra disposizione su questa specie sono carenti e richiedono un approfondimento, soprattutto in un'ottica tipica dell'approccio di *bioprocess engineering*. Questo lavoro di tesi mira a comprendere l'effetto delle variabili operative sulla coltivazione di *P. renovo* in fotobioreattori chiusi operati in continuo. In particolare, lo scopo principale è quello di massimizzare l'efficienza fotosintetica della specie, sfruttando la sua spiccata capacità di acclimatazione alla luce. Ciò è stato fatto valutando l'effetto dell'intensità luminosa, del tempo di permanenza e dello spessore della coltura sulla crescita della biomassa così come sulla produttività ed efficienza del sistema. Infine, per valutare la composizione della biomassa microalgale e la sua potenziale applicabilità, è stato investigato l'effetto dell'intensità di luce e della concentrazione di azoto nel terreno sulla produttività di proteine e carboidrati.

## CAPITOLO 2, MATERIALI E METODI

### 2.1 Specie coltivata e condizioni di crescita

Per gli esperimenti di questa tesi, è stata utilizzata la microalga verde *Picochlorum renovo*, facente parte della classe *Trebouxiophyceae*, isolata per la prima volta dal National Renewable Energy Laboratory (NREL) in Golden, Colorado, USA.

La sua coltivazione è stata volta all'ottimizzazione dell'efficienza di conversione energetica in funzione dell'intensità di luce, del tempo di permanenza e dello spessore del fotobioreattore. La specie è stata caratterizzata per l'accumulo di carboidrati e proteine in batch in funzione dell'intensità di luce e della concentrazione di azoto.

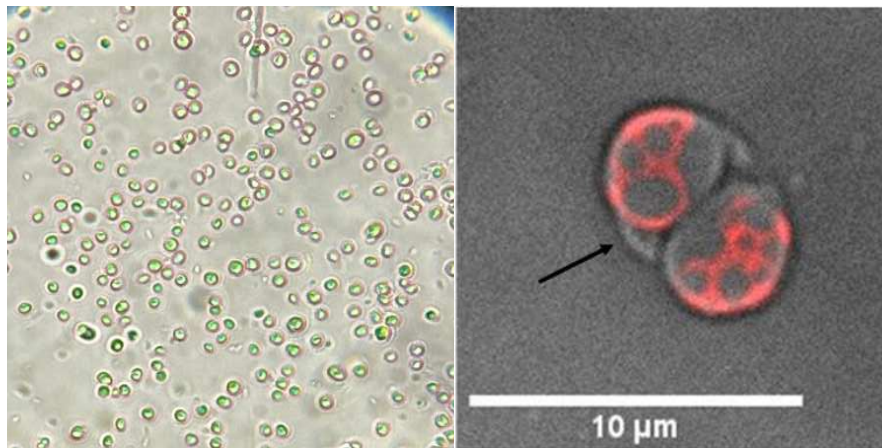


Figura 2.1: a sx immagine al microscopio ottico con ingrandimento 40X di *P. renovo*; a dx immagine con microscopio a fluorescenza durante la mitosi cellulare di *P. renovo* [80].

Tutte le condizioni sperimentali testate sono state eseguite all'interno di un incubatore termostato alla temperatura di 30 °C, con costante insufflazione di aria e CO<sub>2</sub> (5% v/v). Il pH della coltura è stato mantenuto in un range compreso tra 7 e 8,5 ed è stato monitorato quotidianamente mediante pH-metro (HI 9124). L'intensità di luce incidente durante tutto il corso della sperimentazione è stata monitorata usando un fotoradiometro Delta OHM (HD 2102.1).

Il medium utilizzato per garantire la crescita cellulare è l'F/2 la cui composizione è illustrata nella Tabella 2.1 (Guillard and Ryther, 1962) [91]. In particolare, la

concentrazione dei nutrienti è stata raddoppiata rispetto alla composizione di riferimento in modo da evitare fenomeni di limitazione da substrato. Prima del suo utilizzo, il medium di coltura è stato autoclavato a 120°C per 20 minuti in modo da garantirne la sterilità. Il terreno inoltre è stato arricchito con bicarbonato di sodio (NaHCO<sub>3</sub>) per tamponare l'acidificazione della coltura ad opera della CO<sub>2</sub>.

*Tabella 2.1: Composizione del terreno F/2 modificato raddoppiando la concentrazione delle componenti (mg L<sup>-1</sup>) [91].*

NaHCO <sub>3</sub>	2500
Na <sub>2</sub> EDTA*H <sub>2</sub> O	8,32
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	10
NaNO <sub>3</sub>	150
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0,02
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,04
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,01
MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	0,36
NaMoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	12,2*10 <sup>-3</sup>
FeCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O	6,3
Tiamina - Vit B1	15*10 <sup>-6</sup>
Cianocobalamina - Vit B12	9,98*10 <sup>-7</sup>
Biotina - Vit B8	10,02*10 <sup>-7</sup>
NaCl	30000

## 2.2 Sistemi di coltivazione utilizzati

Per ridurre il numero di variabili operative in gioco e per evitare interferenze dovute all'acclimatazione della biomassa alle diverse condizioni testate, lo studio dell'effetto delle variabili operative sull'efficienza di conversione energetica è stato fatto in fotobioreattori in continuo. Per studiare l'effetto della luce e della concentrazione di azoto sull'accumulo di biomolecole di interesse è stata usata la modalità batch in sistemi di coltivazione ad alta efficienza.

### 2.2.1 Esperimenti in continuo

Gli esperimenti in continuo sono stati svolti in due sistemi che consentono di regolare diversamente il tempo di residenza, e, quindi, la portata in ingresso/in uscita dal fotobioreattore, cioè in chemostat ed in turbidostat.

Il sistema operato in chemostat consiste di fotobioreattori con configurazione *flat-panel* con struttura in ferro e pareti in policarbonato (Figura 2.2) con spessore (ove non specificato diversamente) di 35 mm e superficie illuminata di 0,006 m<sup>2</sup>.



Figura 2.2: Setup sperimentale in incubatore dei Flat-panel PBRs operanti in continuo in modalità chemostat.

I reattori sono mantenuti in continuo grazie all'aggiunta di medium fresco mediante l'uso di una pompa peristaltica (Watson Marlow 120S) a velocità regolabile e di tubi in marprene (Watson Marlow Tubing – Orange/Yellow). Il flusso in uscita è garantito dalla presenza di un troppo pieno che assicura che il flusso in entrata eguagli quello in uscita ( $Q_e=Q_u$ ). In tutti gli esperimenti in continuo, l'illuminazione è stata garantita dall'uso di una lampada LED in spettro di luce bianca continua (energia del fotone,  $E_p=204,90 \text{ kJ mol}^{-1}$ ; efficienza di conversione,  $\eta=0,65$ ) (Figura 2.3). Per tutte le condizioni testate il campionamento è stato eseguito per almeno cinque giorni consecutivi dopo un periodo di tempo corrispondente a tre volte il tempo di permanenza, per assicurare che lo stato stazionario venisse raggiunto.

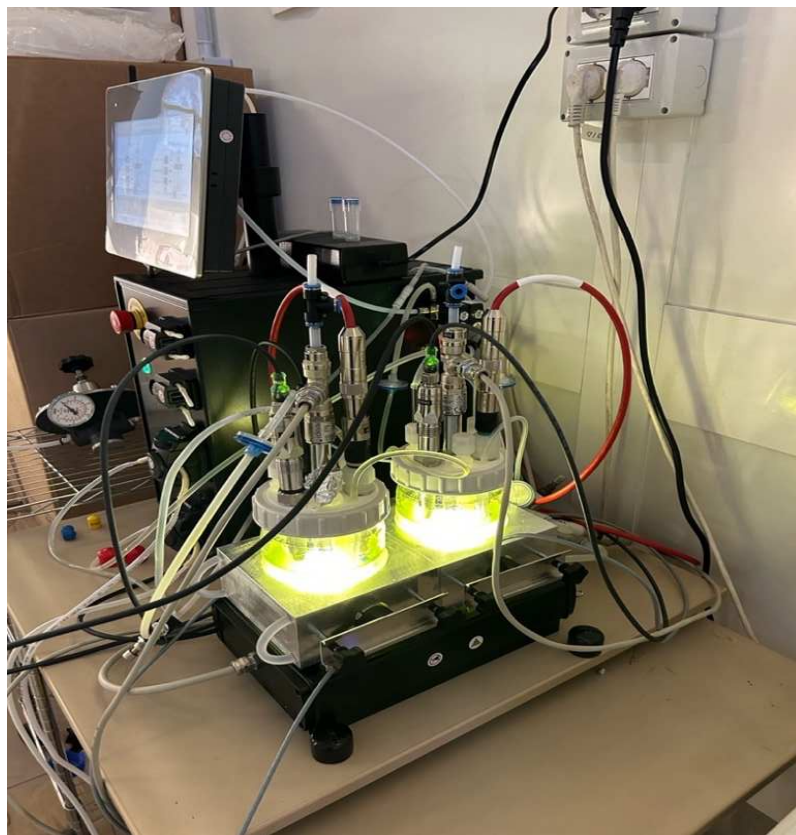


Figura 2.3: Lampada a luce LED bianca utilizzata per tutti gli esperimenti in continuo [92] .

Con questa configurazione è stato valutato l'effetto dell'intensità di luce (PPFD), del tempo di permanenza e dello spessore del fotobioreattore sulla produttività areale e sull'efficienza fotosintetica. In particolare, per valutare l'effetto del PPFD sono state scelte le seguenti intensità luminose: 150, 300, 600 e 800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . In queste condizioni i reattori (spessore di 35 mm) sono stati operati a  $\tau = 1 \text{ d}$ , ipotizzando alte velocità di crescita come riportato nei lavori di Dahlin L. [80] per la stessa specie. L'effetto del *residence time* è stato valutato a PPFD di 300 e 800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e scegliendo quattro diversi tempi di permanenza: 0,75, 1, 2 e 3 giorni. Infine, scegliendo le condizioni con maggiore efficienza in termini di residence time (1 d) e PPFD (150, 300, 600 e 800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) è stato valutato l'effetto dello spessore del flat panel usando, nella stessa configurazione, fotobioreattori costruiti

*ad hoc* con i seguenti spessori: 1,5, 3,5, 7,5 e 15 cm e tre reattori da 7,5 cm in serie per simulare uno spessore da 22 cm.

I reattori in turbidostat sono stati utilizzati per valutare l'effetto del tempo di permanenza sulla produttività areale di biomassa e sull'efficienza fotosintetica utilizzando una configurazione alternativa rispetto ai *flat panel*. Specificamente, il sistema si compone di fotobioreattori del tipo *Internally Illuminated* (II-PBRs) costituiti da un cilindro di vetro (28,3 cm x 14 cm.) mescolati al fondo mediante un'ancoretta magnetica (Figura 2.4).



*Figura 2.4: Set up sperimentale per i fotobioreattori II-PBRs operati in continuo in modalità turbidostat.*

La temperatura è mantenuta costante a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  grazie ad una piastra di riscaldamento collegata ad un chiller (Witeg). Il sistema risulta accessoriato di sensore per la misura di ossigeno disciolto (DO-SN2784), sensore per il pH collegato (Hamilton-CH7402Bonaduz), mediante un'elettrovalvola, al sensore di  $\text{CO}_2$  per l'insufflazione di questa *on demand* a valori di pH superiori a 8 e di un sensore di torbidità (turbidimetro) collegato alle pompe peristaltiche in ingresso,

per controllare la diluizione della coltura sulla base di un set-point noto a priori di densità cellulare. Il sistema è mantenuto a volume costante (0,450 L) mediante l'uso di un sensore di livello che attiva una pompa peristaltica per l'uscita della coltura dal sistema. Il sistema è equipaggiato con una pompa di aria che permette l'insufflazione di aria in continuo per il mescolamento e per eliminare l'ossigeno in eccesso. L'illuminazione è garantita da un LED in spettro di luce bianca posto internamente al reattore. Tutti gli strumenti e gli equipaggiamenti sopra menzionati possono essere facilmente attivati/disattivati e controllati digitalmente dall'operatore attraverso un'interfaccia appositamente sviluppata.

Come menzionato, questo sistema è stato utilizzato per valutare l'effetto del tempo di permanenza sulle performance di crescita. Come nel caso del chemostat, tali esperimenti sono stati condotti a 300 e 800  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . In particolare, per impostare i diversi rate di diluizione sono stati impostati differenti OD-set (1,5; 3; 4,5; 5; 6) e il tempo di residenza è stato calcolato misurando quotidianamente il volume raccolto in uscita nel corso di almeno 10 giorni.

### **2.2.2 Esperimenti in batch**

Per valutare l'effetto dell'intensità di luce e della concentrazione di azoto nel medium sulla produttività di carboidrati e proteine, sono stati eseguiti degli esperimenti in modalità batch. In particolare, è stato usato un sistema di coltivazione ad alta efficienza, Cell-DeG<sup>®</sup>, adatto a studiare le variabili che influenzano la crescita cellulare [93]. Esso si compone di cupolette (HD100 Cultivator) trasparenti del volume di 100 mL dotate di una membrana permeabile ai gas posta sul fondo della struttura che permette di operare come un fotobioreattore a membrana consentendo lo scambio gassoso (Figura 2.5) [94].



HDC 1.100B



*Figura 2.5: Cell factory con design a forma di cupola e membrana permeabile per garantire l'apporto di gas [95].*

Le cupolette sono allocate in postazioni specifiche su di una piattaforma che assicura l'insufflazione di aria atmosferica e CO<sub>2</sub>. La percentuale di quest'ultima può essere variata secondo necessità mediante l'uso di una CPU di controllo, detta *Growth Control Unit* (GCU). Attraverso quest'ultima si può anche settare l'intensità luminosa desiderata grazie alla presenza di una lampada LED bianca posizionata al di sopra della piattaforma (Figura 2.6) [95]. Per garantire il mescolamento, la piattaforma è stata posizionata su un oscillatore orbitale a velocità di 120 rpm (Figura 2.6). L'intero sistema Cell-DeG è stato posizionato all'interno di una camera oscura appositamente costruita per evitare l'interferenza di sorgenti luminose esterne e per potere controllare la temperatura a 33°C durante tutto il corso della sperimentazione.



*Figura 2.6: Sistema di illuminazione LED e GCU per il controllo dei parametri (a sx); GCU e piattaforma di coltivazione del sistema Cell-DeG (a dx)[95].*

### 2.2.3 Respirimetria

Per potere scegliere il giusto range di PPFD negli esperimenti in continuo, è stata investigata la cinetica di crescita di *P. renovo* in funzione dell'intensità luminosa attraverso un protocollo respirometrico. Questo, nel dettaglio, si basa sulla misura della concentrazione di ossigeno disciolto (DO) nel tempo in una coltura appositamente allestita per lo scopo quando questa viene esposta a periodi di luce/buio alternati. Nei periodi di luce si ha un aumento dell'attività fotosintetica, che porta ad una rapida produzione e rilascio nella coltura di ossigeno molecolare. Inversamente, durante le fasi di buio la microalga interrompe il processo fotosintetico e inizia a consumare l'ossigeno molecolare grazie all'attivazione del meccanismo respiratorio mitocondriale. Bisogna specificare che il tasso di produzione dell'ossigeno è strettamente influenzato dalla velocità con cui l'alga performa la fotosintesi. A sua volta questa è influenzata dal numero di fotoni incidenti che devono essere processati nell'unità di tempo, cioè dall'intensità di luce. Difatti, a basse intensità di luce l'attività di fotosintesi è limitata (foto-limitazione) e il tasso di produzione dell'ossigeno sarà relativamente basso. All'aumentare dell'intensità incidente, tuttavia, l'attività fotosintetica incrementa sempre più e con essa, proporzionalmente, il tasso di produzione di ossigeno, fino al raggiungimento della capacità massima dei fotosistemi di processamento dei fotoni (foto-saturazione). Se l'intensità luminosa aumenta oltre questa soglia, l'eccesso di luce può creare danni cellulari e può provocare morte cellulare (foto-inibizione) [96]. Dunque, variando l'intensità luminosa nel corso dell'esperimento è possibile correlare il tasso di produzione dell'ossigeno (*Oxygen Production Rate* – O<sub>2</sub>) alla velocità di crescita cellulare. Questo viene fatto attraverso l'uso della cinetica di Haldane (Eq 2.1), che bene descrive l'attività inibitoria esercitata dal substrato sulla crescita oltre una certa concentrazione:

$$\frac{OPR}{cx} (d^{-1}) = \mu_{max} \frac{I}{I + K_i \left(\frac{I}{I_{opt}} - 1\right)^2} \quad (\text{Eq. 2.1})$$

Dove  $\mu_{max}$  rappresenta la massima velocità di produzione di ossigeno ( $d^{-1}$ ),  $I$  rappresenta l'intensità di luce incidente ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),  $K_i$  rappresenta la costante di

inibizione ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e  $I_{OPT}$  l'intensità di luce ottimale per la crescita della specie ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Per potere ottenere i parametri di interesse (cioè  $\mu_{max}$ ,  $K_i$  e  $I_{OPT}$ ) il protocollo respirometrico è stato eseguito scegliendo come intensità di luce 150, 300, 600, 1200 e 2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . La biomassa utilizzata per il test è stata prelevata da un inoculo in batch acclimatato alla luce bianca e in fase di crescita attiva ed è stata diluita ad una concentrazione di 0,2 g L<sup>-1</sup> in accordo con il protocollo messo a punto in lavori precedenti. L'esperimento è stato condotto all'interno di un contenitore in vetro delle dimensioni di 4,2 cm x 4,2 cm x 8 cm, con all'interno un agitatore magnetico per mescolare la coltura, illuminato da un LED bianco (Sezione 2.2.1). Questo set-up è stato posto in una camera oscura per evitare interferenze esterne durante il protocollo. La coltura è stata mantenuta alla temperatura di 30°C. La concentrazione di O<sub>2</sub> che si discioglie nel mezzo viene misurata con un  $\Delta t = 15$  secondi mediante la sonda Delta OHM HD 2109.1. Per ogni condizione sperimentale sono state eseguite quattro repliche tecniche. L'andamento viene monitorato mediante il software DeltaLog9, permettendo di osservare le pendenze positive e negative della produzione e consumo di ossigeno dalle cellule nel tempo. Quando la concentrazione di O<sub>2</sub> disciolto eccede il range di analisi utile per il test, viene insufflato N<sub>2</sub> che consente lo *stripping* dell'O<sub>2</sub> in eccesso.

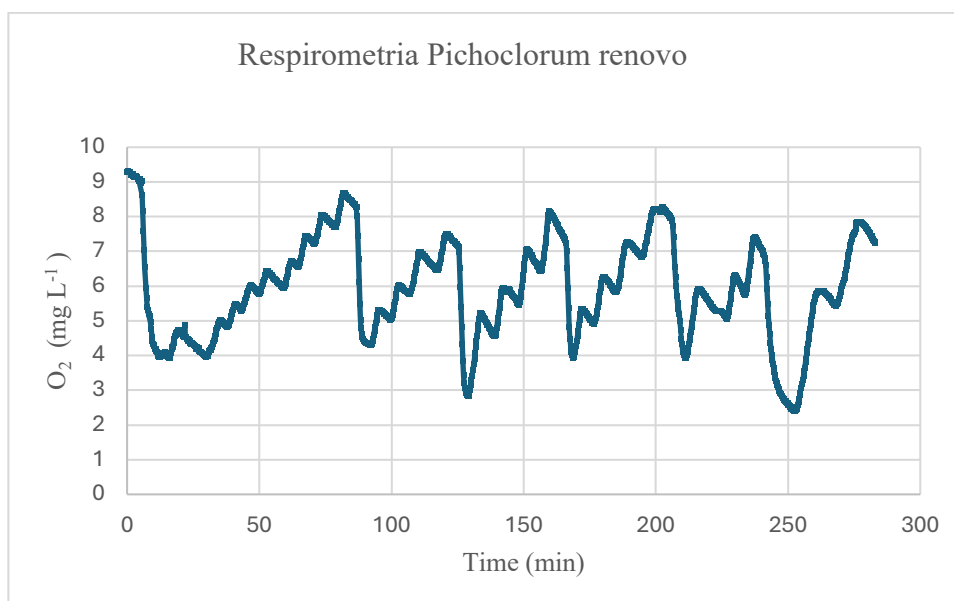


Figura 2.7: Tipico profilo di evoluzione dell'ossigeno ("a dente di sega") registrato nel corso dell'esperimento di respirometria.

Il coefficiente angolare di ogni retta con andamento positivo rappresenta la velocità di produzione dell'ossigeno. Rapportata tale velocità alla concentrazione di biomassa nota per il test, tramite la legge di Haldane (Eq.2.1) si è in grado di fittare i parametri cinetici tramite il Solver di Excel.

### 2.3 Esperimenti in luce continua rosso blu

Per la realizzazione di questi esperimenti sono stati utilizzati sistemi di illuminazione LED con luce bicromatica rosso-blu composti di una lampada formata da 25 LED collegati in serie tra loro (Figura 2.8) il cui spettro di emissione è composto dall'80% di luce rossa (lunghezza d'onda 660 nm,  $E_p = 0,182 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) e il 20% di luce blu (430 nm,  $E_p = 0,264 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) (Figura 2.8) [101].

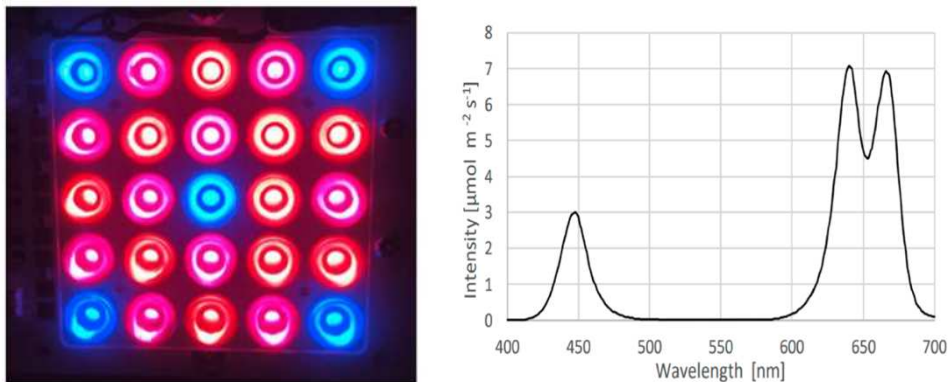


Figura 2.8: Lampada LED rosso/blu (sx) e relativo spettro di emissione (dx) [101].

Gli esperimenti in continuo sono stati eseguiti utilizzando fotobioreattori con spessore di 15 cm e un tempo di permanenza di 1 giorno, in incubatore termostato a 30°C, insufflando una miscela di aria e CO<sub>2</sub> (5% v/v) ad una intensità incidente di 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### 2.4 Monitoraggio della crescita cellulare

La crescita cellulare è stata monitorata quotidianamente con la misura della densità ottica (OD), del peso secco e della conta cellulare.

### 2.4.1 Densità Ottica

La misura della densità ottica è stata eseguita mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro a doppio raggio (Shimadzu UV-1900) con cuvette dal cammino ottico ( $l$ ) di 1 cm. La misura dell'OD per le cellule eucariotiche si esegue impostando l'assorbanza da rilevare a 750 nm, onde evitare interferenze di pigmenti che assorbono a lunghezze d'onda più basse. Come bianco è stato utilizzato terreno di crescita per azzerare possibili interferenze di sali nell'acquisizione della misura. La misura dell'OD è in grado di fornire dati circa la concentrazione cellulare nel campione analizzato grazie alla legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon_{\lambda}Cl \quad (\text{Eq. 2.2})$$

In cui il termine  $A$  rappresenta l'assorbanza misurata dallo strumento,  $\varepsilon_{\lambda}$  il coefficiente di estinzione molare ad una data lunghezza d'onda ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),  $C$  rappresenta la concentrazione cellulare ( $\text{g L}^{-1}$ ) e  $l$  rappresenta il cammino ottico (cm).

Le misure acquisite sono considerabili attendibili per valori di assorbanza compresi tra 0,1 e 0,99, poiché oltre tale valore la correlazione lineare tra assorbanza e concentrazione cellulare viene persa.

### 2.4.2 Peso secco

Le misure di peso secco sono state eseguite giornalmente per ogni tipo di condizione analizzata. In sostanza, un volume noto di biomassa viene prelevata quotidianamente e lavata due volte, per evitare sovrastima del peso dovuto alla presenza di sali del medium. La biomassa a questo punto viene filtrata grazie ad una pompa a vuoto e dei filtri di nitrocellulosa con pori del diametro di 0,45  $\mu\text{m}$ , precedentemente pesati per acquisire la tara. Una volta filtrato interamente il campione, il filtro viene posto in un forno e lasciato a seccare per almeno 2 ore a 110°C. Passato questo tempo, il filtro viene pesato per acquisirne il peso lordo.

Il peso secco viene calcolato mediante la formula:

$$\frac{\text{Peso lordo} - \text{Peso tara}}{\text{Volume filtrato}} = \text{Concentrazione cellulare (g L}^{-1}\text{)} \quad (\text{Eq. 2.3})$$

### 2.4.3 Conta cellulare

Attraverso questa tecnica è possibile risalire al numero di cellule presenti in un volume di coltura definito. Ci si avvale di un microscopio ottico su cui viene posizionato un vetrino conta-globuli (Camera di Burker), che presenta due camerette conta cellule dal volume di 10  $\mu\text{l}$ .



Figura 2.9: vetrino utilizzato per la conta cellulare (Camera di Burker).

Con una pipetta (2 - 20  $\mu\text{l}$ ), su ogni cameretta viene inserito il campione per capillarità. Osservando al microscopio, ogni cameretta è caratterizzata da una griglia utile per effettuare la conta cellulare. La griglia, formata da nove quadrati (superficie 1  $\text{mm}^2$ ), è delimitata da tre linee parallele di lato 1 mm [102]. Ognuno dei nove quadrati contiene al suo interno sedici ulteriori quadrati delimitati da due linee parallele di lato 0,20 mm.

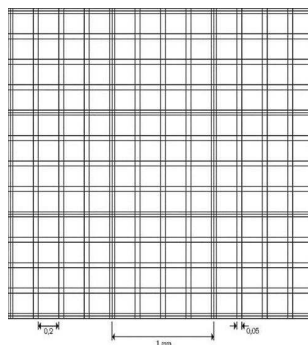


Figura 2.10: Schema delle celle disegnate sulla superficie della camera conta globuli di Burker.

Il campione deve essere diluito in una soluzione isotonica e caricato, possibilmente con un volume leggermente in eccesso (20  $\mu$ l), per capillarità all'interno delle camerette conta cellule, generando un film di liquido spesso 0,1 mm. La misurazione viene eseguita andando a contare le cellule presenti in tre dei nove quadrati delimitati dalle tre linee parallele, optando per una direzione di conta dei quadrati in modo obliquo.

Il numero di cellule viene calcolato con la seguente formula:

$$cellule (ml^{-1}) = nr. cellule \cdot 10^4 \cdot d \quad (\text{Eq. 2.4})$$

In cui “*nr. cellule*” rappresenta il numero di cellule contate, date dalla media dei valori ottenuti per ogni singola conta delle tre camere analizzate e *d* rappresenta il fattore di diluizione.

## 2.5 Bilanci di massa

I dati relativi alla concentrazione di biomassa sono stati utilizzati per ricavare i valori di produttività volumetrica, produttività areale ed efficienza fotosintetica in ogni condizione testata.

### 2.5.1 Produttività Volumetrica

La produttività volumetrica ( $P_{x,v}$ ) è stata calcolata negli esperimenti in continuo come segue:

$$P_{x,v} (gL^{-1} \cdot d^{-1}) = \frac{C_x}{\tau} \quad (\text{Eq. 2.5})$$

Dove,  $C_x$  è la concentrazione di biomassa ( $g L^{-1}$ ) e  $\tau$  è il tempo di permanenza (giorni). Negli esperimenti in batch, invece, la produttività volumetrica ( $P_{p,v}$ ) è stata calcolata relativamente a carboidrati, proteine e pigmenti fotosintetici.

$$P_{p,v} (g L^{-1} \cdot d^{-1}) = \frac{C_{P,f} - C_{P,i}}{t_f - t_0} \quad (\text{Eq. 2.6})$$

Dove  $C_{Pf}$  e  $C_{Pi}$  rappresentano, rispettivamente, la concentrazione del prodotto al giorno finale e la concentrazione del prodotto misurata al giorno iniziale ( $\text{g L}^{-1}$ ). Similarmente,  $t_f$  e  $t_0$  indicano, rispettivamente, il giorno finale e iniziale di coltura (giorni).

### 2.5.2 Produttività Areale

Una delle variabili operative di maggiore interesse nel campo della coltivazione microalgale è la produttività areale ( $P_{x,a}$ ), cioè la produzione di biomassa per unità di superficie coltivata nell'unità di tempo. Essa viene, calcolata con la seguente formula:

$$P_{x,a}(\text{gm}^{-2}\text{d}^{-1}) = P_{x,v} \cdot W \quad (\text{Eq. 2.7})$$

In questo caso  $W$  viene inteso come lo spessore del fotobioreattore ( $\text{cm}^3$ ).

### 2.5.3 Efficienza Fotosintetica

Per poter calcolare l'efficienza di conversione della luce in biomassa da parte delle cellule, è stata utilizzata la seguente equazione:

$$\eta_{PAR}(\%) = \frac{C_x \cdot LHV \cdot Q_e}{PFD \cdot E_p \cdot A_{PBR}} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 2.8})$$

In questa equazione  $LHV$  rappresenta il “*Lower Heating Value*” della specifica biomassa microalgale ( $18,66 \text{ KJ/g}$ ) [103],  $Q_e$  è la portata in ingresso ( $\text{L d}^{-1}$ ),  $PFD$  si identifica come il “*photon flux density*”, ovvero l'intensità di luce incidente sul fotobioreattore alla condizione in cui si sta operando ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ),  $E_p$  rappresenta l'energia media del fotone ( $204,9 \text{ KJ mol}^{-1}$ ) e, infine,  $A_{PBR}$  è la superficie illuminata del fotobioreattore ( $\text{m}^2$ ).

## 2.6 Bilanci di energia

L'energia assorbita dalle microalghie viene utilizzata principalmente per due scopi: per la crescita e la divisione cellulare (quindi, per la propagazione della coltura) e



per il mantenimento cellulare, ovverossia per il sostentamento di tutte quelle attività metaboliche che non sono direttamente e necessariamente connesse alla divisione cellulare (come ad esempio il turn-over proteico, il funzionamento delle pompe di trasporto attive, l'attivazione di meccanismi di protezione ecc.) [104].

Da un punto di vista matematico, dunque, secondo il Modello di Pirt [105], la variazione di concentrazione di biomassa nel tempo può essere descritta come:

$$\frac{dCx}{dt} = \mu_g Cx - \mu_e Cx \quad (\text{Eq. 2.9})$$

In cui si ha che  $Cx$  rappresenta la concentrazione di biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ),  $\mu_g$  è la massima velocità di crescita delle cellule ( $\text{d}^{-1}$ ) mentre  $\mu_e$  si identifica come la massima velocità di mantenimento ( $\text{d}^{-1}$ ).

Per potere determinare la velocità di mantenimento specifica di *Picochlorum renovo* al variare dell'intensità luminosa incidente sulla coltura, è possibile, approssimando il sistema ad un CSTR e operandolo in continuo a stato stazionario, eguagliare la velocità di crescita apparente,  $\mu$  ( $\text{day}^{-1}$ ), cioè la velocità di crescita netta, considerando sia la crescita che il mantenimento, secondo la seguente equazione:

$$\mu = \frac{1}{\tau} \quad (\text{Eq. 2.10})$$

L'equazione 2.14 indica che la velocità di crescita apparente è uguale all'inverso del tempo di permanenza impostato,  $\tau$  (giorni), a cui si sta operando il fotobioreattore.

Di conseguenza, variando il tempo di permanenza, si è in grado di studiare le diverse velocità di crescita apparenti del microorganismo. Inoltre, sappiamo che a stato stazionario la quantità di fotoni assorbiti nell'unità di tempo dalla biomassa, cioè lo "*specific light supply rate*" ( $\text{mmol}_{\text{PH}} \text{g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ), è costante e può essere calcolata secondo la seguente equazione:

$$r_{Ex} = \frac{PFD \cdot A_{PBR}}{C_x \cdot V_{PBR}} \quad (\text{Eq. 2.11})$$

In cui  $PFD$  è l'intensità di luce incidente ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),  $A_{PBR}$  corrisponde all'area illuminata del fotobioreattore ( $\text{m}^2$ ),  $C_x$  è la concentrazione di biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) e  $V_{PBR}$  è il volume operativo del fotobioreattore (L). In accordo con Kliphuis et al. (2012) [106], lo *specific light supply rate* è correlato alla velocità di crescita apparente:

$$r_{Ex} = \frac{\mu}{Y_G} + m_E \quad (\text{Eq. 2.12})$$

In cui  $m_E$  rappresenta il coefficiente di mantenimento specifico per la biomassa ( $\text{mmol}_{\text{PH}} \text{g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ), mentre  $Y_G$  rappresenta la resa specifica di biomassa sulla luce relativa alla sola crescita e proliferazione ( $\text{g}_x \text{mmol}_{\text{PH}}^{-1}$ ). Questi due parametri sono fondamentali per il calcolo della velocità specifica di mantenimento secondo l'equazione:

$$\mu_e = Y_{APP} m_E \quad (\text{Eq. 2.13})$$

Dove  $Y_{APP}$  è la resa apparente di biomassa sulla luce ( $\text{g}_x \text{mmol}_{\text{PH}}^{-1}$ ) e che è un parametro ben diverso dalla resa specifica  $Y_G$ , poiché considera anche l'energia investita per il mantenimento e quindi risulta, per necessità di cose, più bassa della resa specifica. Essendo le due correlate, la resa apparente, dunque può essere calcolata tramite il modello di Bodegom [107] come:

$$\frac{1}{Y_{APP}} = \frac{m_E}{\mu} + \frac{1}{Y_G} \quad (\text{Eq. 2.14})$$

Oppure in maniera empirica tramite l'uso di dati sperimentali secondo l'equazione 2.15:

$$Y_{APP} = \frac{C_x \cdot V_{PBR}}{PF D \cdot A_{PBR} \cdot \tau} \quad (\text{Eq. 2.15})$$

## 2.7 Calcolo del coefficiente di assorbimento specifico

Il coefficiente d'assorbimento  $K_a$  ( $\lambda$ ) è ottenuto facendo diverse misure con fotobioreattori flat-panel di diverso spessore (1,5 cm – 3,5 cm – 7,5 cm – 15 cm) a due intensità di luce incidente differente (300 e 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) con una coltura

di *P. renovo* a due diverse concentrazioni (0,3 e 0,4 g L<sup>-1</sup>), basandosi sul protocollo messo a punto da Borella et al. (2021) [108].

Per ciascun reattore mediante un fotoradiometro (Delta OHM HD 2102.1) è stata misurata l'intensità della luce incidente sulla superficie del fotobioreattore ( $I_0$ ) e della luce uscente dalla parete posteriore dello stesso ( $I_W$ ).

Dalle misure ottenute si può ricavare il coefficiente d'assorbimento specifico facendo una regressione in accordo con la legge di Lambert-Beer.

$$\ln \frac{I(W,\lambda)}{I(0,\lambda)} = -K_a(\lambda) \cdot C_x \cdot W \quad (\text{Eq 2.16})$$

Dove  $I_W$  e  $I_0$  rappresentano l'intensità di luce incidente e uscente dal fotobioreattore ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ),  $C_x$  la concentrazione di biomassa ( $\text{g m}^{-3}$ ) e  $W$  lo spessore del fotobioreattore (m). L'equazione 2.16 rappresenta l'equazione di una retta che intercetta il punto di origine degli assi cartesiani (0,0) e di pendenza uguale al valore del coefficiente di assorbimento. Pertanto, plottando il logaritmo del rapporto tra le intensità di luce misurate e il prodotto tra concentrazione di biomassa e spessore del fotobioreattore è possibile ricavarsi il coefficiente di assorbimento specifico per la specie microalgale.

## 2.8 Misure analitiche

Per ogni condizione sperimentale è stata svolta l'analisi della composizione della biomassa in termini di carboidrati, proteine e pigmenti fotosintetici (clorofilla e carotenoidi) allo scopo di caratterizzare qualitativamente la biomassa in diverse condizioni e valutare la presenza di stress per la crescita.

### 2.8.1 Analisi delle proteine

Per l'analisi delle proteine interne alla biomassa, adottando il protocollo di Maijer et al. (1998) [109] un volume noto di biomassa viene prelevato e sottoposto a centrifugazione per 10 minuti a 13500 rpm. Una volta rimosso il surnatante il pellet è risospeso in un isovolume di NaOH 1 M per permettere la rottura cellulare e la fuoriuscita delle proteine.

Successivamente il campione è sottoposto a bollitura per 30 minuti e poi, si prelevano 50 µl e si diluiscono con 1 ml di soluzione di Acido Bicinconinico (BCA). A questo punto il campione viene mantenuto in un bagnetto termostato a 60°C per 15 minuti. In queste condizioni, infatti, il BCA reagisce con le proteine e i peptidi estratti: quando ciò avviene gli ioni rameici ( $\text{Cu}^{+2}$ ) vengono ridotti a ioni rameosi ( $\text{Cu}^{+}$ ) in ambiente basico, formando un addotto con i peptidi in soluzione. Tale addotto assorbe con un massimo a 562 nm. Tale lunghezza d'onda viene dunque scelta per la quantificazione colorimetrica allo spettrofotometro.

La concentrazione di proteine viene calcolata a partire dal valore di assorbanza utilizzando la seguente curva di calibrazione precedentemente sviluppata:

$$\text{BSA } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 1144,2 \cdot \text{abs} - 85,12 \quad R^2 = 0,998$$

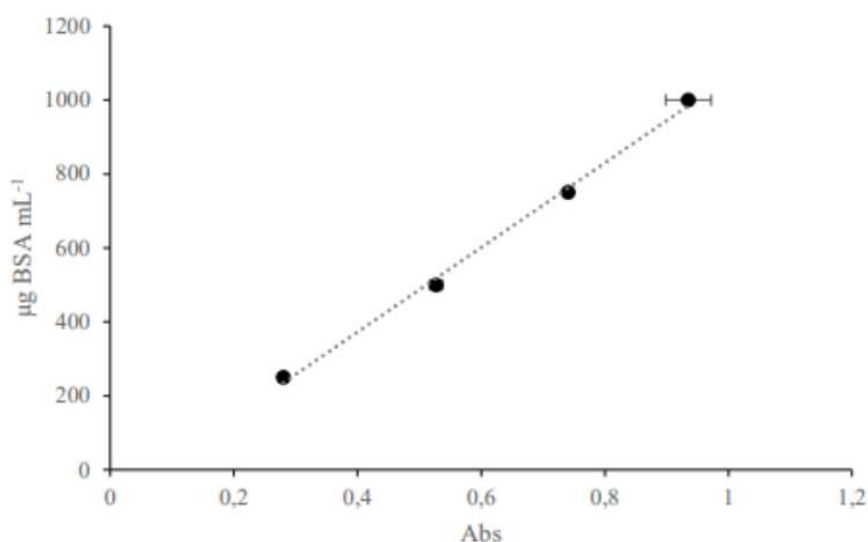


Figura 2.11: retta di taratura usata per la quantificazione delle proteine.

### 2.8.2 Analisi dei carboidrati

Tramite il metodo dell'Anthrone, descritto da Dreywo nel 1946 [110], è stata quantificata la concentrazione dei carboidrati liberi e in forma polimerica nella biomassa d'interesse.

L'anthrone è una miscela di Acido Solforico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  71% v/v), Anthrone (2 g L<sup>-1</sup>) e acqua deionizzata (29% v/v).

Il protocollo operativo per questa quantificazione, come primo step, consiste nel prelevare 100 µl di biomassa dal fotobioreattore e aggiungervi 900 µl del reagente

descritto sopra. Si prosegue portando ad ebollizione il campione per 10 minuti. In questo step l'acido solforico è in grado di idrolizzare i polisaccaridi a monosaccaridi. Successivamente questi ultimi vanno incontro a una reazione di deidratazione che porta alla formazione del 5-idrossimetil-furfurale. Esso reagisce con la forma attiva del reagente, l'anthranolo, portando alla formazione di un composto con proprietà colorimetriche differenti (blu-verde), che sono alla base del saggio con cui si va a quantificare la concentrazione di carboidrati totali, alla lunghezza d'onda di 625 nm, dove si ha il massimo del picco d'assorbimento. La concentrazione di carboidrati totali si ricava dalla retta di taratura ottenuta con concentrazioni note di glucosio:

$$C_6H_{12}O_6 \text{ (g L}^{-1}\text{)} = 0,202 \cdot \text{abs} + 0,013 \quad R^2 = 0,997$$

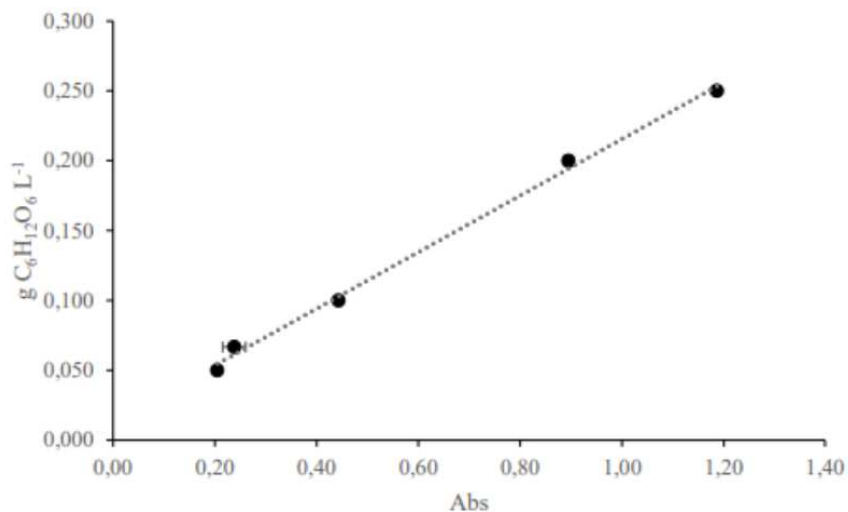


Figura 2.12: retta di taratura usata per la quantificazione dei carboidrati in biomassa.

### 2.8.3 Analisi dei Pigmenti (Clorofille e Carotenoidi)

Basandosi sul metodo ideato da Moran et al. (1980) [111] è stata quantificata la produzione di pigmenti fotosintetici nelle diverse condizioni, cioè pigmenti e carotenoidi. Il protocollo operativo consiste nel prelevare 1 mL di campione e centrifugarlo (13.500 rpm per 10 minuti). Rimosso il surnatante, sotto cappa chimica si risospende il pellet in 1 mL di N-Ndimetil-formammide (DMF) solvente

apolare in grado di lisare le cellule e solubilizzare e stabilizzare i pigmenti fotosintetici liberati. I campioni devono essere tenuti al buio (per evitarne la fotodegradazione) a -20 °C per 24 ore prima di poter procedere con la quantificazione. Una volta scongelati si effettua un'ulteriore centrifugazione (13.500 rpm per 10 minuti) di modo da far depositare il pellet e poter procedere al prelievo dei pigmenti presenti nel surnatante. Dopo opportune diluizioni in DMF, se necessarie, viene ottenuto lo spettro del campione nel range di lunghezza d'onda che va dai 350 ai 750 nm. con uno spettrofotometro a doppio raggio, come descritto nel paragrafo 2.3.1, e cuvette di quarzo.

La quantificazione delle clorofille e dei carotenoidi viene eseguita tramite le seguenti equazioni di correlazione [112]:

$$Chl - a (\mu g mL^{-1}) = (Abs_{664} - Abs_{750})d \varepsilon_{chl-a} \left( \frac{V_{DMF}}{V_s} \right) \quad (\text{Eq. 2.17})$$

$$Car (\mu g mL^{-1}) = [(Abs_{461} - Abs_{750}) - (Abs_{664} - Abs_{750}) \cdot 0,04] \cdot \varepsilon_{car} \cdot \left( \frac{V_{DMF}}{V_s} \right) \quad (\text{Eq. 2.18})$$

In cui  $d$  rappresenta il fattore di diluizione,  $\varepsilon_{chl-a}$  ed  $\varepsilon_{car}$  sono i coefficienti di assorbimento dei pigmenti il cui valore è di 11,92 e 4 rispettivamente.

Per evitare a possibili interferenze, dovute a residui di estrazione, le assorbanze registrate vengono normalizzate a 750 nm per evitare interferenze della *base-line*.

## 2.9 Metodologie statistiche

Differenti metodologie statistiche sono state utilizzate per valutare la significatività dei dati ottenuti nelle diverse condizioni sperimentali testate.

### 2.9.1 Design of Experiments (DoE)

Per il design, l'esecuzione e l'analisi degli esperimenti di caratterizzazione della biomassa in funzione della concentrazione di azoto e dell'intensità di luce (vedi Paragrafo 2.2.2) è stato adoperato un approccio statistico noto come *Design of Experiment* (DoE). Ideata da R.A. Fischer [113], questa metodologia consente di

analizzare statisticamente i risultati di un set di esperimenti e descrivere matematicamente, mediante un modello, l'effetto di alcune variabili d'interesse (note come *fattori*) su delle misure raccolte durante la sperimentazione (note come *output*). La correlazione tra *fattori* e *output* e di come i primi influenzino i secondi, come anticipato, viene descritta attraverso due tipi di modello matematico. Nel caso in cui la correlazione tra fattori ( $X$ ) e output ( $Y$ ) sia lineare, si sfrutta un modello di regressione lineare descritto come segue:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_i + \beta_2 X_j + \beta_{1,2} (X_i X_j) \dots + \beta_n X_n + \epsilon \quad (\text{Eq. 2.19})$$

Dove  $\beta_0$  rappresenta l'intercetta,  $\beta_{1,2..n}$  rappresentano i coefficienti associati alle diverse variabili indipendenti, cioè i fattori  $X_{i,j..n}$ ,  $\beta_{1,2}$  rappresenta il coefficiente associato all'interazione tra i due fattori nell'influenzare il risultato della variabile dipendente  $Y$  e, infine,  $\epsilon$  rappresenta l'errore e cioè una stima dell'adattamento del modello ai dati sperimentali.

In tutti quei casi in cui la correlazione tra variabile dipendente ed indipendente si discosta dalla linearità si applica un modello quadratico per tenere conto di effetti non lineari dei fattori sulla variabile di risposta:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_1 X_i + \sum_{i < j}^n \beta_{1,2} X_i X_j + \sum_{i=1}^n \beta_{1,1} X_i^2 + \epsilon \quad (\text{Eq. 2.20})$$

Nella Equazione 2.19 è possibile ritrovare i termini tipici della regressione lineare considerando anche l'interazione tra fattori (vedi Eq. 2.20), così come i fattori quadratici ( $X_i^2$ ) e i relativi coefficienti ( $\beta_{1,1}$ ) che modellano la curvatura dell'interazione.

Nel caso specifico di questo lavoro, i fattori scelti sono rappresentati dalla concentrazione di azoto nel medium ( $\text{mg}_N \text{ L}^{-1}$ ) e dall'intensità di luce incidente ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Per ognuno di questi fattori sono stati scelti dei valori da testare (cioè i *livelli*) che sono rispettivamente 50, 275 e 500  $\text{mg}_N \text{ L}^{-1}$  e 130, 300 e 470  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Attraverso l'uso del software Minitab<sup>®</sup>, è stato dunque inizialmente disegnato il piano sperimentale da seguire con una randomizzazione delle corse sperimentali per evitare influenza di variabili non note e non controllabili (Tabella 2.2). In

particolare, per la creazione del design è stato scelto un *central composite design* con l'esplorazione di alcuni *star points*: in particolare, considerando lo spazio sperimentale dato dai valori estremi dei due fattori si è deciso di iterare un *face-centered design*, in cui tutti gli esperimenti appartengono allo spazio sperimentale e non ve ne sono al di fuori. Specificamente sono state eseguite sei repliche dei punti centrali – *central points* – ( $250 \text{ mg}_N \text{ L}^{-1}$  e  $300 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); tre repliche per ciascuno dei punti assiali – *axial points* – e quattro condizioni (senza repliche) dei punti ai vertici dello spazio sperimentale – *factorial points*. La figura 2.13 descrive lo schema dello spazio sperimentale esplorato.

*Tabella 2.2: design sperimentale generato attraverso il software Minitab®.*

Run	Concentrazione di azoto ( $\text{mg}_N \text{ L}^{-1}$ )	Intensità di luce ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
1	275	300
2	50	300
3	50	300
4	500	300
5	500	470
6	275	300
7	500	130
8	275	300
9	275	130
10	275	470
11	50	130
12	50	470
13	275	300
14	500	300
15	275	470



16	275	130
17	500	300
18	275	470
19	50	300
20	275	130
21	275	300
22	275	300

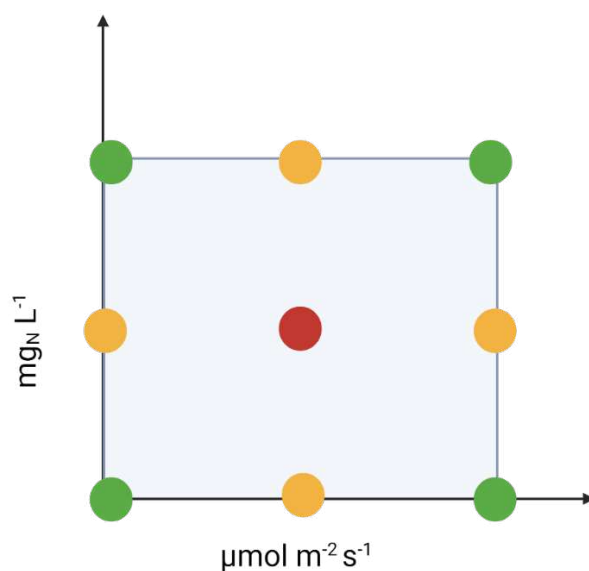


Figura 2.13: Schema dello spazio sperimentale esplorato considerando due fattori (concentrazione di azoto nel medium,  $\text{mg}_N \text{L}^{-1}$ , e intensità di luce incidente,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Il cerchio rosso rappresenta i “central points”, i cerchi gialli rappresentano gli “axial points” e i cerchi verdi rappresentano i “factorial points”.

Terminata la fase di sperimentazione seguendo il design (Tabella 2.2) sono state scelte le variabili di output in termini di produttività volumetrica di carboidrati e proteine. Successivamente, mediante utilizzo del software Minitab® è stata eseguita l'analisi statistica dei risultati ottenuti e la regressione del modello quadratico con i relativi parametri. Per ottenere le migliori combinazioni di fattori è stata infine eseguita una fase di *ottimizzazione* andando a massimizzare singolarmente i valori di produttività delle diverse macromolecole analizzate.

### **2.9.2 Analisi Statistica**

I risultati sperimentali sono stati sottoposti ad analisi statistica per valutare la significatività delle differenze ottenute. A tal scopo è stato svolto il test Anova-one way con un livello di confidenza del 95%. In particolare, tale analisi è stata condotta sulla concentrazione cellulare, sull'efficienza fotosintetica e sulla produttività areale ottenuta nei diversi esperimenti in continuo. Infine, ai fini di esposizione grafica, è stato effettuato il *grouping* applicando il test di Tukey, con un livello di confidenza del 95%.

## CAPITOLO 3, RISULTATI E DISCUSSIONE

### 3.1 Effetto dell'intensità luminosa sulla cinetica di crescita di *P. renovo*

In questa sezione ci si è basati sullo studio dell'effetto dell'intensità luminosa su *P. renovo* effettuando un'analisi respirometrica (vedi paragrafo 2.2.3) per determinare i parametri di crescita relativi a questa variabile.

Come visibile in Figura 3.1 i dati di produzione di ossigeno, normalizzati sulla concentrazione di biomassa ( $OPR/C_x$ ), alle diverse intensità luminose sembrano bene approssimare la cinetica di Haldane: infatti a valori inferiori a circa  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  osserviamo un ridotto *rate* di produzione di ossigeno, tipico di una condizione di foto-limitazione. A valori superiori, invece, viene registrato un sostanziale plateau della stessa misura (foto-saturazione), con fenomeni di foto-inibizione osservabili a intensità superiori a  $1500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Questo risultato è concorde con quanto visto in altre microalghe del genere *Picochlorum*, in cui colture poste a intensità di  $900 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  presentano un tasso di divisione cellulare maggiore rispetto a intensità minori [114]. Inoltre, questo genere di microalga mantiene un elevato tasso di divisione cellulare e resistenza a intensità di luce che arrivano fino a  $2000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , che in altri generi microalgali come *Chlorella* spp. e *Tetraselmis* spp., danno vita a fenomeni di foto-inibizione [115].

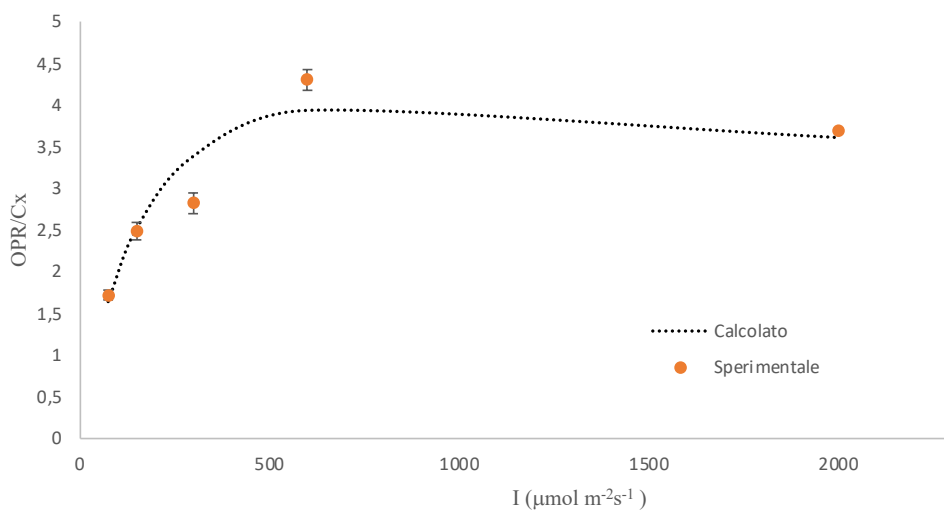


Figura 3.1: Fitting del modello cinetico a partire dai dati sperimentali (cerchi in arancione) di produzione di ossigeno normalizzato sulla concentrazione di

biomassa ( $OPR/C_X$ ) a diverse intensità di luce. La linea punteggiata rappresenta la curva di Haldane calcolata a partire dai parametri fittati con il solver di Excel.

Dall'andamento cinetico ottenuto, sono stati fittati i parametri cinetici di crescita specifici. Specificamente, i parametri stimati sono la costante di inibizione relativa alla luce ( $K_i$ ) equivalente a  $131,26 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e l'intensità di luce ottimale ( $I_{OPT}$ ), stimata a  $864,72 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Da quest'ultimo parametro, in particolare, si è in grado di capire quali siano le condizioni di luce ottimali che possono portare la specie a crescere con maggiore velocità. Come possiamo vedere questa microalga presenta una tolleranza a intensità di luce molto alte, che rispecchia le caratteristiche del genere *Picochlorum* che si riscontrano in letteratura [116].

### **3.2 Esperimenti in continuo**

A seguito degli esperimenti di foto-respirometria, che ci hanno permesso di stimare i parametri cinetici più importanti relativi alla luce, *P. renovo* è stato successivamente coltivato in fotobioreattori operati in continuo. In particolare, questa campagna sperimentale è stata volta all'investigazione dell'effetto delle diverse variabili operative, come il tempo di permanenza, l'intensità di luce e lo spessore del fotobioreattore, sulla produttività e sulla efficienza fotosintetica della biomassa, così come sulla composizione macromolecolare della stessa.

#### **3.2.1 Effetto del tempo di permanenza**

È stato investigato l'effetto del tempo di permanenza sulle performance di crescita di *P. renovo*. Questa è stata valutata a due diverse intensità luminose ( $300$  e  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) in due fotobioreattori operati in continuo con differente configurazione: in *flat panel* operati come chemostat e in *internally illuminated PBRs* operati in modalità turbidostat. Per dettagli circa le specifiche tecniche di questi due sistemi si rimanda al paragrafo 2.2.1.

La scelta delle due differenti intensità di luce è stata fatta *ad-hoc* per valutare l'effetto di questa variabile operativa sulla cinetica di crescita di *P. renovo* [4].

### 3.2.1.1 Effetto del tempo di permanenza in turbidostat

Nelle tabelle 3.1 e 3.2 sono riassunti dati relativi alla concentrazione di biomassa e alla produttività volumetrica e areale al variare del tempo di permanenza ( $\tau$ ) nel sistema in turbidostat a 300 e 800  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . In particolare, il tempo di permanenza è stato misurato a posteriori dal volume in uscita dal fotobioreattore e correlato ai diversi set di torbidità impostati manualmente (colonna 1 in tabella 3.1 e 3.2).

OD-Stat	Concentrazione (g L <sup>-1</sup> )	Produttività Volumetrica (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Produttività Areale (g m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> )	$\tau$ (d)
1,5	0,55 ( $\pm 0,05$ )	0,55 ( $\pm 0,05$ )	27,25 (0,20)	1 ( $\pm 0,026$ )
3	0,81 ( $\pm 0,09$ )	0,36 ( $\pm 0,09$ )	17,93 ( $\pm 0,32$ )	2,25 ( $\pm 0,1$ )
4,5	1,23 ( $\pm 0,08$ )	0,27 ( $\pm 0,08$ )	13,61 ( $\pm 0,31$ )	4,75 ( $\pm 0,28$ )
5	1,24 ( $\pm 0,09$ )	0,22 ( $\pm 0,09$ )	10,61 ( $\pm 4,51$ )	5,6 ( $\pm 0,01$ )
6	1,34 ( $\pm 0,05$ )	0,22 ( $\pm 0,05$ )	11,19 (2,57)	6 ( $\pm 0,25$ )

Tabella 3.1: Concentrazione di biomassa (g L<sup>-1</sup>), produttività volumetrica (g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) e areale (g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>) ai diversi set di torbidità (OD-Stat) in turbidostat a 300  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

OD-Stat	Concentrazione (g L <sup>-1</sup> )	Produttività Volumetrica (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Produttività Areale (g m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> )	$\tau$ (d)
1,5	0,57 ( $\pm 0,04$ )	0,89 ( $\pm 0,04$ )	44,27 ( $\pm 0,12$ )	0,64 ( $\pm 0,01$ )
3	0,99 ( $\pm 0,02$ )	0,99 ( $\pm 0,02$ )	49,50 ( $\pm 0,06$ )	1 ( $\pm 0,01$ )
4,5	1,05 ( $\pm 0,07$ )	0,70 ( $\pm 0,07$ )	35,11 ( $\pm 0,24$ )	1,5 ( $\pm 0,01$ )
5	1,2 ( $\pm 0,1$ )	0,27 ( $\pm 0,1$ )	13,33 ( $\pm 5,00$ )	4,36 ( $\pm 0,23$ )
6	1,39 ( $\pm 0,12$ )	0,23 ( $\pm 0,12$ )	11,56 ( $\pm 6,03$ )	5,63 ( $\pm 0,01$ )

Tabella 3.2: Concentrazione di biomassa (g L<sup>-1</sup>) e produttività volumetrica (g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) e areale (g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>) ai diversi set di torbidità (OD-Stat) in turbidostat a 800  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Nel sistema in turbidostat la concentrazione di biomassa a stato stazionario, come atteso, aumenta all'aumentare del tempo di permanenza fino a raggiungere un *plateau* a tempi di residenza maggiori di 4,75 giorni per le intensità di  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e 1,5 giorni per le condizioni testate a  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Tuttavia, sfruttando l'Eq. 2.5, l'andamento della produttività volumetrica segue una tendenza opposta. Il massimo di produttività,  $0,55$  e  $0,99 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ , per le rispettive intensità di luce, si ottiene a valori di OD-Stat più bassi (rispettivamente 1,5 e 3), corrispondente, in entrambi i casi, ad un tempo di permanenza di 1 giorno (Figura 3.2).

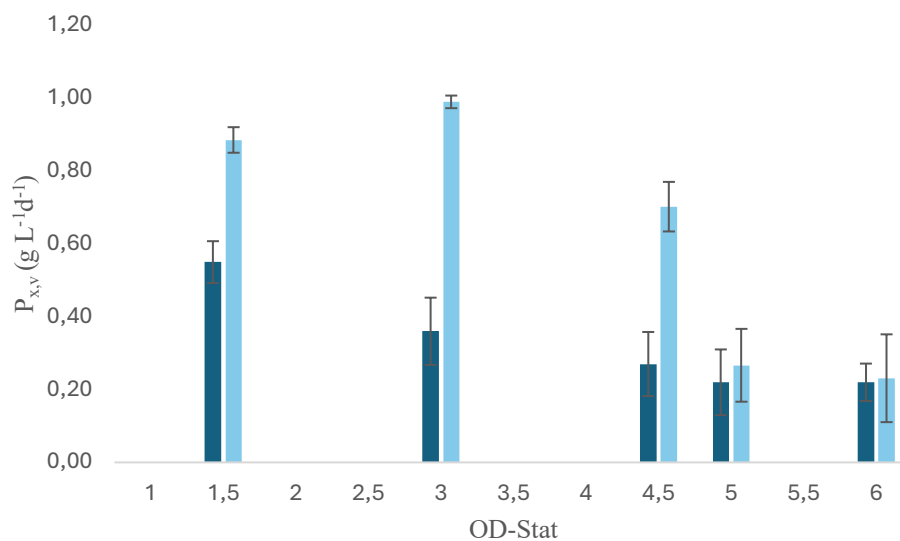


Figura 3.2: Produttività volumetrica ( $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) al variare del tempo di permanenza in turbidostat a  $300$  (barre in blu scuro) e  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (barre in azzurro).

Dal calcolo della produttività areale (Figura 3.3) si può osservare una tendenza simile a quanto già osservato, confermando che le configurazioni più produttive nelle condizioni imposte per le intensità di luce a  $300$  e  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  sono rispettivamente quelle a OD-Stat 1,5 e 3, corrispondente a un tempo di permanenza di 1 giorno.

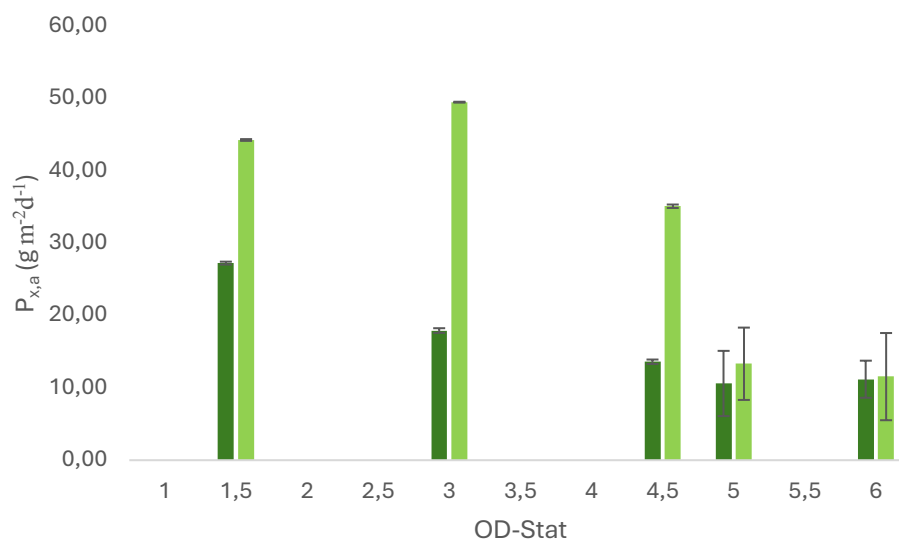


Figura 3.3: Produttività areale ( $\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ) al variare del tempo di permanenza in turbidostat a 300 (barre in verde scuro) e  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (barre in verde chiaro).

Dall'osservazione dei dati è possibile notare che, a parità di OD-Stat che viene impostato dall'operatore al sistema, si ottengono, a seconda dell'intensità di luce, tempi di permanenza diversi. Questi risultati sono congrui con quanto osservato in analisi respirometrica circa la velocità di evoluzione dell'ossigeno (e quindi di crescita della biomassa) al variare della intensità luminosa incidente. Infatti, a 300  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  le cellule hanno bisogno di maggior tempo per dividersi fino a raggiungere il set di torbidità imposto rispetto a intensità maggiori. Per tale motivo, a parità di OD-Stat, il tempo di permanenza è più alto nella condizione in cui la biomassa cresce più lentamente.

### 3.2.1.2 Effetto del tempo di permanenza in chemostat

Lo stesso tipo di campagna sperimentale è stata replicata in fotobioreattori in continuo con differente configurazione (*flat panel*) e operato come un chemostat. Lo scopo di tali esperimenti è quello di confrontare le performance di crescita di *P. renovo* in fotobioreattori chiusi dalla differente configurazione strutturale e di illuminazione.

Si è deciso pertanto di valutare l'effetto del tempo di permanenza alle stesse intensità di luce investigate con il turbidostat, ovvero 300 e 800  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , andando ad ottenere valori di produttività come riportato in Tabella 3.3 e 3.4.

$\tau$ (d)	Concentrazione ( $\text{g L}^{-1}$ )	Produttività Volumetrica ( $\text{g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ )	Produttività Volumetrica ( $\text{g m}^{-2}\text{d}^{-1}$ )
0,75	0,68 ( $\pm 0,05$ )	0,9 ( $\pm 0,05$ )	31,62 ( $\pm 1,86$ )
1	1,09 ( $\pm 0,08$ )	1,09 ( $\pm 0,08$ )	38,15 ( $\pm 2,81$ )
2	1,66 ( $\pm 0,05$ )	0,83 ( $\pm 0,05$ )	29,12 ( $\pm 1,83$ )
3	2,04 ( $\pm 0,19$ )	0,7 ( $\pm 0,19$ )	24,5 ( $\pm 6,55$ )

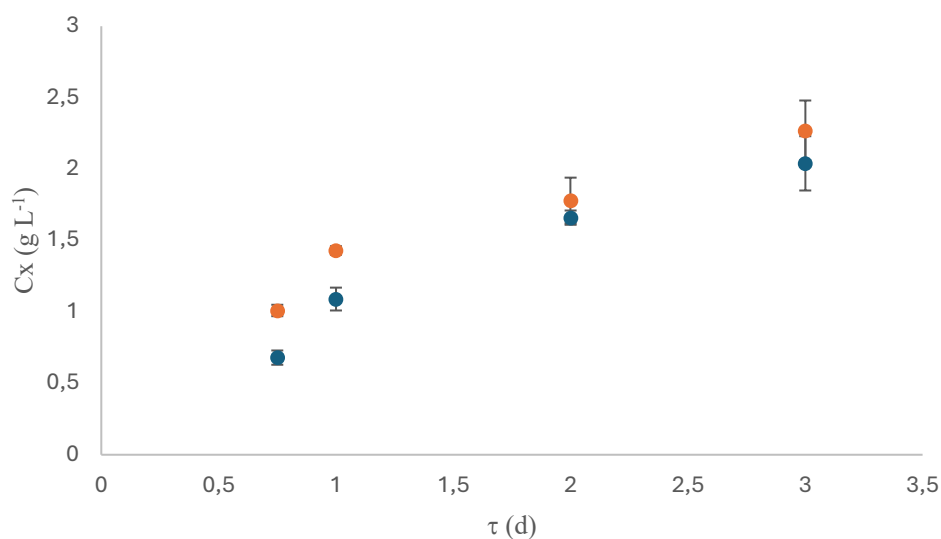
Tabella 3.3: Concentrazione di biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) e produttività volumetrica ( $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) e areale ( $\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ) ai diversi  $\tau$  (d) in chemostat a 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

$\tau$ (d)	Concentrazione ( $\text{g L}^{-1}$ )	Produttività Volumetrica ( $\text{g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ )	Produttività Areale ( $\text{g m}^{-2}\text{d}^{-1}$ )
0,75	1,01 ( $\pm 0,04$ )	1,34 ( $\pm 0,04$ )	47,02 ( $\pm 1,32$ )
1	1,43 ( $\pm 0,03$ )	1,43 ( $\pm 0,03$ )	50,05 ( $\pm 1,05$ )
2	1,78 ( $\pm 0,16$ )	0,85 ( $\pm 0,16$ )	29,88 ( $\pm 5,74$ )
3	2,27 ( $\pm 0,21$ )	0,76 ( $\pm 0,21$ )	26,43 ( $\pm 7,31$ )

Tabella 3.4: Concentrazione di biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) e produttività volumetrica ( $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) e areale ( $\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ) ai diversi  $\tau$  (d) in chemostat a 800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Dai dati sulla concentrazione di biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) a stato stazionario per entrambe le intensità di luce si nota, come atteso, che questa aumenta all'aumentare del tempo di permanenza (Figura 3.4). Infatti, a 300  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  passa da  $0,68 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$  a  $\tau = 0,75 \text{ d}$  fino a  $2,04 \pm 0,19 \text{ g L}^{-1}$  a tempi di residenza maggiori (3 giorni), mentre a 800  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  passa da  $1,01 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$  a  $\tau = 0,75 \text{ d}$  fino a  $2,27 \pm 0,21 \text{ g L}^{-1}$  al tempo di ritenzione idraulica maggiore.





*Figura 3.4: Concentrazione di biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) al variare del tempo di permanenza ( $d$ ) in reattori in continuo chemostat alle intensità di 300 (cerchi in blu) e 800  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (cerchi in arancione).*

Come osservato in turbidostat (paragrafo 3.2.1.1), cambiando il tempo di permanenza si può notare il suo effetto sulla produttività volumetrica, che al diminuire del  $\tau$  aumenta, dato in accordo con Wallace-Springer et al. (2022) [117] che ha messo in luce come l'utilizzo di un tempo di permanenza inferiore permetta un veloce ricambio di mezzo fresco e di nutrienti essenziali che possono essere forniti alla coltura. Essa, di conseguenza, mostra un maggiore tasso di divisione. Notiamo che, per entrambe le intensità di luce testate, la condizione che porta ad una produttività volumetrica maggiore risultino essere quelle a tempi di permanenza di 1 giorno, con valori che si attestano essere  $1,09 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1}$  a 300  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e  $1,43 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$  a 800  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Figura 3.5).

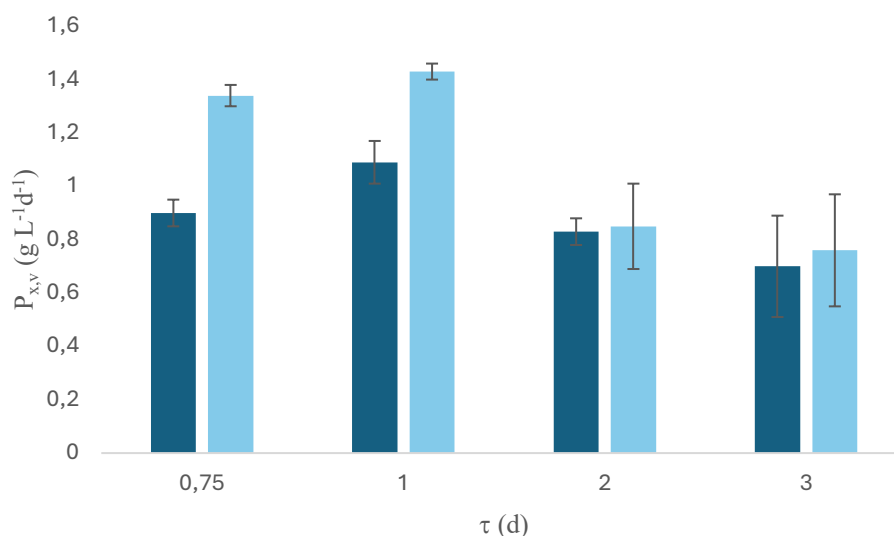


Figura 3.5: Produttività volumetrica ( $g L^{-1} d^{-1}$ ) al variare del tempo di permanenza ( $d$ ) in chemostat alle intensità di  $300$  (barre in blu scuro) e  $800 \mu mol m^{-2} s^{-1}$  (barre in azzurro).

Dall'osservazione dei dati sulla produttività Areale (Figura 3.6) si nota come essa sia influenzata dal tempo di permanenza in modo inversamente proporzionale, arrivando a raggiungere il suo picco, per entrambe le condizioni di luce, al tempo di permanenza di 1 giorno. A  $300 \mu mol m^{-2} s^{-1}$  si ottiene il picco di produttività areale corrispondente a  $38,15 \pm 2,81 g m^{-2} d^{-1}$ , mentre a  $800 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ , in accordo con la maggiore velocità di crescita, a parità di tempo di permanenza, raggiunge valori ben più elevati ( $50,05 \pm 1,05 g m^{-2} d^{-1}$ ).

I valori di produttività areali per *P. renovo* in sistemi chiusi risultano essere maggiori rispetto a quelli che sono stati ottenuti da Dahlin R. et al. (2019) [80]. Nel suo lavoro sperimentale, egli ha ottenuto valori di produttività medie annuali di  $34,3 g m^{-2} d^{-1}$  in reattori open pond simulando condizioni di coltivazione outdoor, dove l'intensità luminosa può raggiungere, nel corso della giornata, valori superiori ai  $2000 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ . Nonostante non siamo a conoscenza di valori di produttività in sistemi chiusi che approssimano quello usato in questo lavoro, possiamo supporre che tale aumento sia perfettamente in linea con le performance di crescita attese per questo *strain* in fotobioreattori più efficienti.

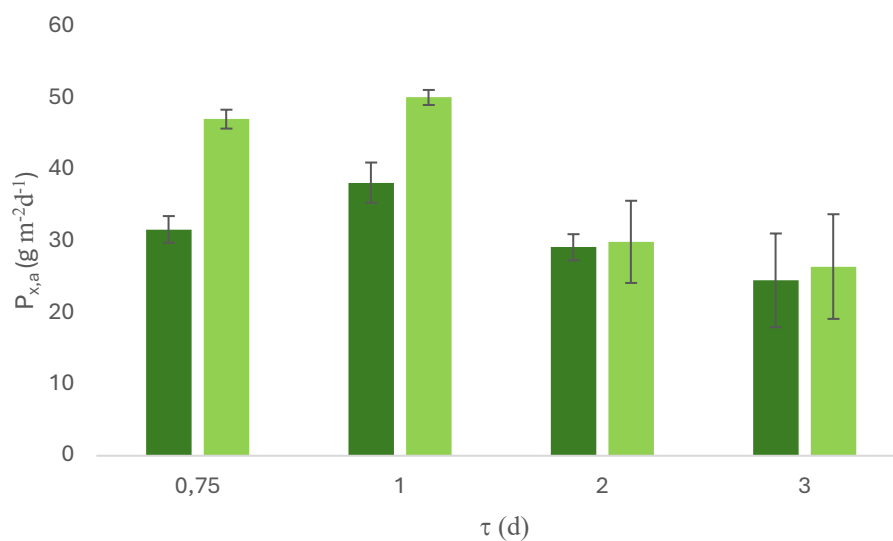


Figura 3.6: Produttività areale ( $\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ) al variare del tempo di permanenza ( $d$ ) in chemostat alle intensità di  $300$  (barre in verde scuro) e  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (barre in verde chiaro).

Osservando i dati relativi alle produttività che *P. renovo* ha all'interno dei due sistemi diversi notiamo come in turbidostat arriviamo a valori di concentrazione che si assestano a  $1,39 \text{ g L}^{-1}$  come valore massimo con un  $\tau = 6 \text{ d}$ , quando si pone la coltura a  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . In chemostat, invece, la coltura, alla stessa intensità di illuminazione, ha raggiunto valori superiori, raggiungendo i  $2,27 \text{ g L}^{-1}$ . È da notare come la modalità in chemostat permetta alla specie di crescere più velocemente e superare i valori di concentrazione del turbidostat dimezzandone il tempo di permanenza. A uguali valori di  $\tau$  il sistema chemostat risulta lo stesso più efficiente poiché a parità di tempo di permanenza si raggiungono concentrazioni maggiori, per entrambe le condizioni a intensità di luce diversa. Dall'osservazione di questi risultati deduciamo che l'efficienza di coltivazione, nel caso specifico di *P. renovo*, sia superiore nel fotobioreattore *flat panel*, al di là dell'intensità luminosa e del tempo di permanenza utilizzato. È probabile che un reattore del tipo *internally illuminated*, a causa della presenza del LED all'interno della coltura stessa generi un ambiente maggiormente stressante per le cellule. Effettivamente, la distribuzione della luce e il calore generato dalla lampada all'interno di un fotobioreattore simile (vedi sezione 2.2.1) sono estremamente eterogenei. Infatti, in posizioni prossimali

al LED l'intensità di luce e il calore percepiti dall'alga risultano maggiori rispetto alle pareti esterne del fotobioreattore [118].

### **3.2.2 Studio della cinetica di mantenimento in *Picochlorum renovo***

Notando la differenza in termini di produttività di biomassa ottenuta nei due diversi sistemi al variare del tempo di permanenza, basandoci sul modello di Bodegom [107], sono stati eseguiti i bilanci di energia di crescita e di mantenimento per la modalità di coltivazione più efficiente, ovvero il chemostat. Tali bilanci sono stati sfruttati per comprendere come *P. renovo* utilizza l'energia luminosa assorbita, attraverso il calcolo della resa apparente di biomassa sulla luce ( $Y_{APP}$ ,  $g_X \text{ mmol}_{\text{fotoni}}^{-1}$ ) e della velocità specifica di mantenimento ( $\mu_e$ ,  $d^{-1}$ ) [104].

#### **3.2.2.1 Cinetica di mantenimento in chemostat**

Ottenuta la concentrazione di biomassa sul  $\tau$ , si è andati a calcolare la resa per mole di fotone che è in grado di utilizzare la cellula nel sistema *flat panel* operato come un chemostat (Figura 3.7). Si nota che a  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  la resa apparente massima raggiunta si avvicina molto a quella calcolata per altri strain microalgali come *N. salina*, la cui resa apparente massima a intensità di  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  è pari a circa  $1,25 g_X \text{ mol}_{\text{fotoni}}^{-1}$  [119].

Invece, nelle condizioni a energia più elevate, ovvero a  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , le cellule non sono in grado di sfruttare al meglio l'energia fornitagli. È plausibile che intensità così alte portino all'attivazione dei meccanismi di fotoprotezione con una influenza negativa, dunque, sulla resa apparente [9].

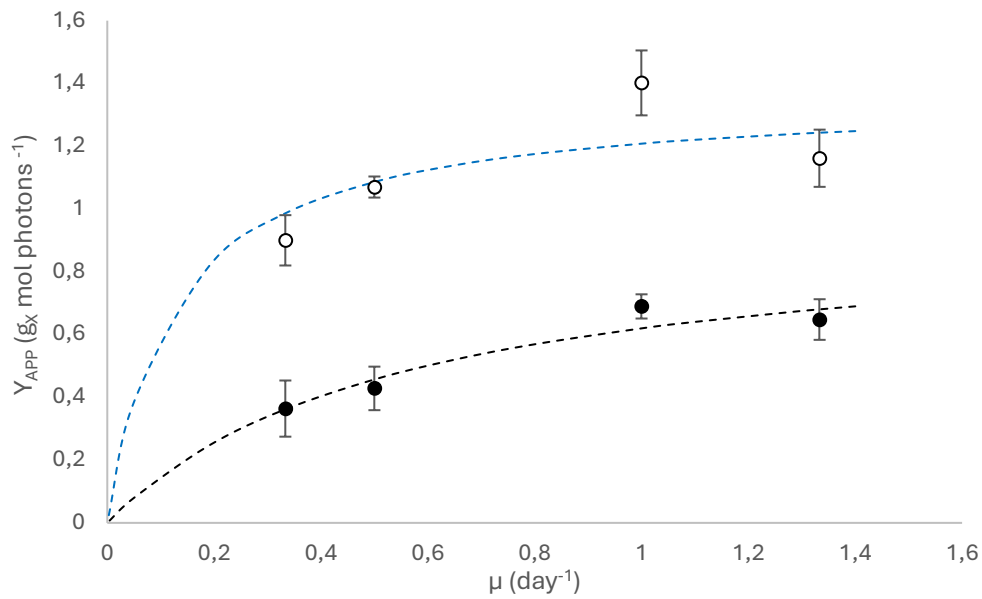


Figura 3.7: resa apparente ( $g_x \text{ mmol photons}^{-1}$ ) in funzione della velocità di crescita ( $d^{-1}$ ) in reattori chemostat a 300 (cerchi vuoti) e 800  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (cerchi pieni) con relative rese calcolate a 300 (linea tratteggiata azzurra) e 800  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (linea tratteggiata nera).

Tale risultato è confermato dal calcolo della velocità specifica di mantenimento (Figura 3.8): a parità di velocità di crescita apparente, a intensità luminose più basse il contributo di energia investito nel mantenimento è decisamente minore che a 800  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Questa strategia che utilizzano le microalghe per la protezione dei propri fotosistemi da intensità troppo saturanti è descritta anche nel lavoro di Baobei Wang et al. (2020) [120], su *N. oceanica*, in cui a intensità troppo elevate la microalga è in grado di attivare meccanismi di dissipazione dell'energia a discapito della resa per minimizzare il danno foto-ossidativo.

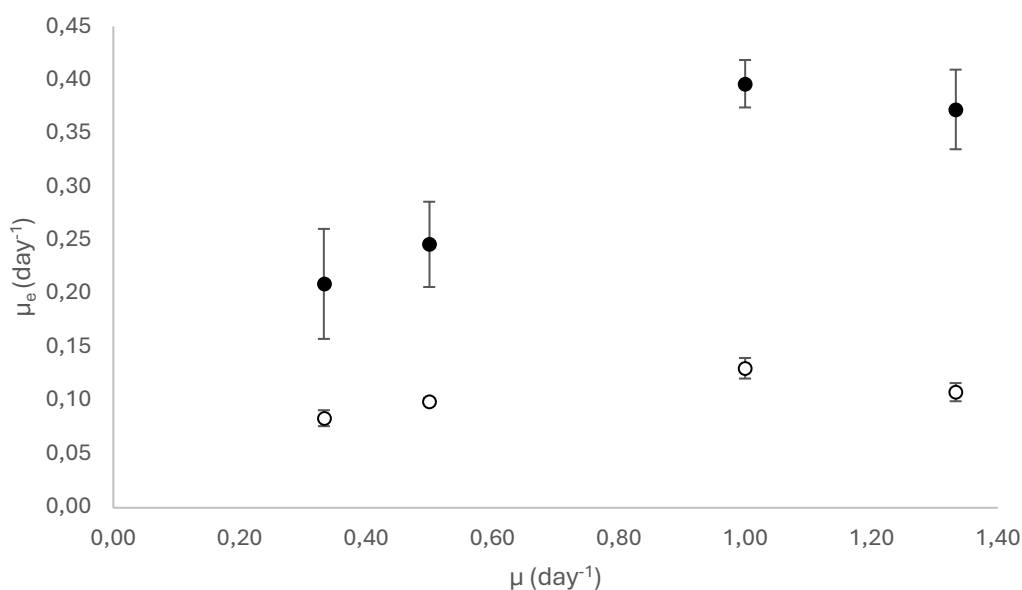


Figura 3.8: Velocità specifica di mantenimento ( $d^{-1}$ ) in funzione della velocità di crescita apparente ( $d^{-1}$ ) in reattori chemostat a 300 (cerchi vuoti) e 800  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (cerchi pieni).

### 3.2.3 Effetto dell'intensità di luce

Attraverso l'uso di fotobioreattori chemostat di spessore 3,5 cm si è valutato l'effetto della diversa intensità di luce sulla concentrazione di *P. renovo*, a tempo di permanenza di 1 giorno. Da questi valori, successivamente, sono state calcolate le produttività volumetriche ed areali. I risultati ottenuti sono stati riassunti nella Tabella 3.5.

Intensità di luce ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	Concentrazione ( $\text{g L}^{-1}$ )	Produttività Volumetrica ( $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ )	Produttività Areale ( $\text{g m}^{-2}\text{d}^{-1}$ )
150	0,85 ( $\pm 0,1$ )	0,85 ( $\pm 0,1$ )	29,75 ( $\pm 3,78$ )
300	1,09 ( $\pm 0,08$ )	1,09 ( $\pm 0,08$ )	38,15 ( $\pm 2,81$ )
600	1,26 ( $\pm 0,12$ )	1,26 ( $\pm 0,12$ )	44,19 ( $\pm 4,26$ )
800	1,43 ( $\pm 0,03$ )	1,43 ( $\pm 0,03$ )	50,05 ( $\pm 1,05$ )

Tabella 3.5: Concentrazione di biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ), produttività volumetrica ( $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) e areale ( $\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ) al variare dell'intensità di luce ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) in reattori chemostat di spessore 3,5 cm.

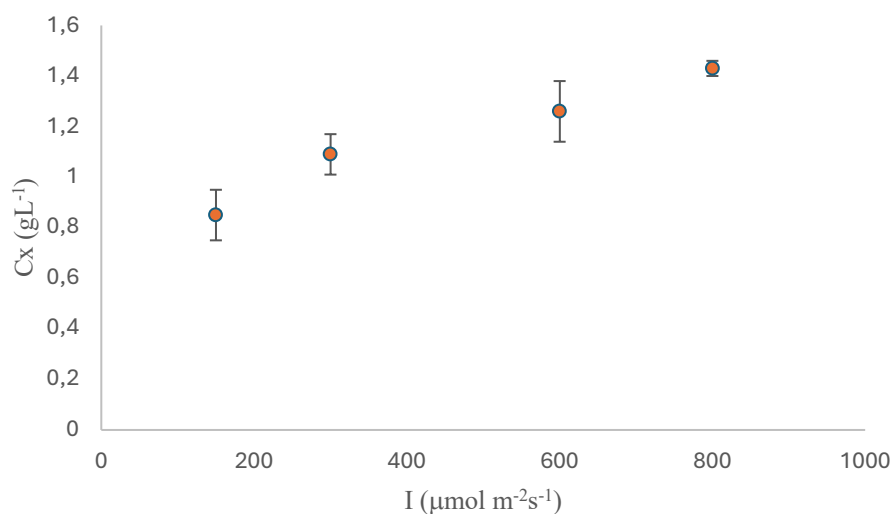


Figura 3.9: Concentrazione di biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) in funzione del variare dell'intensità di luce ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) fornita alla coltura.

Nella Figura 3.9 è riportato l'andamento della concentrazione di biomassa all'aumentare dell'intensità luminosa incidente. Si può osservare come all'aumentare di questa variabile vi sia un conseguente aumento della concentrazione di biomassa in uscita dal fotobioreattore. Difatti, a intensità minori, ovvero  $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , si ha il valore di concentrazione minore, ovvero  $0,85 \text{ g L}^{-1}$ . Invece a  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  si ha il picco di concentrazione di biomassa, ovvero  $1,43 \text{ g L}^{-1}$ .

La luce sembra avere un effetto diretto sulla concentrazione della biomassa di *P. renovo*, poiché permetterebbe di stimolare maggiormente il metabolismo fotoautotrofo della cellula. La maggior parte delle microalghe coltivate a differenti intensità di luce presenta una velocità di crescita maggiore all'aumentare dell'intensità di luce con cui si irradia la coltura. Ad esempio, studi sulla microalga *S. platensis* hanno evidenziato l'effetto che la luce ha sulla concentrazione cellulare [121]. Possiamo constatare, pertanto, che entro range di intensità che non creino foto-danno, l'aumentare dell'intensità luminosa aumenta la concentrazione di biomassa.

Dai dati della produttività areale, riportati nella Figura 3.10, si nota come questa aumenti sino ad un massimo di  $50,05 \pm 1,05 \text{ g m}^{-2}\text{d}^{-1}$  a  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Nonostante l'elevata concentrazione in uscita (e, di conseguenza produttività) è da riscontrare che il forte irraggiamento della coltura ha delle conseguenze negative sull'efficienza dell'intero processo. Infatti, a 600 e 800  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  solo il  $7,38 \pm 2,85\%$  e il  $6,28 \pm 0,7\%$  rispettivamente della massima frazione dello spettro di luce PAR viene convertito in biomassa. L'assenza di significativa differenza tra questi due valori indica che, in tutta probabilità, a intensità saturanti (800  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) buona parte dell'energia assorbita in più viene sfruttata per il mantenimento cellulare, poiché a questa non corrisponde una concentrazione di biomassa significativamente maggiore.

Notiamo invece che a intensità minori l'efficienza viene raddoppiata e triplicata nel caso rispettivo di 300 e 150  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  rispetto alle condizioni discusse sopra. Infatti, in quest'ultimo caso l'efficienza fotosintetica si attesta al  $19,91 \pm 2,53\%$  dello spettro PAR. Questo dato, che mette in luce l'efficienza di *P. renovo* nello sfruttare l'energia luminosa a basse intensità, mantenendo concentrazioni comunque elevate rispetto ad altre specie di interesse industriale come *S. platensis* [121] o *C. vulgaris*, rispettivamente 0,7 e 0,384  $\text{g L}^{-1}$  [122], giustifica le elevate performance di crescita di questa specie a basse intensità di luce.

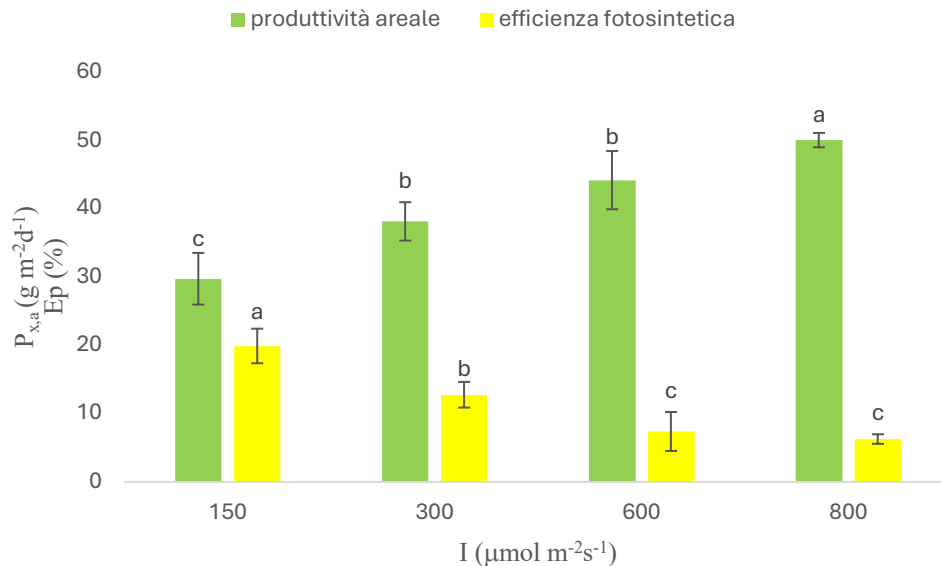


Figura 3.10: Produttività areale ( $\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ) ed efficienza fotosintetica (%) al variare dell'intensità di luce ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) in chemostat.



### 3.2.4 Effetto dello spessore

Dato che questa specie sembra essere molto efficiente anche in sistemi aperti, come gli *open pond*, con produttività areali che si aggirano sui di  $34 \text{ g m}^{-2}\text{d}^{-1}$  [73] e dato che la sua efficienza fotosintetica risulta particolarmente elevata quando irradiata a basse intensità luminose, lo studio delle performance di crescita di *P. renovo* variando lo spessore di coltivazione risulta utile per investigarne i meccanismi di acclimatazione alla luce e l'adattamento a condizioni di oscillazione della sua intensità.

#### 3.2.4.1 Effetto dello spessore a $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

Ponendo la coltura alle intensità di  $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  si è andato ad indagare l'effetto dello spessore (W) di fotobioreattori con configurazione *flat-panel* sulla concentrazione di biomassa e, dunque, sulla sua produttività ed efficienza (Tabella 3.6).

Spessore (cm.)	Concentrazione ( $\text{g L}^{-1}$ )	Produttività Volumetrica ( $\text{g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ )	Produttività Areale ( $\text{g m}^{-2}\text{d}^{-1}$ )	Efficienza Fotosintetica (%)
3,5	0,85 ( $\pm 0,1$ )	0,85 ( $\pm 0,1$ )	29,75 ( $\pm 3,78$ )	19,91 ( $\pm 2,53$ )
7,5	0,33 ( $\pm 0,02$ )	0,33 ( $\pm 0,02$ )	24,50 ( $\pm 1,73$ )	16,42 ( $\pm 1,23$ )
15	0,17 ( $\pm 0,01$ )	0,17 ( $\pm 0,01$ )	25,00 ( $\pm 2,05$ )	15,62 ( $\pm 1,28$ )

Tabella 3.6: Concentrazione di biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ), produttività volumetrica ( $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ), areale ( $\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ) ed efficienza fotosintetica (%) ai diversi spessori (cm) all'intensità di  $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Notiamo immediatamente che all'aumentare dello spessore otteniamo concentrazioni di biomassa inferiori (rispettivamente da  $0,85 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$  fino a  $0,17 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ ) poiché l'aumento della profondità del sistema, a parità di superficie, porta a una diminuzione della luce media interna. Però, la produttività areale e l'efficienza fotosintetica rimangono statisticamente costanti, attestandosi intorno a  $24 \text{ g m}^{-2}\text{d}^{-1}$  e a 15 %, rispettivamente.

Questo è un dato che si discosta da quelli che si riscontrano in letteratura in cui all'aumentare dello spessore, in un sistema di coltivazione chiuso, la produttività cala a causa del fenomeno del “*self-shading effect*” [123]. Di solito le microalghe, poste in un sistema di coltivazione a spessore elevato, nonostante un mescolamento ideale, non percepiscono la stessa intensità di luce lungo il profilo dello spessore del fotobioreattore ( $z$ ) rispetto alla direzione della fonte luminosa. A causare questo effetto è il fatto che le cellule che si trovano più vicine alla fonte luminosa creano delle zone d'ombra (dette *dark zones*) alle cellule più lontane, inficiando sulla loro efficienza fotosintetica, poiché raggiunte da un minor numero di fotoni [124]. Questo effetto è tanto più marcato quanto maggiore è lo spessore del fotobioreattore, poiché l'intensità luminosa decresce in maniera esponenziale lungo lo stesso. Per esempio, nei sistemi aperti lo *shading effect* è un fenomeno che si cerca di minimizzare andando a creare un design dell'impianto di coltivazione che presenti uno spessore non troppo elevato, che porterebbe il sistema a essere improduttivo. Diversi studi hanno cercato di ottimizzare fotobioreattori per minimizzare questo fenomeno e portare ad una massimizzazione della produttività, a discapito del volume del reattore [125].

Come visibile in Figura 3.11, nel caso di *P. renovo* l'aumento dello spessore sembra non corrispondere ad una diminuzione della produttività areale e dell'efficienza fotosintetica. Infatti, quando lo spessore aumenta di 4 volte (da 3,5 cm a 15 cm), l'efficienza fotosintetica non diminuisce in modo significativo. Un risultato simile è stato ottenuto nel caso della produttività areale, che passa da circa  $30 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  a  $25 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ .

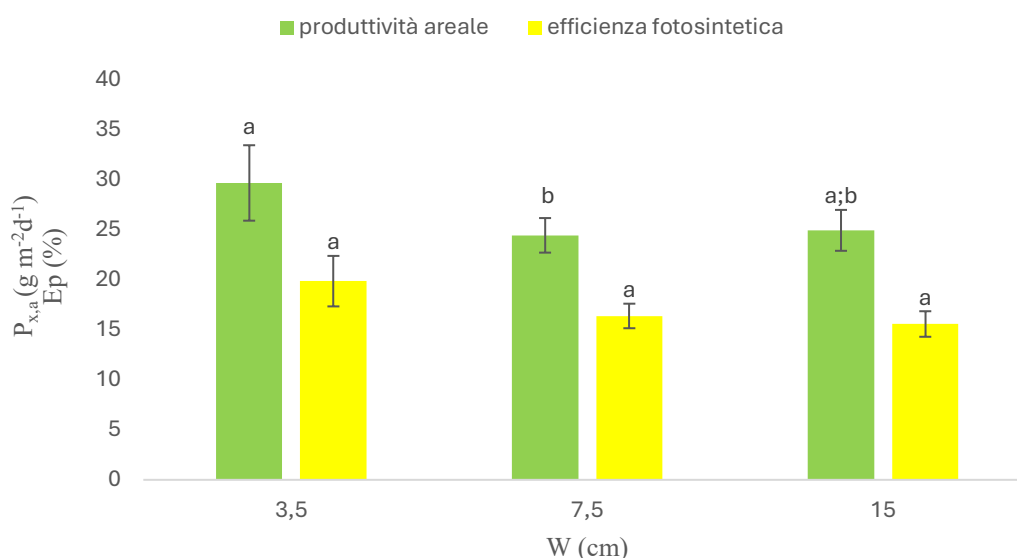


Figura 3.11: Produttività areale ( $\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ) ed efficienza fotosintetica (%) al variare dello spessore in chemostat all'intensità di  $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

### 3.2.4.2 Effetto dello spessore a $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

Si sono ottenuti i seguenti risultati ponendo la coltura a diversi spessori con un'intensità luminosa di  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Tabella 3.7):

Spessore (cm)	Concentrazione ( $\text{g L}^{-1}$ )	Produttività Volumetrica ( $\text{g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ )	Produttività Areale ( $\text{g m}^{-2}\text{d}^{-1}$ )	Efficienza Fotosintetica (%)
1,5	0,91 ( $\pm 0,11$ )	0,91 ( $\pm 0,11$ )	13,58 ( $\pm 0,17$ )	4,34 ( $\pm 0,5$ )
3,5	1,09 ( $\pm 0,08$ )	1,09 ( $\pm 0,08$ )	38,15 ( $\pm 0,28$ )	12,77 ( $\pm 0,94$ )
7,5	0,55 ( $\pm 0,05$ )	0,55 ( $\pm 0,05$ )	41,25 ( $\pm 0,43$ )	14,70 ( $\pm 1,54$ )
15	0,27 ( $\pm 0,07$ )	0,27 ( $\pm 0,07$ )	40,50 ( $\pm 2,12$ )	14,80 ( $\pm 0,66$ )

Tabella 3.7: Concentrazione di biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ), produttività volumetrica ( $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ), areale ( $\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ) ed efficienza fotosintetica (%) ai diversi spessori (cm) all'intensità di  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Da una prima analisi dei dati risulta evidente che, come nel paragrafo 3.2.4.1, all'aumentare dello spessore la produttività areale e l'efficienza fotosintetica non

subiscano un cambiamento statisticamente significativo, con valori che risultano maggiori di  $38 \text{ g m}^{-2}\text{d}^{-1}$  ed efficienze maggiori del 12 %.

L'unica condizione che registra una diminuzione di tali parametri è quella a spessore minore (1,5 cm). La bassa efficienza di conversione dell'energia luminosa di questo sistema sembra suggerire che le cellule siano stressate dalla scarsa diluizione della luce all'interno del fotobioreattore.

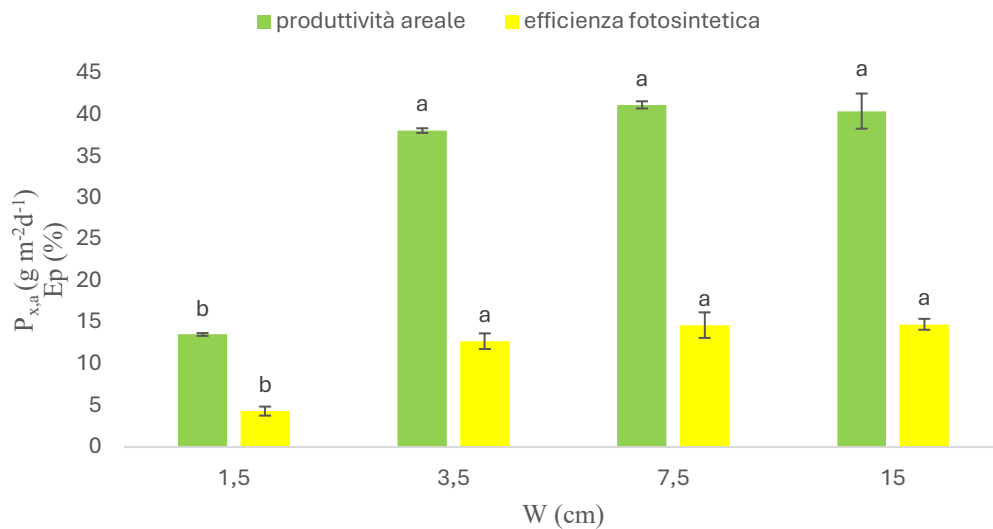


Figura 3.12: Produttività areale ( $\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ) ed efficienza fotosintetica (%) al variare dello spessore in chemostat all'intensità di  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

### 3.2.4.3 Effetto dell'intensità di luce sullo spessore a 15 cm

Vedendo le promettenti capacità di crescita che *P. renovo* è in grado di avere all'interno di reattori a spessore elevato, si è studiato l'effetto di alte intensità luminose ( $600$  e  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) mantenendo invariato lo spessore del fotobioreattore (15 cm), ottenendo i seguenti bilanci di massa (Tabella 3.8):

Intensità di luce ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	Concentrazione ( $\text{g L}^{-1}$ )	Produttività Volumetrica ( $\text{g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ )	Produttività Areale ( $\text{g m}^{-2}\text{d}^{-1}$ )	Efficienza Fotosintetica (%)
150	0,17 ( $\pm 0,01$ )	0,17 ( $\pm 0,01$ )	25,00 (2,05)	15,62 ( $\pm 1,28$ )
300	0,27 ( $\pm 0,07$ )	0,27 ( $\pm 0,07$ )	40,50 ( $\pm 2,12$ )	14,80 ( $\pm 0,66$ )

600	0,29 ( $\pm 0,03$ )	0,29 ( $\pm 0,03$ )	42,6 ( $\pm 3,76$ )	6,68 ( $\pm 0,59$ )
800	0,33 ( $\pm 0,02$ )	0,33 ( $\pm 0,02$ )	49,2 ( $\pm 3,42$ )	5,78 ( $\pm 0,40$ )

Tabella 3.8: Concentrazione di biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ), produttività volumetrica ( $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ), areale ( $\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ) ed efficienza fotosintetica (%) ai diversi spessori (cm) nelle condizioni a spessore 15 cm al variare dell'intensità di luce.

Si può notare come all'aumentare dell'intensità di luce con la quale si irradia il reattore abbiamo un incremento della concentrazione di biomassa che da  $0,17 \text{ g L}^{-1}$  che si ottengono a  $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  raddoppia nella condizione a luce più alta ( $0,33 \text{ g L}^{-1}$ ) (Figura 3.13). Questo aumento della concentrazione della biomassa è un dato in accordo con quanto riscontrato anche nel paragrafo 3.2.3.

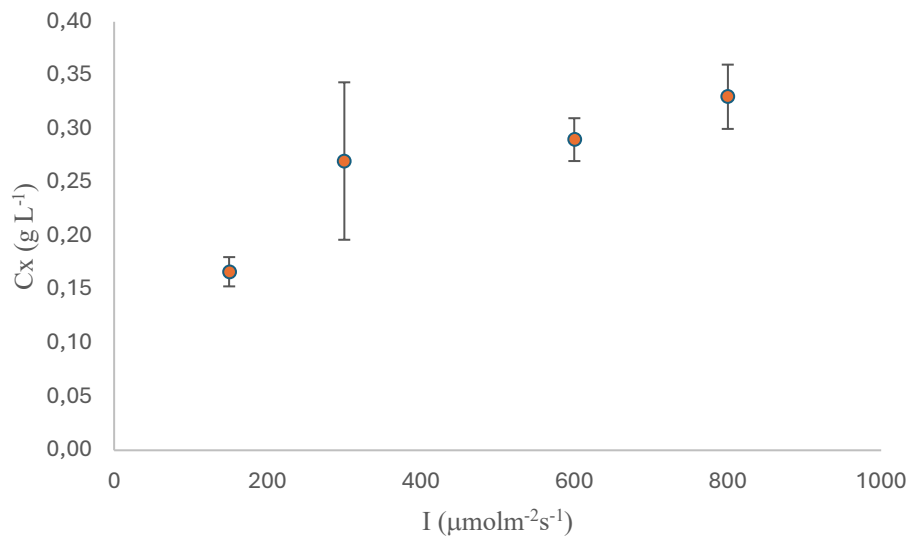


Figura 3.13: Concentrazione di biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) in funzione del variare dell'intensità di luce ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) fornita alla coltura in reattori a 15 cm di spessore.

All'interno di sistemi chiusi notiamo come questa microalga sia in grado di aumentare la sua produttività areale in funzione dell'intensità di luce, arrivando a raggiungere valori di  $49,2 \text{ g m}^{-2}\text{d}^{-1}$  (Figura 3.14). L'aumento della biomassa in funzione dell'intensità di luce per il genere *Picochlorum* è da riscontrarsi anche in diversi studi che hanno notato l'aumento della concentrazione della biomassa quando la coltura subiva diverse intensità di luce durante le fasi della giornata e

delle stagioni [114], andando ad avere un impatto sulla velocità di crescita delle cellule. L'andamento dell'efficienza fotosintetica, come atteso, segue un trend opposto. Infatti, ad alte intensità di luce, l'efficienza cala, assestandosi ad un valore medio del 6%, come rappresentato dall'analisi statistica eseguita per i valori a 600 e 800  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Figura 3.14). Questo calo dell'efficienza indica che ad alte intensità di luce, nonostante le cellule proliferino più velocemente, non si ha una conversione dell'energia in biomassa data dallo sfruttamento della regione PAR efficace, come invece accade quando si pone la coltura a intensità di luce inferiori, in cui si raggiungono efficienze del 15%. Questo potrebbe essere giustificato dal fatto che alte irradiazioni portino all'attivazione dei sistemi di protezione della cellula con conseguente dissipamento dell'energia in eccesso per ovviare al danno foto ossidativo.

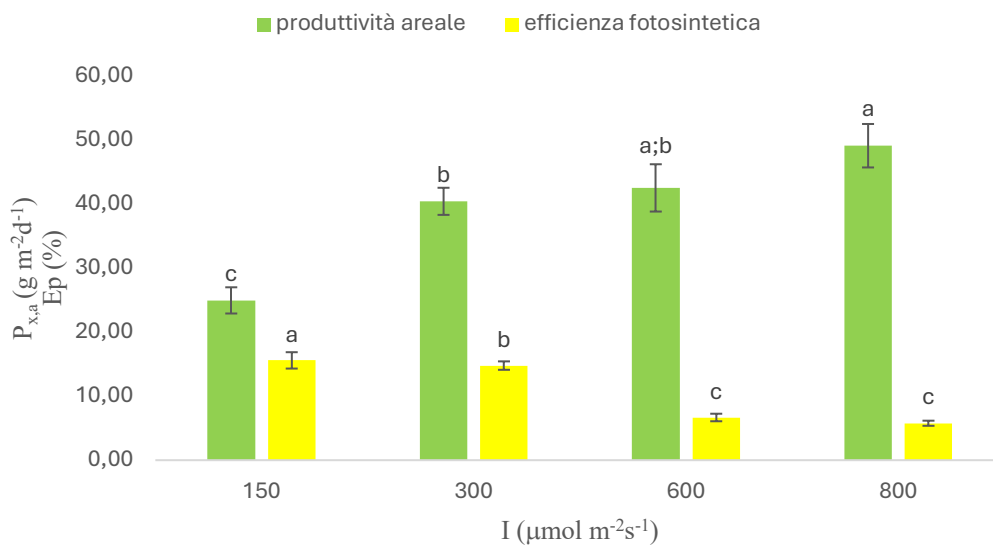


Figura 3.14: Produttività areale ( $\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ) ed efficienza fotosintetica (%) al variare dell'intensità di luce nello spessore 15 cm.

#### 3.2.4.4 Effetto dello spessore di fotobioreattori in serie sulla concentrazione della biomassa

Notando la grande capacità adattativa di *P. renovo* a sistemi ad elevato spessore si è deciso di validare tale capacità mediante l'allestimento di un set up operativo

composto di 3 fotobioreattori posti a  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  di 7,5 cm in serie di modo da verificar come varia la produttività nelle varie regioni del sistema.

Si sono ottenuti i seguenti bilanci di massa (Tabella 3.9):

Reattore	Concentrazione (g L <sup>-1</sup> )	Produttività Volumetrica (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Produttività Areale (g m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> )	Efficienza fotosintetica ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )
1 + 2	0,39 ( $\pm 0,11$ )	0,39 ( $\pm 9,32$ )	29,13 ( $\pm 9,32$ )	23,94 ( $\pm 5,54$ )
1 + 2 + 3	0,33 ( $\pm 0,15$ )	0,33 ( $\pm 0,15$ )	34,98 ( $\pm 13,73$ )	8,79 ( $\pm 4,14$ )

*Tabella 3.9: Concentrazione di biomassa (g L<sup>-1</sup>), produttività volumetrica (g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), areale (g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>) ed efficienza fotosintetica (%) ai diversi sistemi di spessore (cm) all'intensità di  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .*

Facendo il confronto delle produttività dei primi due reattori in serie (Reattore 1 e 2), la cui media delle concentrazioni è  $0,39 \pm 0,11 \text{ g L}^{-1}$ , con il reattore di spessore 15 cm a  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , i cui bilanci di massa sono esposti nel paragrafo 3.2.4.2, notiamo che le concentrazioni, considerato l'errore, si possono considerare statisticamente uguali, rispettivamente  $0,39 \pm 0,11 \text{ g L}^{-1}$  in confronto a  $0,27 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$ . Utilizzando questi dati per il calcolo della produttività areale e per l'efficienza fotosintetica, i cui rispettivi valori sono di  $29,13 \pm 9,32 \text{ g m}^{-2}\text{d}^{-1}$  e  $23,94 \pm 5,54\%$ , notiamo che possiamo considerare questi valori molto simili a quelli del fotobioreattore a 15 cm posto alla medesima intensità di luce, i cui dati sono rispettivamente  $40,50 \pm 2,12 \text{ g m}^{-2}\text{d}^{-1}$  e  $14,80 \pm 0,66\%$ . Questo mette in luce il fatto che, nonostante i due sistemi presentino regionalmente concentrazioni diverse, comunque nel considerare questi come un unico sistema il comportamento è simile a quello di un sistema dello stesso spessore ma non diviso localmente. Ponendo a confronto il sistema nel suo insieme (Reattore 1 + 2 + 3) con i valori del Reattore 1 + 2 e con quelli del reattore 15 cm nel paragrafo 3.2.4.2, notiamo che, statisticamente parlando, i valori di produttività ed efficienza fotosintetica si eguagliano nonostante si sono raggiunti i 22 cm di spessore. Ciò mette in luce l'elevata versatilità con cui *P. renovo* è in grado di adattarsi a sistemi ad elevato spessore mantenendo produttività ed efficienze inalterate. Questa caratteristica

permetterebbe il design di fotobioreattori che possono aumentare i propri volumi di produzione mantenendo comunque inalterate le loro produttività.

### 3.2.5 Effetto della luce rosso blu

Dalla letteratura si evince che le microalghe riescono a portare il loro apparato fotosintetico ad un'efficienza maggiore quando le si irradia con uno spettro rosso-blu [98]. Ciò può destare un significativo interesse per una possibile applicazione di *P. renovo* in coltivazioni con luci artificiali che, al posto di utilizzare un LED in luce bianca continuo, può sfruttare un LED in luce rosso-blu. Queste sono le lunghezze d'onda alle quali l'apparato fotosintetico è più efficiente, a cui ne consegue un minor dispendio energetico di illuminazione [126].

#### 3.2.5.1 Effetto della luce continua rosso-blu

Mediante lo studio della condizione a luce rosso-blu in continuo si sono ottenuti i seguenti bilanci di massa (Tabella 3.10):

Spessore (cm)	Concentrazione (g L <sup>-1</sup> )	Produttività Volumetrica (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Produttività Areale (g m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> )	Efficienza Fotosintetica (%)
15	0,29 (±0,01)	0,29 (±0,01)	43,5 (±1,22)	14,03 (±0,4)

Tabella 3.10: Concentrazione di biomassa (g L<sup>-1</sup>), produttività volumetrica (g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), areale (g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>) ed efficienza fotosintetica (%) in luce continua rosso-blu a 300 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>

Osserviamo che ad un'intensità di 300 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, con una luce continua rosso blu, la cui energia fornita dalla lampada, che si compone di un contributo del 20% blu e dell'80% rosso, è di 198,4 KJ mol<sup>-1</sup>, si ha un incremento della produttività e dell'efficienza fotosintetica, rispettivamente 43,5 ± 1,22 g m<sup>-2</sup>d<sup>-1</sup> e 14,03 ± 0,4 %, rispetto alla stessa condizione, indagata nel paragrafo 3.2.4.2, che invece irradiava la coltura con una luce LED bianca continua, la cui energia fornita dalla lampada è di 204,9 KJ mol<sup>-1</sup>. L'utilizzo di una luce rosso-blu (bi-cromatica) ha apportato un incremento della concentrazione della biomassa microalgale all'interno di un



reattore a spessore 15 cm, confermando il fatto che l'impiego di uno spettro diverso, rispetto a un LED bianco, consente un efficientamento dell'apparato fotosintetico. Ciò è plausibilmente attribuibile all'assenza, nello spettro di questo LED bicromatico, di lunghezze d'onda usualmente riflesse (giallo-verde), la cui energia, pertanto, risulta dissipata nell'economia dell'intero processo [118, 127]. Inoltre, la luce rosso-blu, oltre ad essere piccata sul massimo di assorbimento della clorofilla (ed in parte dei carotenoidi), secondo alcuni studi consente di ridurre lo stress-ossidativo esercitato sui fotosistemi.

### 3.2.6 Caratterizzazione della biomassa microalgale

Le variabili operative testate negli esperimenti in continuo hanno un effetto non solo sulla concentrazione di biomassa ma anche sul profilo macromolecolare della stessa. È stato dunque necessario indagare come la composizione della biomassa cambia al variare delle variabili operative già discusse. A tal scopo, in tutte le condizioni testate in continuo, è stata quantificata la concentrazione e la resa di carboidrati, proteine e pigmenti fotosintetici (clorofilla-*a* e carotenoidi).

#### 3.2.6.1 Effetto del tempo di permanenza sulla composizione della biomassa

Per quanto riguarda la caratterizzazione della biomassa ai diversi tempi di permanenza alle intensità di 300 e 800  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  si sono ottenuti i seguenti valori di resa in biomassa (Tabella 3.11 e 3.12):

$\tau$ (d)	Carboidrati (%)	Proteine (%)	Clorofille ( $\text{mg g}^{-1}$ )	Carotenoidi ( $\text{mg g}^{-1}$ )
0,75	32,06 ( $\pm 2,37$ )	35,52 ( $\pm 3,85$ )	11,97 ( $\pm 4,78$ )	4,45 ( $\pm 1,66$ )
1	39,6 ( $\pm 1,9$ )	38,5 ( $\pm 3,43$ )	18,72 ( $\pm 1,51$ )	5,73 ( $\pm 0,45$ )
2	37,2 ( $\pm 6,53$ )	41,52 ( $\pm 7,07$ )	21,73 ( $\pm 2,06$ )	8,36 ( $\pm 0,63$ )
3	54,6 ( $\pm 2,9$ )	34,09 ( $\pm 4,81$ )	9,2 ( $\pm 2,28$ )	4,76 ( $\pm 1,12$ )

Tabella 3.11: Rese di carboidrati (%), proteine (%), clorofille ( $\text{mg g}^{-1}$ ) e carotenoidi ( $\text{mg g}^{-1}$ ) ai diversi valori di  $\tau$  (d) all'intensità di 300  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

$\tau$	Carboidrati	Proteine	Clorofille	Carotenoidi
(d)	(%)	(%)	(mg g <sup>-1</sup> )	(mg g <sup>-1</sup> )
0,75	25,79 ( $\pm 2,4$ )	36,03 ( $\pm 3,69$ )	10,00 ( $\pm 3,79$ )	3,64 ( $\pm 1,21$ )
1	24,19 ( $\pm 1,21$ )	36,85 ( $\pm 7,11$ )	14,47 ( $\pm 1,66$ )	4,34 ( $\pm 0,49$ )
2	28,02 ( $\pm 2,4$ )	32,68 ( $\pm 5,74$ )	21,95 ( $\pm 2,52$ )	8,45 ( $\pm 0,97$ )
3	30,33 ( $\pm 3,4$ )	31,93 ( $\pm 5,14$ )	20,18 ( $\pm 7,26$ )	9,66 ( $\pm 1,80$ )

Tabella 3.12: Rese di carboidrati (%), proteine (%), clorofille (mg g<sup>-1</sup>) e carotenoidi (mg g<sup>-1</sup>) ai diversi valori di  $\tau$  (d) all'intensità di 800  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Si può notare che, per entrambe le intensità di luce, a  $\tau$  più elevati *P. renovo* produca molti più carboidrati. Un comportamento simile è stato osservato in uno studio sulla microalga *Geitlerinema sp.* a diversi tempi permanenza, in cui si è osservato un netto aumento della frazione di carboidrati, rispettivamente dal 9% fino al 54%, ai tempi di ritenzione idraulica maggiori [128]. Tale aumento può essere associato a una situazione di stress, che porta a una diminuzione dell'attività metabolica, dato da un ricambio del mezzo non sufficientemente rapido per consentire un'attiva proliferazione cellulare [129] inducendo, di conseguenza, l'accumulo intracellulare di elementi di riserva sotto forma di carboidrati. Nonostante ciò, si noti come a intensità di luce inferiori la produzione dei carboidrati è molto più accentuata, con valori che raggiungono il 55% della biomassa, rispetto alle condizioni testate a intensità elevate, la cui resa massima si attesta al 30,33%. Ciò potrebbe essere giustificato dal fatto che a intensità minori la cellula sia in grado di sfruttare in modo molto più efficiente la luce portando, in questo caso, all'accumulo di metaboliti di riserva sotto forma di carboidrati. Intensità più elevate possono avere un effetto saturante sui fotosistemi con conseguente inefficienza nell'accumulo di prodotti di riserva [130].

Inoltre, alcuni studi, come quello di Ho S. et al. (2013) [131] sulla microalga *S. obliquus*, hanno evidenziato come alcune microalghe virino il proprio metabolismo verso l'accumulo di carboidrati come meccanismo di riserva quando poste in condizioni di stress per carenza di azoto, condizione che, nel caso di *P. renovo*, può essere associata al fatto che a tempi di permanenza elevati, come il  $\tau = 3$  d, non vi sia un ricambio appropriato di nutrienti essenziali per il metabolismo cellulare. Invece, il contenuto proteico si attesta essere sempre su una percentuale media del

37 %, come confermato dall'analisi statistica (Figura 3.15 e 3.16), che è un valore superiore rispetto a quanto riportato da Dahlin et al. [80], in cui la stessa specie in colture batch presentano un contenuto proteico del 20%. Questo dato, inoltre, mette in luce il fatto che differenti modalità di coltivazione possono avere un profondo effetto sul profilo macromolecolare di questa specie.

Generalmente le microalghe contengono dal 20 al 70% di proteine in biomassa. Per esempio, tra gli organismi che presentano le percentuali proteiche maggiori spiccano *S. platensis* o *Synechococcus sp.*, che arrivano ad avere fino al 63% di proteine in biomassa, andando a minimizzare il contenuto di carboidrati, circa il 10% [132]. Rispetto a questi valori, microalghe come *Porphyridium cruentum* o lo stesso *Picochlorum renovo* sembrano presentare un metabolismo dei carboidrati che prevale sulla produzione di proteine, arrivando ad accumularne fino al 50%.

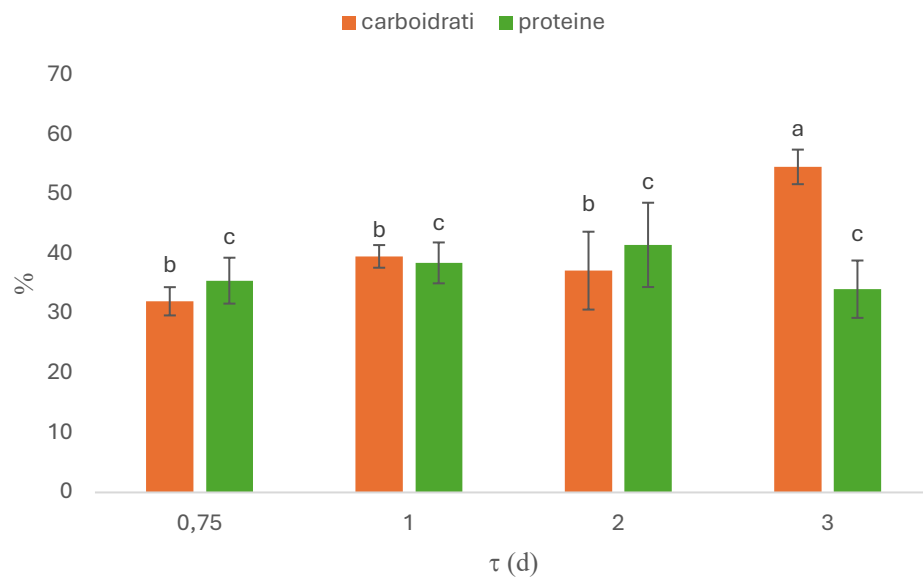


Figura 3.15: Rese per carboidrati (%) e proteine (%) ai diversi valori di  $\tau$  (d) all'intensità di  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

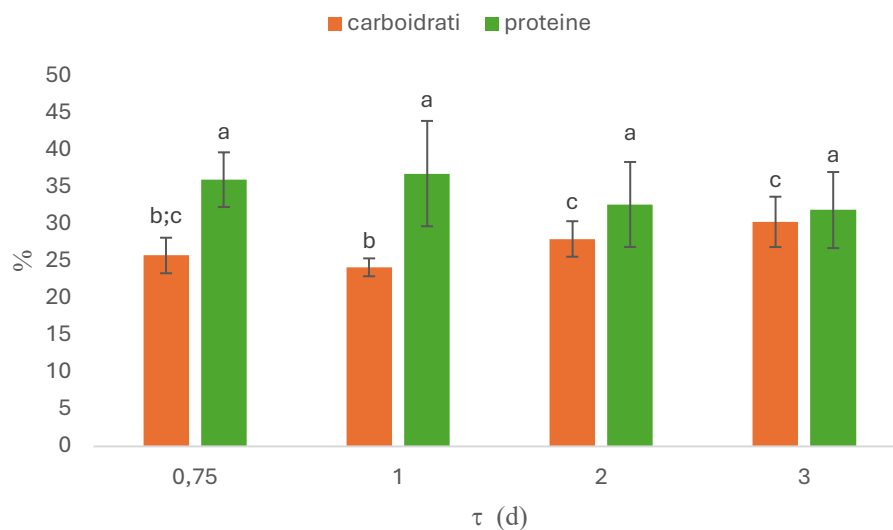


Figura 3.16: Rese per carboidrati (%) e proteine (%) ai diversi valori di  $\tau$  (d) all'intensità di  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Andando ad osservare i dati relativi ai pigmenti, invece, notiamo come essi vengano modulati in funzione dell'aumento del tempo di ritenzione idraulica per le condizioni poste a  $300$  e  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Figura 3.17). Notiamo, difatti che, essi aumentano fino a tempi di ritenzione di due giorni, confermando quanto osservato da Feng S. et al. (2024) [133] in cui la coltivazione di *C. vulgaris* variava il contenuto di clorofille all'aumentare del tempo di ritenzione idraulica. Per la condizione a  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  la condizione che ha apportato il picco di produzione di pigmenti risulta essere quella a  $\tau = 2$  giorni, ovvero  $30,09 \text{ mg g}^{-1}$ . Per la condizione a  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  il picco di accumulo di pigmenti lo si ha sia a tempo di permanenza di 2 giorni che di 3 giorni, con un valore che si aggira, similmente a quanto visto nella condizione a più bassa luce, intorno a  $30 \text{ mg g}^{-1}$ . È interessante osservare come a  $\tau = 2$  giorni si ha, per entrambe le condizioni di luce testate, il picco massimo raggiunto di produzione di clorofille e carotenoidi, rispettivamente  $21,73 \pm 2,06$  e  $8,36 \pm 0,63 \text{ mg g}^{-1}$  per la condizione a  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e  $21,95 \pm 2,52$  e  $8,45 \pm 0,97 \text{ mg g}^{-1}$  per la condizione a  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . A valori di  $\tau = 3$  giorni, invece, notiamo un calo della produzione di pigmenti che nella condizione a minor intensità di luce risulta molto accentuato (Figura 3.17). Questo potrebbe giustificare il fatto che tempi di ritenzione idraulica troppo elevati portino ad una situazione di stress cellulare, che impedisce alla cellula di avere un'attiva

produzione di pigmenti a causa della carenza di nutrienti, come l'azoto, che sappiamo essere un elemento fondamentale per la sintesi degli anelli tetrapirrolici della clorofilla e delle strutture terpeniche dei diversi carotenoidi presenti negli LHC [134].

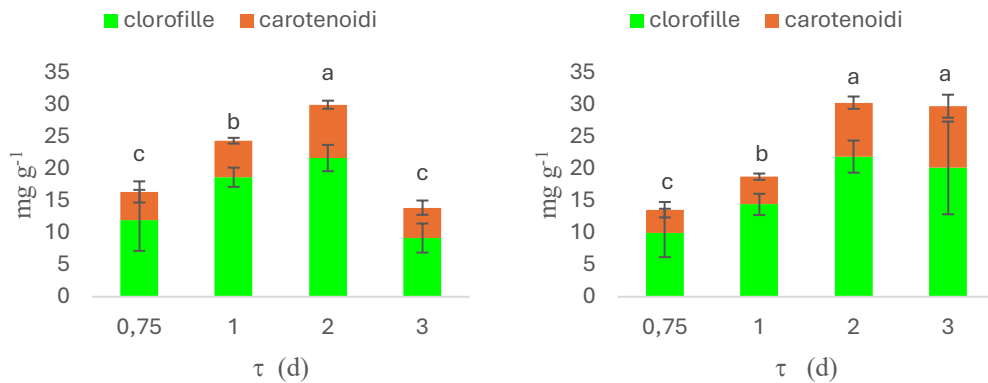


Figura 3.17: A sx rese di clorofille e carotenoidi ( $\text{mg g}^{-1}$ ) alle diverse condizioni di  $\tau$  a  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ; a dx rese di clorofille e carotenoidi ( $\text{mg g}^{-1}$ ) alle diverse condizioni di  $\tau$  (d) a  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

### 3.2.6.2 Effetto dell'intensità luminosa sulla composizione della biomassa

Dopo lo studio delle condizioni messe a punto nel paragrafo 3.2.3 si è svolta l'analisi per la caratterizzazione della biomassa alle diverse intensità di luce (Tabella 3.13).

Intensità di luce ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	Carboidrati (%)	Proteine (%)	Clorofille ( $\text{mg g}^{-1}$ )	Carotenoidi ( $\text{mg g}^{-1}$ )
150	53,61 ( $\pm 5,64$ )	27,52 ( $\pm 6,62$ )	31,65 ( $\pm 3,43$ )	8,84 ( $\pm 1,54$ )
300	39,59 ( $\pm 1,9$ )	38,5 ( $\pm 3,43$ )	18,72 ( $\pm 1,51$ )	5,73 ( $\pm 0,45$ )
600	37,88 ( $\pm 3,2$ )	32,77 ( $\pm 7,48$ )	17,7 ( $\pm 2,49$ )	5,29 ( $\pm 0,61$ )
800	24,19 ( $\pm 1,21$ )	36,9 ( $\pm 7,11$ )	14,47 ( $\pm 1,66$ )	4,34 ( $\pm 0,49$ )

Tabella 3.13: Rese di carboidrati (%), proteine (%), clorofille ( $\text{mg g}^{-1}$ ) e carotenoidi ( $\text{mg g}^{-1}$ ) alle diverse intensità di luce ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) studiate sulla coltura.

Si nota un trend che possiamo definire, tramite l'analisi statistica, costante per le proteine, che si attestano a un valore di circa il 34% (Figura 3.18), mentre diverso andamento abbiamo per quanto riguarda i carboidrati, dove è possibile notare un incremento del loro contenuto al diminuire dell'intensità luminosa con il picco di 53,61 % che si raggiunge a 150  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Notiamo che, diversamente da quanto riportato in letteratura, in cui l'aumento dell'intensità di luce porta ad un incremento dell'accumulo di carboidrati intracellulare per diverse microalghe, tra cui *S. obliquus* [135], per *P. renovo* la tendenza è opposta. Questo potrebbe anche significare che a basse intensità luminose *P. renovo* tenda ad accumulare una maggior quantità di carboidrati di riserva. Tuttavia, non potendo disporre di un'analisi qualitativa di questa frazione, tale risultato rimane da chiarire con ulteriori studi.

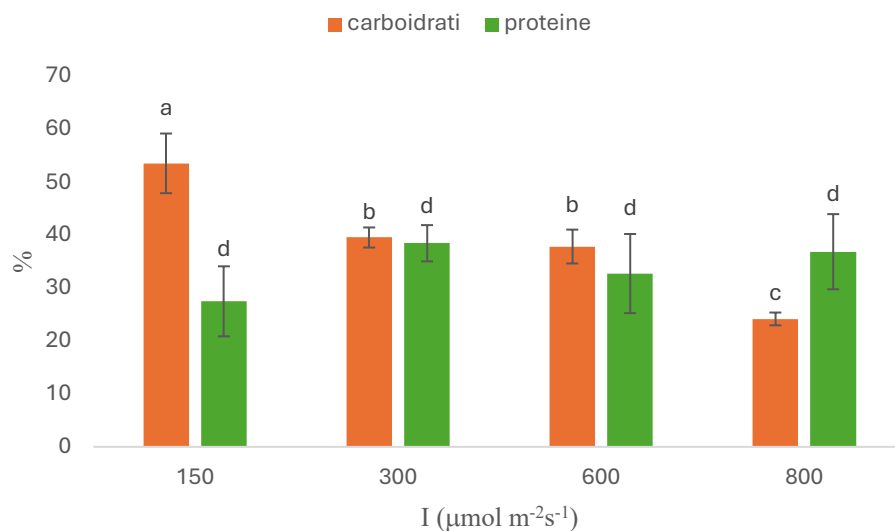


Figura 3.18: Rese per carboidrati (%) e proteine (%) alle diverse intensità di luce ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

Dall'andamento della resa di pigmenti in funzione della intensità di luce, invece, si nota una tendenza con aumento consistente, fino al 4% del peso secco di clorofille e carotenoidi a basse intensità di luce (Figura 3.19). Questa tendenza è stata più volte riportata in letteratura. Infatti, molte microalghe verdi tendono a massimizzare la probabilità di assorbire i pochi fotoni con cui sono irraggiate (appunto, a basse intensità) aumentando la sintesi di pigmenti fotosintetici [130]. Ulteriori lavori di

ricerca eseguiti sulla microalga *Scenedesmus falcatus* a supporto di questa tesi riportano come l'aumento di pigmenti sia molto più spiccato in condizione a basse intensità di luce, con una percentuale in biomassa di questi del 10% ( $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) rispetto alle intensità più alte ( $500$  e  $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), rispettivamente del 7% e 3% [136]. Alcuni lavori di ricerca hanno messo in luce la spiccata capacità di alcune microalghe di modulare la produzione dei propri pigmenti in funzione della regione con cui si trovano all'interno del reattore per massimizzare l'assorbimento di fotoni, che sono eterogeneamente distribuiti nel sistema, al fine di mantenere una crescita costante [137]. Osservando ulteriormente i dati della Tabella 3.13 si nota che man mano che si aumenta l'intensità di luce, invece, le cellule, ricevendo un apporto di fotoni in eccesso, non incrementano la produzione di pigmenti, che per la condizione a  $300$  e  $600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  sono statisticamente uguali, attorno a  $23 \text{ mg g}^{-1}$  e  $22 \text{ mg g}^{-1}$ . Questa diminuzione è plausibile per scongiurare anche un possibile danno fotossidativo dato dalla presenza di troppi pigmenti, che porterebbero ad un'eccitazione eccessiva dei fotosistemi con possibile generazione di ROS.

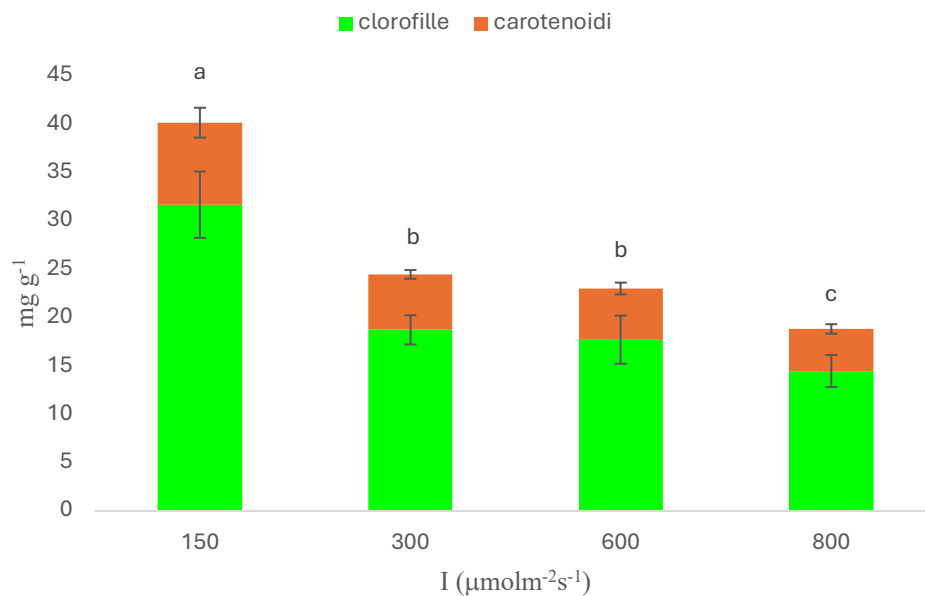


Figura 3.19: Rese di clorofille e carotenoidi ( $\text{mg g}^{-1}$ ) alle diverse intensità di luce ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

### 3.2.6.3 Effetto dello spessore del fotobioreattore sulla composizione della biomassa

Per la caratterizzazione della biomassa a  $150$  e  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  per i diversi spessori indagati, rispettivamente  $1,5$ ,  $3,5$ ,  $7,5$  e  $15$  cm, si sono ottenuti i seguenti valori (Tabella 3.14 e 3.15):

Spessore (cm)	Carboidrati (%)	Proteine (%)	Clorofille ( $\text{mg g}^{-1}$ )	Carotenoidi ( $\text{mg g}^{-1}$ )
3,5	53,61 ( $\pm 5,64$ )	27,52 ( $\pm 6,62$ )	31,65 ( $\pm 3,43$ )	8,48 ( $\pm 1,54$ )
7,5	56,14 ( $\pm 3,1$ )	30,56 ( $\pm 1,62$ )	27,93 ( $\pm 3,1$ )	11,58 ( $\pm 2,41$ )
15	64,63 ( $\pm 2,7$ )	20,65 ( $\pm 1,66$ )	62,85 ( $\pm 5,7$ )	23,67 ( $\pm 2,49$ )

Tabella 3.14: Rese di carboidrati (%), proteine (%), clorofille ( $\text{mg g}^{-1}$ ) e carotenoidi ( $\text{mg g}^{-1}$ ) nei diversi spessori all'intensità di  $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Spessore (cm)	Carboidrati (%)	Proteine (%)	Clorofille ( $\text{mg g}^{-1}$ )	Carotenoidi ( $\text{mg g}^{-1}$ )
1,5	38,5 ( $\pm 2,23$ )	47,69 ( $\pm 6,67$ )	9,46 ( $\pm 1,5$ )	3,73 ( $\pm 0,54$ )
3,5	39,59 ( $\pm 1,90$ )	38,54 ( $\pm 3,43$ )	18,72 ( $\pm 1,51$ )	5,73 ( $\pm 0,45$ )
7,5	30,65 ( $\pm 7,44$ )	48,10 ( $\pm 8,42$ )	25,23 ( $\pm 4,74$ )	9,35 ( $\pm 1,83$ )
15	44,43 ( $\pm 1,00$ )	45,84 ( $\pm 2,58$ )	27,5 ( $\pm 6,88$ )	10,08 ( $\pm 4,52$ )

Tabella 3.15: Rese di carboidrati (%), proteine (%), clorofille ( $\text{mg g}^{-1}$ ) e carotenoidi ( $\text{mg g}^{-1}$ ) nei diversi spessori all'intensità di  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Dai dati che si sono ricavati sulle frazioni della biomassa ai diversi spessori, notiamo come alle intensità di  $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  la quantità di carboidrati prodotti raggiunge il suo picco massimo di  $64,63\%$  nelle condizioni a spessore più elevato. Notiamo la stessa tendenza anche a  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , seppur con una percentuale minore, ovvero  $44,43\%$ , che possiamo attribuire ad una minor necessità della cellula di incamerare energia di riserva sotto forma di carboidrati. È molto rilevante constatare che, come osservato nel paragrafo 3.2.6.2, in cui si è osservato che a basse intensità di luce *P. renovo* tenda all'accumulo di energia sotto forma di



carboidrati,  $53,61 \pm 5,64$  %, in questi sistemi tale comportamento risulta ancora più accentuato arrivando perfino a superare il 60%.

Notiamo invece che, per quanto riguarda le proteine, a  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  si ha una percentuale maggiore rispetto alle condizioni testate a intensità di luce inferiori, con il loro picco, ovvero  $48,10 \pm 8,42$ %, che si raggiunge per spessori uguali e superiori a 7,5 cm (Figura 3.21). È da sottolineare il fatto che, rispetto alle condizioni studiate nei paragrafi 3.2.6.1 e 3.2.6.2, le condizioni a spessore superiori a 7,5 cm a  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  si attestano essere quelle che hanno portato alla maggior produzione di proteine, andando a raggiungere valori simili a quelli di *S. platensis*, cioè intorno al 46-63% [132]. Medesima osservazione la possiamo fare per quanto concerne la coltivazione a  $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  per quanto riguarda i carboidrati, i quali, rispetto alle condizioni studiate nei paragrafi 3.2.6.1 e 3.2.6.2, presentano il contenuto più alto raggiunto in questo lavoro, ovvero del  $64,63 \pm 2,7$ % (Figura 3.21). Questo valore risulta molto elevato se confrontato con quanto presente in letteratura per altre specie di interesse industriale: ad esempio, *Chlorella vulgaris* in situazione di stress da azoto in fotobioreattori in continuo, accumula fino al 46% di carboidrati in biomassa a  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  di intensità luminosa, percentuale inferiore rispetto a quanto ottenuto per *P. renov* [138].

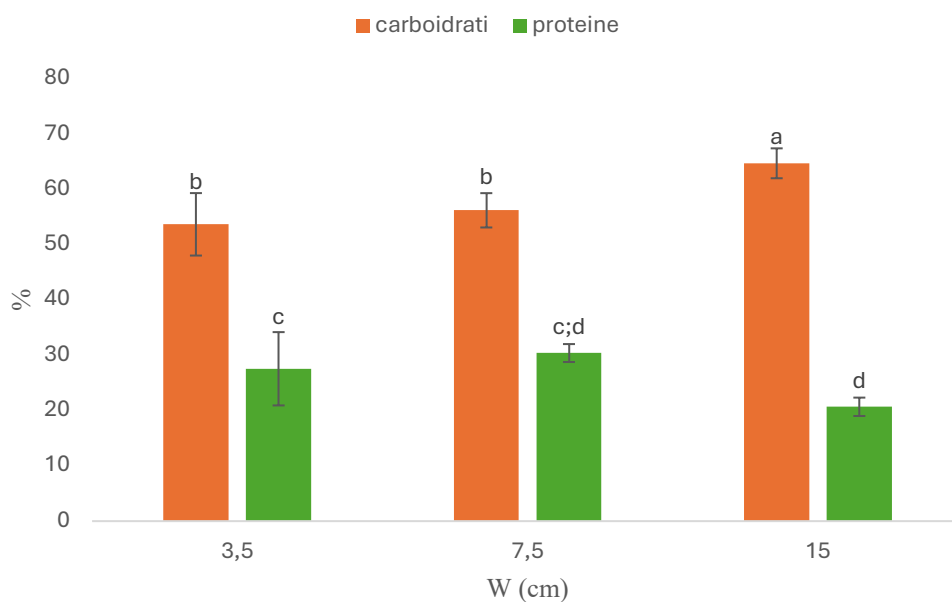


Figura 3.20: Rese per carboidrati (%) e proteine (%) nei diversi fotobioreattori a spessore (cm) all'intensità di  $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

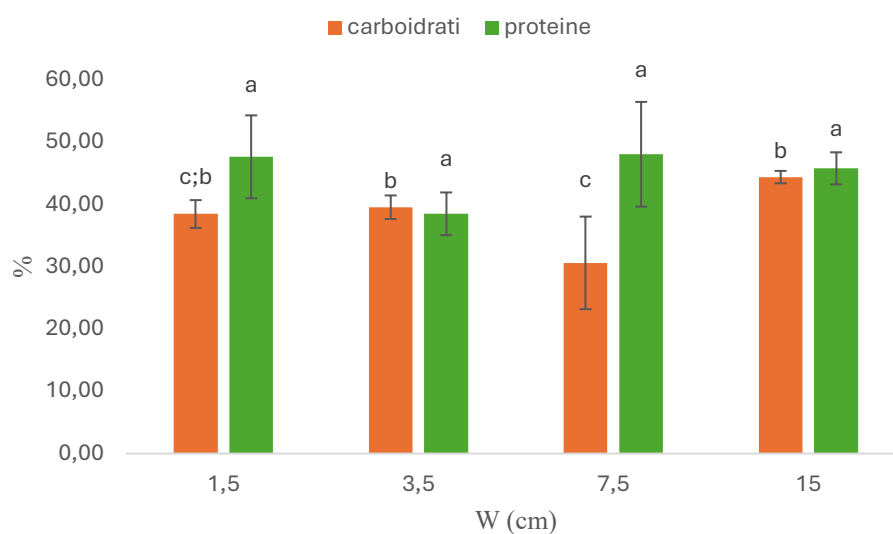


Figura 3.21: Rese per carboidrati (%) e proteine (%) nei diversi fotobioreattori a spessore (cm) all'intensità di  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Si nota, inoltre, come questa microalga sia molto prona a massimizzare l'utilizzo dell'energia luminosa poiché a basse intensità produce moltissimi pigmenti, che arrivano ad essere quasi il 9% della biomassa totale (Figura 3.22), indice che a basse intensità di luce, come per altre microalghe del genere *Picochlorum*, si attiva il meccanismo di sintesi delle clorofille, che può spingere la cellula ad avere fino al 13% della biomassa totale in pigmenti [139]. Dalle analisi eseguite sulle condizioni a diverso spessore a  $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  si evince che la capacità di *P. renovo* di modulare la sintesi di pigmenti, in situazioni di scarsa illuminazione, lo rende in grado di mantenere efficiente il suo apparato fotosintetico. Questo ha un'implicazione estremamente importante per quanto riguarda la coltivazione in reattori di scala industriale poiché, come abbiamo osservato nel paragrafo 3.2.4.1 e 3.2.4.2, la produttività areale delle cellule non varia proprio grazie alla capacità di adattamento ai grandi spessori dato dalla massiccia produzione di pigmenti fotosintetici. Notiamo che un simile andamento si ha anche per le condizioni a diverso spessore studiate a  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Figura 3.23) in cui possiamo vedere come spessori minimi (1,5 cm) inducano una scarsa produzione di pigmenti rispetto agli spessori maggiori (15cm). Questa capacità che presenta *P. renovo* di rispondere ad una scarsa percezione della luce, dovuta all'elevato spessore che deve

attraversare, lo induce all'aumento di pigmenti per aumentare la probabilità statistica che un fotone ecciti la clorofilla dei centri di reazione [134].

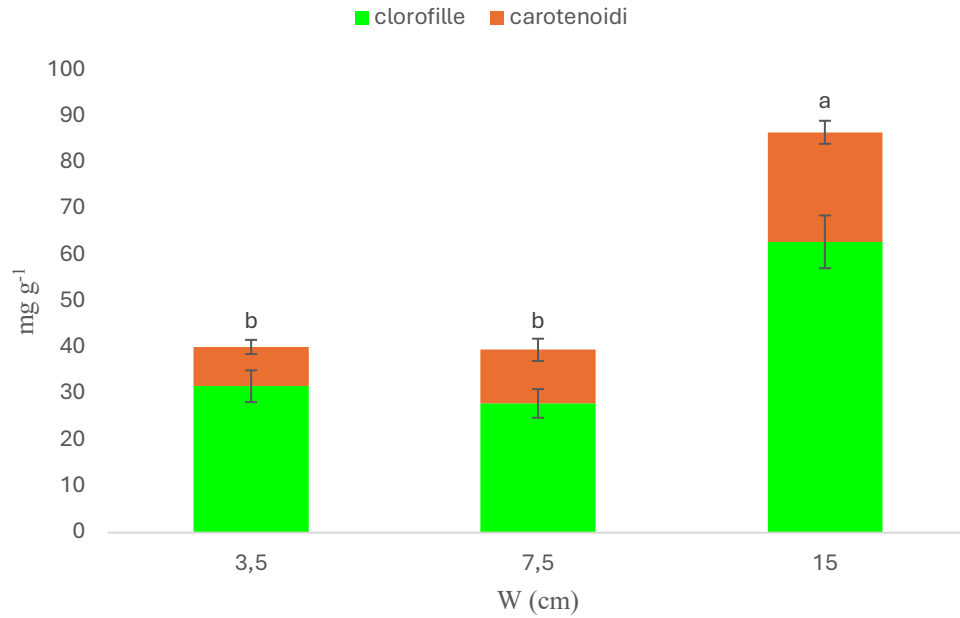


Figura 3.22: Rese di clorofille e carotenoidi ( $\text{mg g}^{-1}$ ) ai diversi spessori all'intensità di  $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

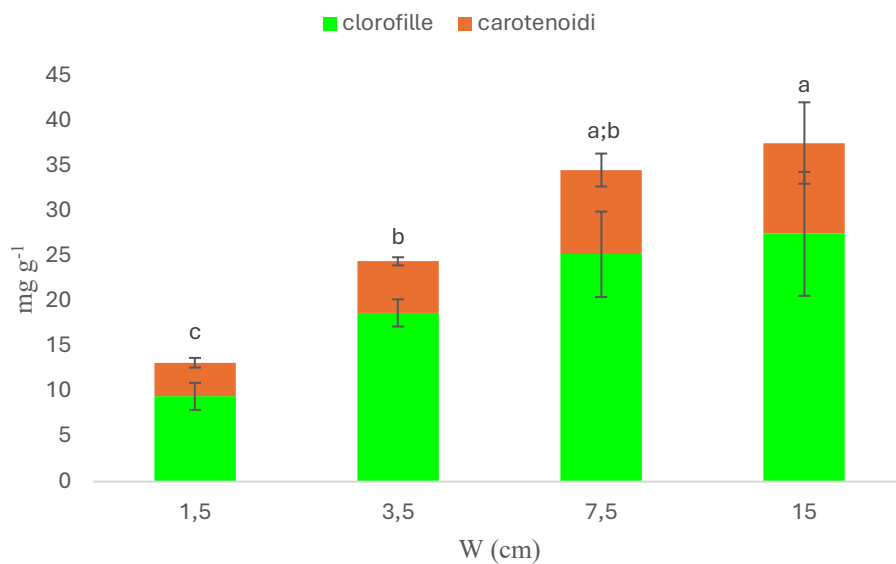


Figura 3.23: Rese di clorofille e carotenoidi ( $\text{mg g}^{-1}$ ) nei diversi fotobioreattori a spessore all'intensità di  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Un modo per validare questa capacità di adattamento di *P. renovo* alle basse intensità di luce lo possiamo riscontrare nell'analisi del profilo della biomassa sulle condizioni poste a diverse intensità di luce allo spessore di 15 cm, vedi paragrafo 3.2.4.3.

Per la caratterizzazione della biomassa si sono ottenuti i seguenti valori (Tabella 3.16):

Intensità di luce ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	Carboidrati (%)	Proteine (%)	Clorofille ( $\text{mg g}^{-1}$ )	Carotenoidi ( $\text{mg g}^{-1}$ )
150	64,63 ( $\pm 2,7$ )	20,65 ( $\pm 1,66$ )	62,58 ( $\pm 5,7$ )	23,67 ( $\pm 2,49$ )
300	44,43 ( $\pm 1,00$ )	45,84 ( $\pm 2,58$ )	27,5 ( $\pm 6,88$ )	10,08 ( $\pm 4,52$ )
600	39,62 ( $\pm 1$ )	47,94 ( $\pm 1,8$ )	21,73 ( $\pm 7,69$ )	7,48 ( $\pm 2,84$ )
800	33,01 ( $\pm 0,8$ )	47,12 ( $\pm 4,47$ )	28,88 ( $\pm 6,03$ )	11,75 ( $\pm 2,23$ )

Tabella 3.16: Rese di carboidrati (%), proteine (%), clorofille ( $\text{mg g}^{-1}$ ) e carotenoidi ( $\text{mg g}^{-1}$ ) alle diverse intensità di luce nei fotobioreattori a spessore 15cm.

Notiamo che, come osservato nel paragrafo 3.3.1, all'aumentare dell'intensità di luce, con cui si irradia la coltura, non vi è un aumento di pigmenti. Diversamente, invece, è osservabile che a basse intensità di luce la coltura produce molti pigmenti, che arrivano a raggiungere quai l'8-9% della composizione totale della biomassa. Gli esperimenti condotti da Cano et al. (2021) [139] riportano che, per far sì che *Picochlorum celeri* sia in grado di sfruttare al meglio l'apparato fotosintetico a basse intensità di luce, esso è in grado di aumentare i propri LHC. Questa caratteristica del genere *Picochlorum* potrebbe spiegare il consistente aumento di pigmenti che si sono potuti osservare in quelle condizioni in cui si è andati a studiare l'effetto dell'intensità di luce. Difatti, a basse intensità di luce e a spessori elevati la produzione di pigmenti è ancora più accentuata in risposta al diminuire dell'intensità media percepita all'interno del sistema. Nonostante l'acclimatazione a basse luci sia un comportamento presente in molte microalghe [140], è ragionevole supporre che l'efficienza con il quale questo viene iterato sia specie-specifico. Nel lavoro di Cano et al. (2021) viene studiato la modulazione del contenuto di pigmenti che svolge *P. celeri* nella transizione da intensità saturanti

fino a basse intensità di luce, in cui si registra un aumento totale di clorofille dal 5% fino al 10%. Lo stesso ha anche osservato come l'acclimatazione della coltura alle minori intensità di luce, ovvero  $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , ha portato il valore totale di clorofille ad un massimo del 15% della biomassa [139]. Pertanto, i risultati qui ottenuti per *P. renovo*, a supporto dell'efficienza e della produttività ottenuti nel paragrafo 3.2.4.3, fanno supporre che le microalghe del genere *Picochlorum* abbiano evoluto una spiccata abilità nel modulare l'accumulo di pigmenti in funzione dell'intensità di luce.

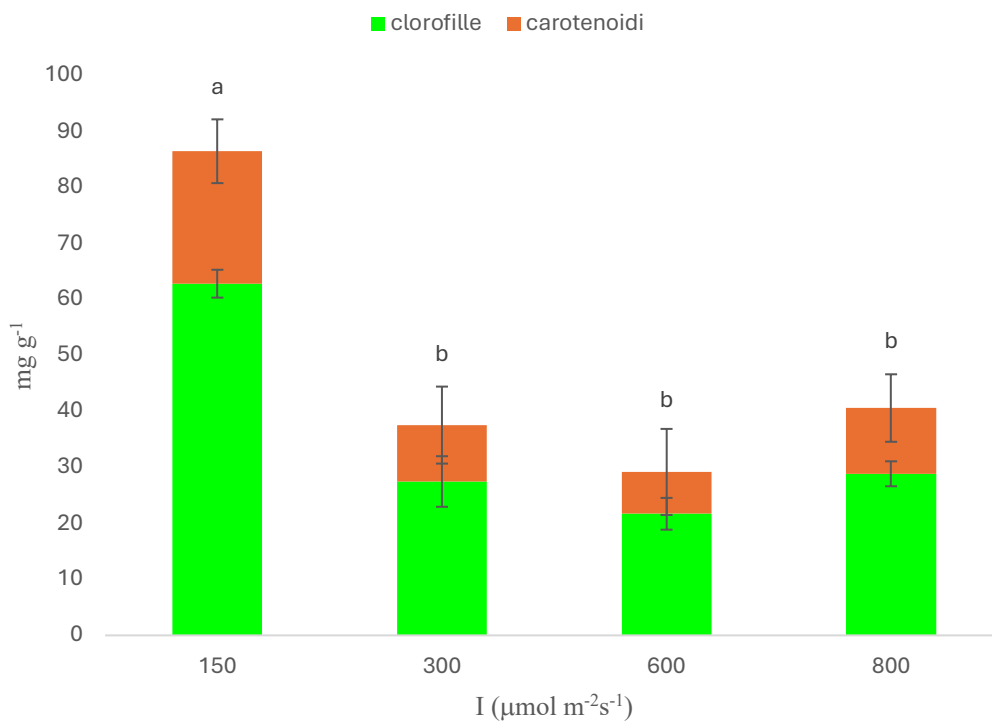


Figura 3.24: Rese di clorofille e carotenoidi ( $\text{mg g}^{-1}$ ) nei fotobioreattori a spessore 15 cm al variare dell'intensità di luce ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

#### 3.2.6.4 Effetto dello spessore di fotobioreattori in serie sulla composizione della biomassa

Dall'analisi effettuata sui pigmenti dei reattori posti in serie si sono ottenuti i seguenti risultati (Tabella 3.17):

Reattore	Clorofille (mg g <sup>-1</sup> )	Carotenoidi (mg g <sup>-1</sup> )
1	25,38 (±2,28)	6,47 (±0,90)
2	30,95 (±4,82)	11,36 (±2,62)
3	39,78 (±3,27)	14,96 (±0,12)
1 + 2	56,33 (±3,55)	17,83 (±1,76)
1 + 2 + 3	96,11 (±3,46)	32,79 (±1,21)

Tabella 3.17: Rese di clorofille (mg g<sup>-1</sup>) e carotenoidi (mg g<sup>-1</sup>) ai diversi sistemi di spessore (cm) all'intensità di 300 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>.

La capacità di questa specie di applicare quello che viene denominato *low light acclimation*, che consiste in un adattamento fisiologico, che alcune microalghie compiono quando si trovano a basse intensità di luce, induce cambiamenti a livello cellulare per mantenere una fotosintesi efficiente.

Le microalghie durante questa fase aumentano il contenuto di clorofille e pigmenti fotosintetici [141], col fine di catturare più luce possibile per mantenere un metabolismo attivo. È da riscontrarsi anche che un aumento della superficie tilacoidale permetterebbe di sviluppare la superficie delle loro membrane permettendo, di conseguenza, l'assemblaggio di un maggior numero di LHC, col fine di ottimizzare la cattura dei fotoni [142]. Difatti, notiamo come nel fotobioreattore più vicino alla sorgente luminosa le cellule non presentano una produzione di pigmenti fotosintetici che risalta particolarmente, circa il 3-4% del contenuto in biomassa (Figura 3.25), simile a quanto riscontrato con lo spessore 7,5 cm a 300 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (vedi paragrafo 3.2.6.3). Invece, per il secondo e terzo reattore quello che si riscontra è un aumento graduale della produzione di pigmenti, con il picco che si attesta al 5-6% di biomassa totale, in risposta alla diminuzione di luce che riesce a penetrare all'interno della coltura, confermando la capacità di *P. renovo* di essere in grado di svolgere efficacemente il "*low light acclimation*". Se confrontiamo i pigmenti prodotti dal Reattore 1 + 2, il cui valore medio si attesta a 74,16 ± 1,62 mg g<sup>-1</sup>, con il reattore di spessore 15 cm a 300 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, la cui frazione rispettiva è di 38,3 ± 5,7 mg g<sup>-1</sup>, notiamo che il contenuto di pigmenti nei reattori posti in serie e divisi regionalmente aumenta arrivando a superare di quasi

4 punti percentuali quelli del reattore a spessore 15 cm. Andando a vedere il sistema nel suo intero vediamo, invece, che il contenuto di pigmenti del Reattore 1 + 2 + 3 arriva ad un quantitativo di 128,9 mg g<sup>-1</sup> che, nel suo insieme, conferma i dati riportati da Cano et al. (2021) sul fatto che il genere *Picochlorum* può acclimatarsi con buona efficienza, in limitazione luminosa, arrivando ad accumulare fino al 15% di pigmenti all'interno della biomassa [139]. Inoltre, se calcoliamo la resa del Reattore 1 + 2, usando la Cx media dei due compartimenti, si ha una resa in pigmenti di 34,22 ± 3,9 mg g<sup>-1</sup>, dato che statisticamente corrisponde a quanto trovato per lo spessore a 15 cm, ovvero 38,3 ± 5,7 mg g<sup>-1</sup>. Ciò supporta ulteriormente l'ipotesi che, all'aumentare dello spessore del fotobioreattore, e dunque al diminuire dell'intensità media percepita al suo interno, *Picochlorum renovo* è capace di mantenere alte efficienze (come visto nel paragrafo 3.2.4.3) modulando in modo molto efficiente il contenuto di pigmenti in biomassa per acclimatarsi.

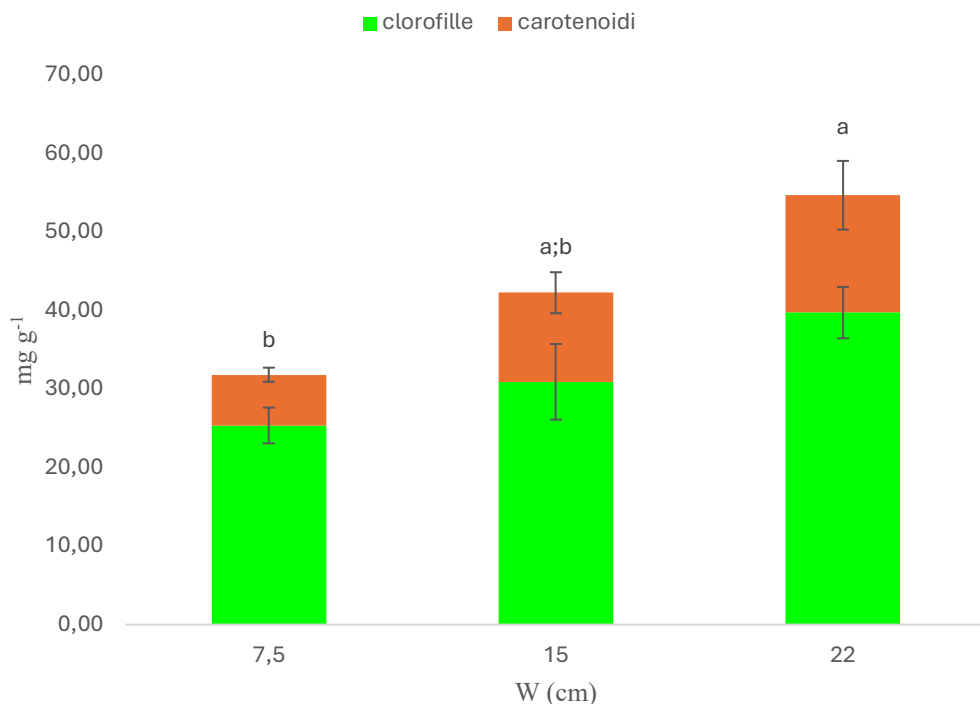


Figura 3.25 Rese di clorofille e carotenoidi (mg g<sup>-1</sup>) nei fotobioreattori da 7,5 cm in serie all'intensità di 300 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>.

### 3.3 Esperimenti in batch

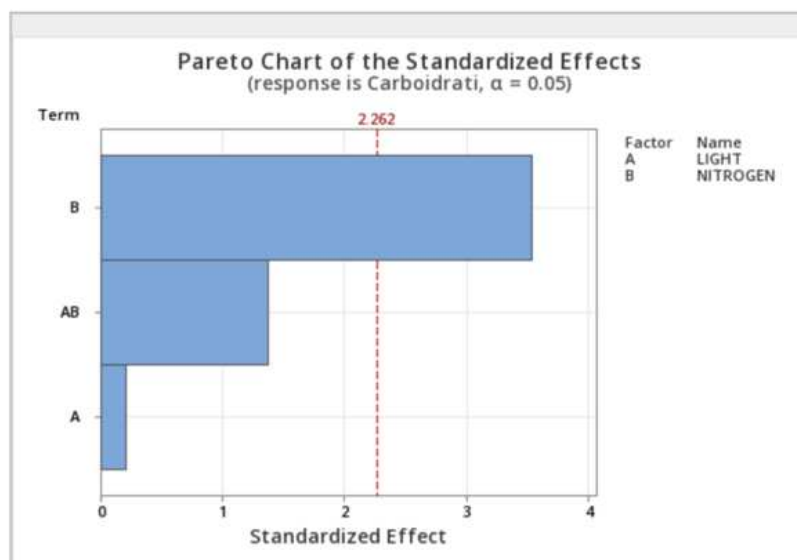
Lo studio esaustivo delle *novel species* non può prescindere dall'individuazione delle variabili che influenzano a livello industriale le produttività. *P. renovo*, dall'analisi della letteratura a disposizione, sembra accumulare una buona quantità di proteine e carboidrati.

Attraverso lo sfruttamento e l'applicazione del *Design of Experiment*, i cui dettagli sono descritti nel paragrafo 2.9.1, è stato investigato l'effetto della concentrazione di azoto e della intensità di luce sulla produttività volumetrica di carboidrati e proteine. I risultati ottenuti sono stati sfruttati al fine di costruire dei modelli matematici di regressione. Questi, infine, sono stati utilizzati per ricavare le condizioni delle due variabili che consentano una massimizzazione dei target designati [29].

#### 3.3.1 Effetto della luce e della concentrazione di azoto sui carboidrati

Il modello che meglio rappresenta l'influenza di luce e azoto sulla produttività dei carboidrati è dato dall'equazione lineare (Eq 3.1):

$$\text{Carboidrati (mg L}^{-1}\text{d}^{-1}) = 374 + 0,570 \cdot \text{LUCE} - 0,00188 \cdot \text{LUCE} \cdot \text{AZOTO} \quad (\text{Eq. 3.1})$$





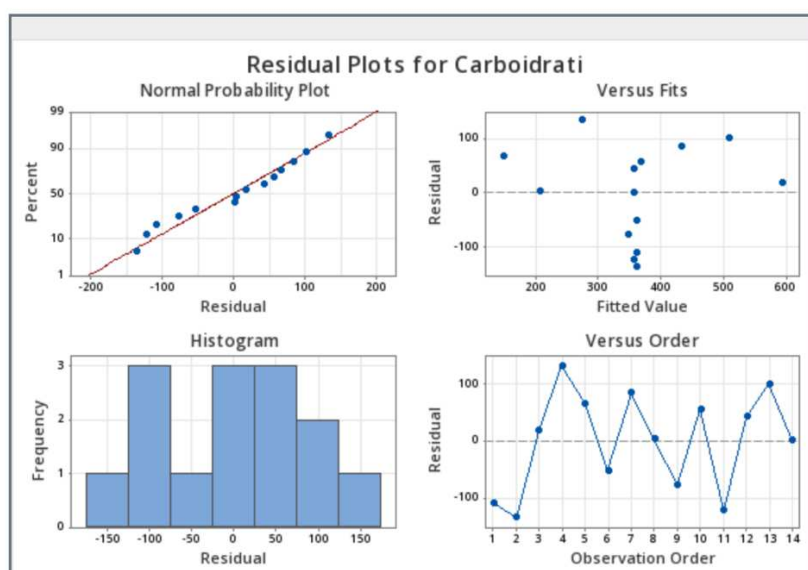


Figura 3.26: Grafico di Pareto (in alto) e residual plots (in basso) ottenuti dall'analisi statistica del Design of Experiment sulla produttività di carboidrati per l'analisi del modello statistico dai dati sperimentali ottenuti attraverso il DoE e fitting per la scelta del modello statistico da adottare per rappresentare l'influenza di Luce e Azoto sulla produzione dei carboidrati.

Possiamo notare come il grafico di Pareto ottenuto (Figura 3.26) metta in luce l'influenza preponderante che la concentrazione di azoto (B) ha sulla produttività di carboidrati. L'effetto della luce (A), invece, al contrario di quanto notato negli esperimenti in continuo, sembra essere poco significativo. Anche l'interazione tra i due fattori sembra non essere significativamente influente su questa variabile.

La concentrazione di azoto nel medium influenza linearmente la produttività di carboidrati. Difatti, dal surface plot ottenuto (Figura 3.27), notiamo come all'aumentare della concentrazione di azoto abbiamo una minor produttività dei carboidrati.

Diversi studi mettono in luce l'influenza che provoca una limitazione da azoto sull'accumulo intracellulare di carboidrati come prodotto di riserva energetica indotta da una condizione di stress.

Lo studio sugli effetti dei nutrienti sulla biomassa microalgale eseguiti da Morales-Plasencia et al. (2023) [143] ha messo in evidenza l'influenza che ha una carenza di azoto sull'accumulo di carboidrati in *Nannochloropsis oculata*, che arriva a

modulare la frazione di questi dal 23% fino al 29% in limitazione da azoto. Ulteriori studi su diverse specie diverse, come per il caso di *Nannochloropsis sp.*, hanno evidenziato similmente come la limitazione di azoto possa portare ad un accumulo di carboidrati più evidente, con un incremento del contenuto in biomassa dal 16% al 53% [144].

Ulteriori studi, a sostegno dell'influenza dell'azoto sull'accumulo di carboidrati, sono stati eseguiti su *C. vulgaris* riportando che la composizione di un medium con carenza di azoto, rispetto a uno tradizionale (che non presenta nutrienti, come l'azoto, in concentrazione limitante), porta la microalga a passare dal 15% fino al 38% di carboidrati accumulati [145].

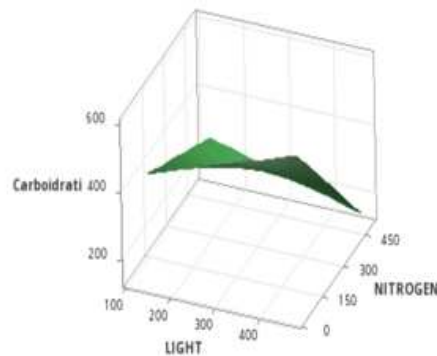


Figura 3.27: Surface plot ottenuto dall'analisi statistica del Design of Experiment sulla produttività di carboidrati da adottare per rappresentare l'influenza di Luce e Azoto sulla produzione dei carboidrati.

### 3.3.2 Effetto della luce e della concentrazione di azoto sulla produttività di proteine

Il modello che maggiormente rappresenta l'influenza di luce e azoto per la produttività delle proteine è, similmente a quanto ottenuto per i carboidrati, quello lineare, la cui equazione è (Eq 3.2):

$$\text{Proteine (mg L}^{-1}\text{d}^{-1}) = 184 - 0,198 \cdot \text{LUCE} + 0,602 \cdot \text{AZOTO} + 0,00176 \cdot \text{LUCE} \cdot \text{AZOTO} \quad (\text{Eq. 3.2})$$

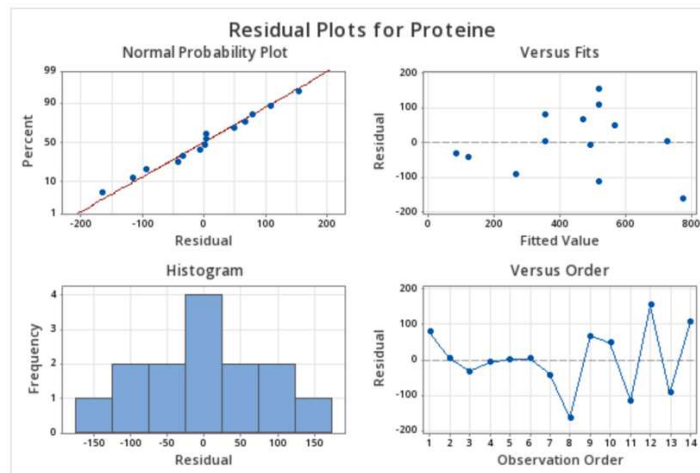
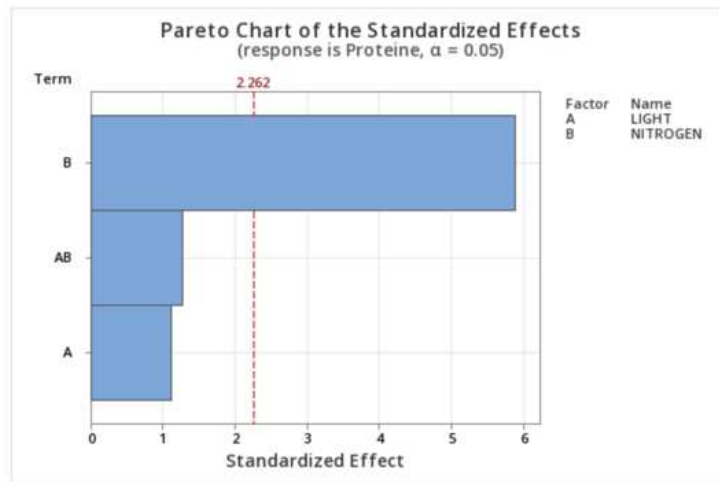


Figura 3.28: Grafico di Pareto (in alto) e residual plots (in basso) ottenuti dall'analisi statistica del Design of Experiment sulla produttività di carboidrati per l'analisi del modello statistico dai dati sperimentali ottenuti attraverso il DoE e fitting per la scelta del modello statistico da adottare per rappresentare l'influenza di Luce e Azoto sulla produzione delle proteine.

Notiamo, anche in questo caso, la significativa influenza che ha l'azoto sulla produttività delle proteine, rispetto invece alla luce (Figura 3.28). L'importanza dell'azoto sulla produzione di proteine è un dato che è concorde agli esperimenti eseguiti da Coban et al. (2021) [146], in cui viene messo in luce come una limitazione di azoto in una coltura microalgale infici sulla produzione di proteine a causa della scarsità di risorse per la formazione dei legami ammidici. Ulteriori studi sulla microalga *Graesiella emersonii* hanno evidenziato come la coltivazione in regime di deprivazione di azoto abbia portato ad una riduzione del 50% del

contenuto proteico intracellulare [147]. Studi eseguiti su *S. platensis*, a diverse concentrazioni di azoto fornite nel medium di crescita, confermano l'importanza che questo elemento ha per la formazione dei legami ammidici delle proteine, che rappresentano il 60-70% della biomassa di questa specie. Infatti, come evidenziato, circa il 96% di tutto l'azoto presente all'interno di *S. platensis* si trovi incorporato in proteine ed enzimi [147].

Per *P. renovo* notiamo, infatti, come la concentrazione di azoto nel medium abbia una rilevante influenza sulla produttività di proteine che caratterizzano la biomassa. L'equazione 3.2 descrive, appunto, l'influenza che questo fattore ha sulla produttività tramite la generazione di un modello di interazione lineare. Osservando anche il surface plot (Figura 3.29) possiamo notare come il contenuto proteico risulti più elevato quando si fornisce azoto in eccesso nel medium, rispetto ad una situazione di limitazione, con conseguente minor produttività proteica. La luce invece, per la significatività del modello statistico generato, non sembra avere un'influenza importante sull'accumulo di proteine. Questo dato è in accordo con quanto riportato da Esteves et al. (2024), in cui l'aumento di luce nella coltivazione di microalghe verdi, come *C vulgaris* o *Acutodesmus obliquus*, non influenza l'accumulo di proteine [148].

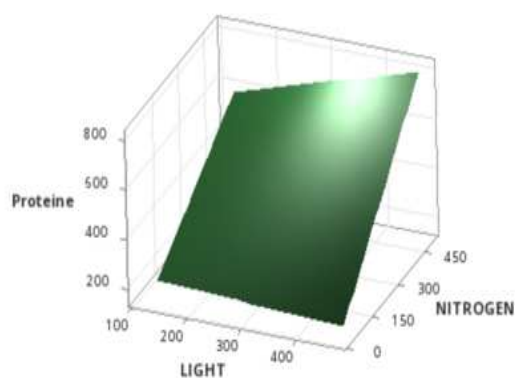


Figura 3.29: Surface plot ottenuto dall'analisi statistica del Design of Experiment sulla produttività di carboidrati da adottare per rappresentare l'influenza di Luce e Azoto sulla produzione delle proteine.

## CAPITOLO 4, CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi sperimentale la microalga verde *Picochlorum renovo*, una specie che recentemente ha dimostrato performance di crescita molto interessanti a livello industriale, è stata coltivata in differenti fotobioreattori ad alta efficienza e in diverse modalità allo scopo di valutare l'effetto delle variabili operative sulla produttività e sull'efficienza fotosintetica della biomassa. Inoltre, nell'ottica di un futuro *scale-up* industriale di tale specie, la composizione in carboidrati e proteine è stata valutata e la loro produttività massimizzata in funzione della concentrazione di azoto e dell'intensità luminosa.

In fase preliminare sono stati studiati i parametri di crescita specifici per questa specie attraverso l'analisi foto-respirometrica, mettendo in evidenza le capacità di questa specie, simile a quelle del suo genere, di sostenere un'attiva crescita ad elevate intensità di luce (fino a  $864,72 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Mediante l'utilizzo di fotobioreattori in continuo, si sono indagati gli effetti delle variabili operative sulla produttività, efficienza fotosintetica e profilo macromolecolare della specie.

Attraverso lo studio dell'effetto dei diversi tempi di ritenzione idraulica, a  $300$  e  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , si sono raggiunti picchi di concentrazione di biomassa che si attestano rispettivamente a  $2,04 \pm 0,19 \text{ g L}^{-1}$  e  $2,27 \pm 0,21 \text{ g L}^{-1}$ , evidenziando l'effetto che alti tempi di ritenzione idraulica hanno sull'incremento della biomassa all'interno del reattore. È stato anche visto l'effetto che tempi di permanenza elevati hanno sulla produttività areale, che riporta valori minori rispetto a tempi di ritenzione più bassi, attestandosi rispettivamente a  $24,5 \pm 6,55 \text{ g m}^{-2}\text{d}^{-1}$  a  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e  $26,43 \pm 7,31 \text{ g m}^{-2}\text{d}^{-1}$  e a  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Attraverso lo studio della cinetica di mantenimento si è stati in grado di mettere in luce l'alta produttività che questa specie ha alla minor intensità di luce testata ( $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) rispetto a intensità elevate ( $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), che invece impongono alla cellula di aumentare l'energia spesa per il proprio mantenimento, attivando i meccanismi di fotoprotezione per evitare il danno foto-ossidativo.

Mediante lo studio dell'effetto dell'intensità di luce si sono potuti confermare i dati di fotorespirometria, notando un incremento della biomassa all'interno del reattore all'aumentare dell'intensità di luce, con il picco massimo ottenuto a  $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  che riporta una concentrazione di  $1,43 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$ .

La coltivazione con fotobioreattori a diverso spessore ha messo in luce l'estrema versatilità con cui questa specie è in grado di adattarsi a sistemi di coltivazione in cui la percezione media della luce al loro interno è minore rispetto a quella incidente sul sistema. Ciò ha messo in risalto la capacità di *P. renovo* di modulare la produzione dei propri pigmenti per catturare più fotoni possibili e mantenere costanti la produttività. Infatti, l'abilità nella modulazione dei pigmenti fotosintetici (*low-light acclimation*) in funzione dell'intensità di luce sembra consentire a questa microalga di assorbire con alta efficienza la luce anche in condizioni di forte limitazione. A riscontro di ciò, l'efficienza fotosintetica è rimasta a valori piuttosto alti (intorno al 14%) a fronte di un incremento dello spessore di più di quattro volte. Lo studio dell'effetto della luce LED rosso-blu ha messo in evidenza che anche la qualità della luce ha un effetto sull'acclimatazione alla luce da parte di *P. renovo*. Infatti, nel confronto con il LED in spettro di luce bianca, in questa condizione la produttività areale è quasi doppia ( $43 \text{ g m}^{-2}\text{d}^{-1}$ ). L'efficienza fotosintetica sembra risentire del diverso spettro luminoso (circa  $14,04 \pm 0,4\%$ ) a fronte, difatti, di un sistema di illuminazione più efficiente.

Infine, la caratterizzazione della biomassa ha messo in luce la capacità di questa specie di accumulare alte quantità di carboidrati (fino al 64%) e proteine (fino al 30%).

Attraverso i dati che sono stati ricavati dal lavoro di questa tesi sono state messe in luce le potenzialità e le caratteristiche di questa specie in un'ottica di possibile impiego nel settore della coltivazione industriale, dove il continuo miglioramento dei processi produttivi è essenziale.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] J. Wang *et al.*, “Carbon Reduction of the Three-Year Air Pollution Control Plan under the LEAP Model Using a GREAT Tool in Panzhihua, China,” *Int J Environ Res Public Health*, vol. 19, no. 21, Nov. 2022, doi: 10.3390/ijerph192114482.
- [2] S. Yao, S. Lyu, Y. An, J. Lu, C. Gjermansen, and A. Schramm, “Microalgae–bacteria symbiosis in microalgal growth and biofuel production: a review,” Feb. 01, 2019, *John Wiley and Sons Inc.* doi: 10.1111/jam.14095.
- [3] B. Wang, Y. Li, N. Wu, and C. Q. Lan, “CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae,” Jul. 2008. doi: 10.1007/s00253-008-1518-y.
- [4] J. A. Del Campo, M. García-González, and M. G. Guerrero, “Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: Current state and perspectives,” Apr. 2007. doi: 10.1007/s00253-007-0844-9.
- [5] X. M. Shi, Y. Jiang, and F. Chen, “High-yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed-batch culture,” *Biotechnol Prog*, vol. 18, no. 4, pp. 723–727, 2002, doi: 10.1021/bp0101987.
- [6] B. Wang and C. Q. Lan, “Biomass production and nitrogen and phosphorus removal by the green alga *Neochloris oleoabundans* in simulated wastewater and secondary municipal wastewater effluent,” *Bioresour Technol*, vol. 102, no. 10, pp. 5639–5644, May 2011, doi: 10.1016/j.biortech.2011.02.054.
- [7] Y. Li, M. Horsman, N. Wu, C. Q. Lan, and N. Dubois-Calero, “Biofuels from microalgae,” in *Biotechnology Progress*, Jul. 2008, pp. 815–820. doi: 10.1021/bp.070371k.

- [8] P. Priyadharsini *et al.*, “Genetic improvement of microalgae for enhanced carbon dioxide sequestration and enriched biomass productivity: Review on CO<sub>2</sub> bio-fixation pathways modifications,” *Algal Res*, vol. 66, Jul. 2022, doi: 10.1016/j.algal.2022.102810.
- [9] C. N. Kowthaman, P. Senthil Kumar, V. Arul Mozhi Selvan, and D. Ganesh, “A comprehensive insight from microalgae production process to characterization of biofuel for the sustainable energy,” *Fuel*, vol. 310, Feb. 2022, doi: 10.1016/j.fuel.2021.122320.
- [10] Y. 'Changan X. 'Seetharaman, V. 'Chen, “Microalgae: a robust ‘green bio-bridge’ between energy and environment. ,” *CritRevBiotechnol*, May 2018.
- [11] A. Hopes and T. Mock, “Evolution of Microalgae and Their Adaptations in Different Marine Ecosystems,” in *Encyclopedia of Life Sciences*, Wiley, 2015, pp. 1–9. doi: 10.1002/9780470015902.a0023744.
- [12] M. D. Guiry, “How many species of algae are there?,” Oct. 2012. doi: 10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x.
- [13] J.-L. Barredo, “Microbial Carotenoids from Bacteria and Microalgae Methods and Protocols Methods in Molecular Biology 892.”
- [14] S. Sasso, G. Pohnert, M. Lohr, M. Mittag, and C. Hertweck, “Microalgae in the postgenomic era: A blooming reservoir for new natural products,” Jul. 2012. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00304.x.
- [15] R. Shaikh, A. Rizvi, S. Pandit, N. Desai, and R. Patil, “Microalgae: Classification, bioactives, medicinal properties, industrial applications, and future prospectives,” in *An Integration of*



- Phycoremediation Processes in Wastewater Treatment*, Elsevier, 2021, pp. 451–486. doi: 10.1016/B978-0-12-823499-0.00004-3.
- [16] H. D. Holland, “The oxygenation of the atmosphere and oceans,” 2006, *Royal Society*. doi: 10.1098/rstb.2006.1838.
- [17] L. C. M. Mackinder *et al.*, “A Spatial Interactome Reveals the Protein Organization of the Algal CO<sub>2</sub>-Concentrating Mechanism,” *Cell*, vol. 171, no. 1, pp. 133-147.e14, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.08.044.
- [18] M. Eisenhut, M. S. Roell, and A. P. M. Weber, “Mechanistic understanding of photorespiration paves the way to a new green revolution,” 2019, *Blackwell Publishing Ltd*. doi: 10.1111/nph.15872.
- [19] E. M. Yahia, *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Querentaro, Mexico, 2019.
- [20] F. Fassiolli, R. Dinshaw, P. C. Arpin, and G. D. Scholes, “Photosynthetic light harvesting: Excitons and coherence,” Mar. 06, 2014, *Royal Society*. doi: 10.1098/rsif.2013.0901.
- [21] G. De Leo, S. Fasano, and E. Ginelli, *Biologia e Genetica*, 4th ed. EdiSES Università, 2024.
- [22] K. Cao *et al.*, “Metabolic engineering and synthetic biology strategies for producing high-value natural pigments in Microalgae,” Nov. 01, 2023, *Elsevier Inc*. doi: 10.1016/j.biotechadv.2023.108236.
- [23] A. Aizpuru and A. González-Sánchez, “Traditional and new trend strategies to enhance pigment contents in microalgae,” Sep. 01, 2024, *Springer Science and Business Media B.V*. doi: 10.1007/s11274-024-04070-3.

- [24] T. H. Pockock, A. Koziak, D. Rosso, S. Falk, and N. P. A. Hüner, “Chlamydomonas raudensis (UWO 241), chlorophyceae, exhibits the capacity for rapid D1 repair in response to chronic photoinhibition at low temperature,” *J Phycol*, vol. 43, no. 5, pp. 924–936, Oct. 2007, doi: 10.1111/j.1529-8817.2007.00380.x.
- [25] E. Jacob-Lopes, M. I. Queiroz, L. Queiroz, and Z. Editors, “Pigments from Microalgae Handbook.”
- [26] Diego Zennaro, “Pigmenti delle piante.”
- [27] D. Savada, D. M. Hillis, C. H. Heller, and S. Hacker, *Biologia, la Cellula*, 5th ed., vol. 1. Zanichelli editore S.p.A., 2019.
- [28] W. Levasseur, P. Perré, and V. Pozzobon, “A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification,” Jul. 01, 2020, *Elsevier Inc.* doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107545.
- [29] Z. Chen, J. Chen, J. Liu, L. Li, S. Qin, and Q. Huang, “Transcriptomic and metabolic analysis of an astaxanthin-hyperproducing *Haematococcus pluvialis* mutant obtained by low-temperature plasma (LTP) mutagenesis under high light irradiation,” *Algal Res*, vol. 45, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.algal.2019.101746.
- [30] A. J. Simkin, L. Kapoor, C. G. P. Doss, T. A. Hofmann, T. Lawson, and S. Ramamoorthy, “The role of photosynthesis related pigments in light harvesting, photoprotection and enhancement of photosynthetic yield in planta,” Apr. 01, 2022, *Springer Science and Business Media B.V.* doi: 10.1007/s11120-021-00892-6.

- [31] M. Thakur and R. Kumar, “Microclimatic buffering on medicinal and aromatic plants: A review,” Feb. 01, 2021, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.indcrop.2020.113144.
- [32] Massimo Pincioli, “La luce e la percezione del colore.”
- [33] E. Jacob-Lopes, M. Manzoni Maroneze, M. Isabel Queiroz, and L. Queiroz Zepka, “Handbook of Microalgae-Based Processes and Products: Fundamentals and Advances in Energy, Food, Feed, Fertilizer and Bioactive Compounds,” 2020.
- [34] C. U. Ugwu, H. Aoyagi, and H. Uchiyama, “Photobioreactors for mass cultivation of algae,” Jul. 2008. doi: 10.1016/j.biortech.2007.01.046.
- [35] D. Zerrouki and A. Henni, “Outdoor Microalgae Cultivation for Wastewater Treatment,” in *Application of Microalgae in Wastewater Treatment*, Springer International Publishing, 2019, pp. 81–99. doi: 10.1007/978-3-030-13913-1\_5.
- [36] F. Tahir *et al.*, “Emerging trends in algae farming on non-arable lands for resource reclamation, recycling, and mitigation of climate change-driven food security challenges,” Sep. 01, 2024, *Springer Science and Business Media B.V.* doi: 10.1007/s11157-024-09697-0.
- [37] B. da Silveira Guimarães, K. B. França, D. F. de Sousa Santos, J. A. R. do Nascimento, and B. J. G. de Matos da Costa e Silva, “Production of microalgae in wastewater and brackish waters: kinetic, lipid content, bioremediation and cost analysis studies,” *Aqua Water Infrastructure, Ecosystems and Society*, vol. 73, no. 7, pp. 1406–1420, Jul. 2024, doi: 10.2166/aqua.2024.092.

- [38] K. Spilling Editor, "Biofuels from Algae Methods and Protocols Methods in Molecular Biology 1980." [Online]. Available: <http://www.springer.com/series/7651>
- [39] P. Benner, L. Meier, A. Pfeffer, K. Krüger, J. E. Oropeza Vargas, and D. Weuster-Botz, "Lab-scale photobioreactor systems: principles, applications, and scalability," May 01, 2022, *Springer Science and Business Media Deutschland GmbH*. doi: 10.1007/s00449-022-02711-1.
- [40] C. Toeroek, M. Cserjan-Puschmann, K. Bayer, and G. Striedner, "Fed-batch like cultivation in a micro-bioreactor: screening conditions relevant for Escherichia coli based production processes," *Springerplus*, vol. 4, no. 1, Dec. 2015, doi: 10.1186/s40064-015-1313-z.
- [41] O. Calicioglu and G. N. Demirer, "Biogas Production from Waste Microalgal Biomass Obtained from Nutrient Removal of Domestic Wastewater," *Waste Biomass Valorization*, vol. 7, no. 6, pp. 1397–1408, Dec. 2016, doi: 10.1007/s12649-016-9546-9.
- [42] E. Bolmanis, K. Dubencovs, A. Suleiko, and J. Vanags, "Model Predictive Control—A Stand Out among Competitors for Fed-Batch Fermentation Improvement," Mar. 01, 2023, *MDPI*. doi: 10.3390/fermentation9030206.
- [43] P. Geada, V. Vasconcelos, A. Vicente, and B. Fernandes, "Chapter 13- Microalgal Biomass Cultivation," *AlgalGreenChemistry*, pp. 257–284, Apr. 2017.
- [44] A. Novick and L. Szilard, "Description of the Chemostat," *Science (1979)*, 1950.
- [45] M. M. Arimi, J. Knodel, A. Kiprof, S. S. Namango, Y. Zhang, and S. U. Geißen, "Strategies for improvement of biohydrogen production from organic-rich wastewater: A review," Apr. 01, 2015, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.biombioe.2015.02.011.

- [46] A. P. Peter *et al.*, “Continuous cultivation of microalgae in photobioreactors as a source of renewable energy: Current status and future challenges,” Feb. 01, 2022, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.rser.2021.111852.
- [47] D. Herbert, R. Elsworth, and R. C. Telling, “The Continuous Culture of Bacteria; a Theoretical and Experimental Study.”
- [48] S. B. Hsu, ; S Hubbell, and ; P Waltman, “A Mathematical Theory for Single-Nutrient Competition in Continuous Cultures of Micro-Organisms,” 1977. [Online]. Available: <http://links.jstor.org/sici?sici=0036-1399%28197703%2932%3A2%3C366%3AAMTFSC%3E2.0.CO%3B2-H>
- [49] L. Smith and P. Waltman, “The Theory of the Chemostat: Dynamics of Microbial Competition,” *Cambridge University Press*, 1995.
- [50] R. A. Weusthuis, J. T. Pronk, P. J. A. Van Den Broek, and J. P. Van Dijkenl, “Chemostat Cultivation as a Tool for Studies on Sugar Transport in Yeasts,” 1994.
- [51] Y. Yao, “Dynamics of a delay turbidostat system with contois growth rate,” *Mathematical Biosciences and Engineering*, vol. 16, no. 1, pp. 56–77, 2019, doi: 10.3934/mbe.2019003.
- [52] B. Okumus, S. Yildiz, and E. Toprak, “Fluidic and microfluidic tools for quantitative systems biology,” Feb. 2014. doi: 10.1016/j.copbio.2013.08.016.
- [53] S. A. Hoffmann, C. Wohltat, K. M. Müller, and K. M. Arndt, “A user-friendly, low-cost turbidostat with versatile growth rate estimation

- based on an extended Kalman filter,” *PLoS One*, vol. 12, no. 7, Jul. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0181923.
- [54] N. Ziv, N. J. Brandt, and D. Gresham, “The use of chemostats in microbial systems biology,” *Journal of Visualized Experiments*, no. 80, Oct. 2013, doi: 10.3791/50168.
- [55] G. H. Markx, C. L. Davey, and D. B. Kell, “The permittostat: A novel type of turbidostat,” *J Gen Microbiol*, vol. 137, no. 4, pp. 735–743, 1991, doi: 10.1099/00221287-137-4-735.
- [56] D. Moore, G. D. Robson, and A. P. J. Trinci, *21st Century Guidebook to Fungi*. Cambridge University Press, 2000. doi: 10.1017/cbo9780511977022.
- [57] B. Wang, C. Q. Lan, and M. Horsman, “Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses,” Jul. 2012. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.01.019.
- [58] J. A. Vieira Costa, L. M. Colla, and P. F. Duarte Filho, “Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process,” *Bioresour Technol*, vol. 92, no. 3, pp. 237–241, 2004, doi: 10.1016/j.biortech.2003.09.013.
- [59] G. J. Sanchez, M. Breenguel, Rodriguez. F., JM. Fernàndez Sevilla, C. Brindley Alias, and F. Ación Fernàndez, “Minimization of carbon losses in pilot-scale outdoor photobioreactors by model-based predictive control,” *Biotechnol Bioeng.*, Dec. 2003.
- [60] R. Online, F. I. Hai, and K. Yamamoto, “Hai, F I. and Yamamoto, K: Membrane Biological Reactors,” 2011. [Online]. Available: <https://ro.uow.edu.au/scipapershttps://ro.uow.edu.au/scipapers/1130>

- [61] M. Ras, J. P. Steyer, and O. Bernard, “Temperature effect on microalgae: A crucial factor for outdoor production,” *Rev Environ Sci Biotechnol*, vol. 12, no. 2, pp. 153–164, Jun. 2013, doi: 10.1007/s11157-013-9310-6.
- [62] A. Kalinina *et al.*, “Study of the Influence of the Temperature and Time of Microalgae Cultivation on the Reproduction Rate of *Chlorella* and *Scenedesmus* Microalgae When Cultured in a Tubular Photobioreactor,” *Microbiol Res (Pavia)*, vol. 14, no. 4, pp. 2105–2112, Dec. 2023, doi: 10.3390/microbiolres14040142.
- [63] T. H. Mehlitz, “Temperature Influence and Heat Management Requirements of Microalgae Cultivation in Photobioreactors,” 2009.
- [64] Suh, I.S., Lee, and CG., “Photobioreactor engineering: Design and performance.,” *Biotechnol. BioprocessEng.*, pp. 313–321, Aug. 2003.
- [65] M. I. Khan, J. H. Shin, and J. D. Kim, “The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products,” Mar. 05, 2018, *BioMed Central Ltd.* doi: 10.1186/s12934-018-0879-x.
- [66] K. Watanabe and K. Fujii, “Isolation of high-level-CO<sub>2</sub>-preferring *Picochlorum* sp. strains and their biotechnological potential,” *Algal Res*, vol. 18, pp. 135–143, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.algal.2016.06.013.
- [67] S. Kang, H. H. Shin, and Z. Li, “The Discovery and Characterization of a Novel Microalgal Strain, *Picochlorum* sp. KCTC AG61293, with Potential for  $\alpha$ -Linolenic Acid Production,” *J Mar Sci Eng*, vol. 12, no. 2, Feb. 2024, doi: 10.3390/jmse12020245.

- [68] R. Barten *et al.*, “Genetic mechanisms underlying increased microalgal thermotolerance, maximal growth rate, and yield on light following adaptive laboratory evolution,” *BMC Biol*, vol. 20, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1186/s12915-022-01431-y.
- [69] Y. Zhu and N. T. Dunford, “Growth and biomass characteristics of *picochlorum oklahomensis* and *nannochloropsis oculata*,” *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists’ Society*, vol. 90, no. 6, pp. 841–849, Jun. 2013, doi: 10.1007/s11746-013-2225-0.
- [70] V. Amicarelli, A. Paiano, and L. Lobefaro, “Le microalghe nel settore dei biocombustibili. Sviluppo e sostenibilità,” *Università degli Studi di Bari Aldo Moro*, 2012.
- [71] A. Krishnan *et al.*, “*Picochlorum celeri* as a model system for robust outdoor algal growth in seawater,” *Sci Rep*, vol. 11, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-91106-5.
- [72] J. Clippinger and R. Davis, “Techno-Economic Analysis for the Production of Algal Biomass via Closed Photobioreactors: Future Cost Potential Evaluated Across a Range of Cultivation System Designs,” 2019. [Online]. Available: [www.nrel.gov/publications](http://www.nrel.gov/publications).
- [73] L. R. Dahlin and M. T. Guarnieri, “Development of the high-productivity marine microalga, *Picochlorum renovo*, as a photosynthetic protein secretion platform,” *Algal Res*, vol. 54, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.algal.2021.102197.
- [74] E. Santigosa, F. Brambilla, and L. Milanese, “Microalgae oil as an effective alternative source of epa and dha for gilthead seabream (*Sparus aurata*) aquaculture,” *Animals*, vol. 11, no. 4, Apr. 2021, doi: 10.3390/ani11040971.



- [75] A. J. LaPanse *et al.*, “Proximate biomass characterization of the high productivity marine microalga *Picochlorum celeri* TG2,” *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 207, Feb. 2024, doi: 10.1016/j.plaphy.2024.108364.
- [76] A. P. Lopes, F. M. Santos, T. F. C. V. Silva, V. J. P. Vilar, and J. C. M. Pires, “Outdoor cultivation of the microalga *Chlorella vulgaris* in a new photobioreactor configuration: The effect of ultraviolet and visible radiation,” *Energies (Basel)*, vol. 13, no. 8, Apr. 2020, doi: 10.3390/en13081962.
- [77] W. A. Wan Razali and J. Pandhal, “Outdoor pilot-scale cultivation and techno economic assessment of a novel omega-3 eicosapentaenoic acid over-producing *Nannochloropsis oculata* strain,” *Bioresour Technol Rep*, vol. 24, Dec. 2023, doi: 10.1016/j.biteb.2023.101682.
- [78] Z. Wu *et al.*, “Outdoor cultivation of *Dunaliella salina* KU 11 using brine and saline lake water with raceway ponds in northeastern Thailand,” *Biotechnol Appl Biochem*, vol. 64, no. 6, pp. 938–943, Nov. 2017, doi: 10.1002/bab.1537.
- [79] C. Jiménez, B. R. Cossío, D. Labella, and F. X. Niell, “The Feasibility of industrial production of *Spirulina* (*Arthrospira*) in Southern Spain.” [Online]. Available: [www.elsevier.com/locate/aqua-online](http://www.elsevier.com/locate/aqua-online)
- [80] L. R. Dahlin *et al.*, “Development of a high-productivity, halophilic, thermotolerant microalga *Picochlorum renovo*,” *Commun Biol*, vol. 2, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s42003-019-0620-2.
- [81] F. Foflonker *et al.*, “The unexpected extremophile: Tolerance to fluctuating salinity in the green alga *Picochlorum*,” *Algal Res*, vol. 16, pp. 465–472, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.algal.2016.04.003.

- [82] T. Bradley, “Microalgae As a Green source for Nutritional Ingredients for Food/Feed and Ingredients for Cosmetics by cost-Effective New Technologies Grant Agreement: 745754 D 4.2-LCA Goal and Scope.”
- [83] D. L. Restrepo-Serna, M. Ortiz-Sánchez, and C. A. Cardona-Alzate, “Biofuels from Microalgae: Energy and Exergy Analysis for the Biodiesel Case,” in *Green Energy and Technology*, vol. 0, no. 9783319690926, Springer Verlag, 2018, pp. 181–200. doi: 10.1007/978-3-319-69093-3\_9.
- [84] B. C. Klein, R. E. Davis, and L. M. L. Laurens, “Quantifying the intrinsic value of algal biomass based on a multi-product biorefining strategy,” *Algal Res*, vol. 72, May 2023, doi: 10.1016/j.algal.2023.103094.
- [85] T. N. D. Cao *et al.*, “Roles of microalgae-based biofertilizer in sustainability of green agriculture and food-water-energy security nexus,” Apr. 20, 2023, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.161927.
- [86] S. K. Joshi and A. K. Gauraha, “Global biofertilizer market: Emerging trends and opportunities,” in *Trends of Applied Microbiology for Sustainable Economy*, Elsevier, 2022, pp. 689–697. doi: 10.1016/B978-0-323-91595-3.00024-0.
- [87] A. M. Miranda, F. Hernandez-Tenorio, F. Villalta, G. J. Vargas, and A. A. Sáez, “Advances in the Development of Biofertilizers and Biostimulants from Microalgae,” Mar. 01, 2024, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/biology13030199.
- [88] L. Barsanti and P. Gualtieri, “Is exploitation of microalgae economically and energetically sustainable?,” Apr. 01, 2018, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.algal.2018.02.001.

- [89] “From raw microalgae to bioplastics: conversion of *Chlorella vulgaris* starch granules into thermoplastic starch”, doi: 10.1101/2024.04.17.589749.
- [90] “Starch Based Bioplastic Market Size, Share, Growth Analysis, By Technology (Thermoplastic starch, blends, coatings, nanocomposites), By Application (packaging, agriculture, textiles, medical),” Region Industry Forecast 2024-2021.
- [91] R. R. L. Guillard and J. H. Ryther, “Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella Nana* husted, and *Detonula Confervacea* (cleve) gran,” *Can J Microbiol*, pp. 29–60, Apr. 1962.
- [92] D. Marchese, “Adattamento cromatico in consorzi microalgali come strategia per aumentare l’efficienza di conversione energetica di fotobioreattori LED,” Università degli Studi di Padova, Padova, 2022.
- [93] A. Einhaus, J. Steube, R. A. Freudenberg, J. Barczyk, T. Baier, and O. Kruse, “Engineering a powerful green cell factory for robust photoautotrophic diterpenoid production,” *Metab Eng*, vol. 73, pp. 82–90, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.ymben.2022.06.002.
- [94] F. Derwenskus *et al.*, “Coproduction of EPA and Fucoxanthin with *P. tricornutum* – A Promising Approach for Up- and Downstream Processing,” *Chem Ing Tech*, vol. 92, no. 11, pp. 1780–1789, Nov. 2020, doi: 10.1002/cite.202000046.
- [95] CellDEG GmbH, “Enhancing photoautotrophic growth, patented membrane bioreactors.”
- [96] G. Torzillo and A. Vonshak, “Environmental Stress Physiology with Reference to Mass Cultures,” in *Handbook of Microalgal Culture:*

*Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition*, Wiley, 2013, pp. 90–113. doi: 10.1002/9781118567166.ch6.

- [97] W. Blanken, M. Cuaresma, R. H. Wijffels, and M. Janssen, “Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost,” Oct. 2013. doi: 10.1016/j.algal.2013.09.004.
- [98] L. Borella, D. Diotto, E. Barbera, D. Fiorimonte, E. Sforza, and N. Trivellin, “Application of flashing blue-red LED to boost microalgae biomass productivity and energy efficiency in continuous photobioreactors,” *Energy*, vol. 259, Nov. 2022, doi: 10.1016/j.energy.2022.125087.
- [99] P. S. C. Schulze *et al.*, “Flashing light does not improve photosynthetic performance and growth of green microalgae,” *Bioresour Technol Rep*, vol. 9, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.biteb.2019.100367.
- [100] S. Abu-Ghosh, D. Fixler, Z. Dubinsky, and D. Iluz, “Flashing light in microalgae biotechnology,” Mar. 01, 2016, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.biortech.2015.12.057.
- [101] D. Diotto, “Improving algal biomass productivity under high frequency pulsed light in a LED- photobioreactor: experiments and modeling,” Università degli Studi di Padova, Padova, 2021.
- [102] Vetrotecnica S.r.l., “Camera Burkner.”
- [103] G. G. Zaines and V. Khanna, “Microalgal biomass production pathways: Evaluation of life cycle environmental impacts,” *Biotechnol Biofuels*, vol. 6, no. 1, 2013, doi: 10.1186/1754-6834-6-88.

- [104] E. Sforza, S. Urbani, and A. Bertucco, "Evaluation of maintenance energy requirements in the cultivation of *Scenedesmus obliquus*: effect of light intensity and regime," *J Appl Phycol*, vol. 27, no. 4, pp. 1453–1462, Jan. 2015, doi: 10.1007/s10811-014-0460-x.
- [105] "The maintenance energy of bacteria in growing cultures 225." [Online]. Available: <https://royalsocietypublishing.org/>
- [106] A. M. J. Kliphuis, A. J. Klok, D. E. Martens, P. P. Lamers, M. Janssen, and R. H. Wijffels, "Metabolic modeling of *Chlamydomonas reinhardtii*: Energy requirements for photoautotrophic growth and maintenance," *J Appl Phycol*, vol. 24, no. 2, pp. 253–266, Apr. 2012, doi: 10.1007/s10811-011-9674-3.
- [107] P. Van Bodegom, "Microbial maintenance: A critical review on its quantification," May 2007. doi: 10.1007/s00248-006-9049-5.
- [108] L. Borella, D. Ortolan, E. Barbera, N. Trivellin, and E. Sforza, "A multiwavelength model to improve microalgal productivity and energetic conversion in a red-blue light emitting diodes (LEDs) continuous photobioreactor," *Energy Convers Manag*, vol. 243, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.enconman.2021.114330.
- [109] E. A. Meijer and R. H. Wijffels, "Develop of a fast, reproducible and effective method for the extraction and quantification of proteins of micro-algae," *BiotechnologyTechniques*, vol. 12, pp. 353–358, May 1998.
- [110] D. Luzon Morris, "Quantitative Determination of Carbohydrates With Dreywood's Anthrone Reagent," *Science (1979)*, vol. 107, pp. 254–255, 1948.

- [111] R. Moran and D. Porath, "Chlorophyll Determination in Intact Tissues Using N,N-Dimethylformamide," 1980.
- [112] D. Sarala Thambavani and M. M. A. Sabitha, "THE SPECTRAL DETERMINATION OF CHLOROPHYLLS A, B AND TOTAL CAROTENOIDS USING VARIOUS SOLVENTS FOR TREE SPECIES GROWING NEAR SUGAR MILL Associate professor, Department of chemistry, Sri Meenakshi Government Arts College for Women (Autonomous), Madurai-625 002. E-mail: sarala\_dr@yahoo.in."
- [113] R. A. Fisher, *The Design of Experiments*, 1st ed. Adelaide, 1935.
- [114] A. Krishnan *et al.*, "Picochlorum celeri as a model system for robust outdoor algal growth in seawater," *Sci Rep*, vol. 11, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-91106-5.
- [115] J. C. Weissman *et al.*, "High-light selection produces a fast-growing Picochlorum celeri," *Algal Res*, vol. 36, pp. 17–28, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.algal.2018.09.024.
- [116] R. Chin-On *et al.*, "Outdoor cultivation of Picochlorum sp. in a novel V-shaped photobioreactor on the Caribbean island Bonaire," *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 12, 2024, doi: 10.3389/fbioe.2024.1347291.
- [117] N. Wallace-Springer, D. E. Wells, J. M. Pickens, E. Ayipio, and J. Kemble, "Effects of Hydraulic Retention Time of Aquaculture Effluent on Nutrient Film Technique Lettuce Productivity," *Agronomy*, vol. 12, no. 10, Oct. 2022, doi: 10.3390/agronomy12102570.
- [118] L. Borella, E. Sforza, and A. Bertucco, "An internally LED illuminated photobioreactor to increase energy conversion efficiency:

- Design and operation,” *Energy Convers Manag*, vol. 270, Oct. 2022, doi: 10.1016/j.enconman.2022.116224.
- [119] E. Sforza, C. Calvaruso, A. Meneghesso, T. Morosinotto, and A. Bertucco, “Effect of specific light supply rate on photosynthetic efficiency of *Nannochloropsis salina* in a continuous flat plate photobioreactor,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 99, no. 19, pp. 8309–8318, Oct. 2015, doi: 10.1007/s00253-015-6876-7.
- [120] B. Wang and J. Jia, “Photoprotection mechanisms of *Nannochloropsis oceanica* in response to light stress,” *Algal Res*, vol. 46, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.algal.2019.101784.
- [121] G. P. Singh, M. Kumar, and J. Kulshreshtha, “Growth and biopigment accumulation of cyanobacterium *Spirulina platensis* at different light intensities and temperature,” *Article in Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 42, pp. 1128–1135, 2011, doi: 10.1590/S1517-838220110003000034.
- [122] N. K. Sarker and P. A. Salam, “Indoor and outdoor cultivation of *Chlorella vulgaris* and its application in wastewater treatment in a tropical city—Bangkok, Thailand,” *SN Appl Sci*, vol. 1, no. 12, Dec. 2019, doi: 10.1007/s42452-019-1704-9.
- [123] G. Khawam *et al.*, “Simulation of shading and algal growth in experimental raceways,” *Algal Res*, vol. 41, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.algal.2019.101575.
- [124] J. Gonzalez-Camejo, A. Viruela, M. V. Ruano, R. Barat, A. Seco, and J. Ferrer, “Dataset to assess the shadow effect of an outdoor microalgae culture,” *Data Brief*, Apr. 2019.

- [125] A. Saccardo, F. Bezzo, and E. Sforza, “Microalgae growth in ultra-thin steady-state continuous photobioreactors: assessing self-shading effects,” *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 10, Aug. 2022, doi: 10.3389/fbioe.2022.977429.
- [126] X. Ji, L. Webster, T. J. Wass, and P. M. Schenk, “Cultivation Techniques to Induce High-Value Nutraceuticals in Microalgae,” in *Algal Functional Foods and Nutraceuticals: Benefits, Opportunities, and Challenges*, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, 2022, pp. 29–44. doi: 10.2174/9789815051872122010006.
- [127] D. Marchese, E. Sforza, and L. Borella, “Adattamento cromatico in consorzi microalgali come strategia per aumentare l’efficienza di conversione energetica di fotobioreattori LED,” Università degli Studi di Padova, Padova, 2022.
- [128] M. I. Sánchez-Contreras, S. Morales-Arrieta, P. U. Okoye, R. A. Guillén-Garcés, P. J. Sebastian, and D. M. Arias, “Recycling industrial wastewater for improved carbohydrate-rich biomass production in a semi-continuous photobioreactor: Effect of hydraulic retention time,” *J Environ Manage*, vol. 284, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.jenvman.2021.112065.
- [129] N. A. ElNaker, A. F. Yousef, and S. W. Hasan, “Effect of hydraulic retention time on microbial community structure in wastewater treatment electro-bioreactors,” *Microbiologyopen*, vol. 7, no. 4, Aug. 2018, doi: 10.1002/mbo3.590.
- [130] Y. Maltsev, K. Maltseva, M. Kulikovskiy, and S. Maltseva, “Influence of light conditions on microalgae growth and content of lipids, carotenoids, and fatty acid composition,” Oct. 01, 2021, *MDPI*. doi: 10.3390/biology10101060.



- [131] S. H. Ho, P. J. Li, C. C. Liu, and J. S. Chang, “Bioprocess development on microalgae-based CO<sub>2</sub> fixation and bioethanol production using *Scenedesmus obliquus* CNW-N,” *Bioresour Technol*, vol. 145, pp. 142–149, 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2013.02.119.
- [132] E. W. Becker, “Micro-algae as a source of protein,” Mar. 2007. doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.11.002.
- [133] S. Feng *et al.*, “Role of hydraulic retention time in integration of microalgae and activated sludge process for nutrient recycle from diluted dairy liquid digestate,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 484, Mar. 2024, doi: 10.1016/j.cej.2024.149538.
- [134] M. Paper *et al.*, “Efficient Green Light Acclimation of the Green Algae *Picochlorum* sp. Triggering Geranylgeranylated Chlorophylls,” *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 10, Apr. 2022, doi: 10.3389/fbioe.2022.885977.
- [135] S. H. Ho, C. Y. Chen, and J. S. Chang, “Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N,” *Bioresour Technol*, vol. 113, pp. 244–252, Jun. 2012, doi: 10.1016/j.biortech.2011.11.133.
- [136] R. Songserm, Y. Nishiyama, and N. Sanevas, “Light Influences the Growth, Pigment Synthesis, Photosynthesis Capacity, and Antioxidant Activities in *Scenedesmus falcatus*,” *Scientifica (Cairo)*, vol. 2024, 2024, doi: 10.1155/2024/1898624.
- [137] J. González-Camejo, A. Viruela, M. V. Ruano, R. Barat, A. Seco, and J. Ferrer, “Effect of light intensity, light duration and photoperiods in the performance of an outdoor photobioreactor for urban wastewater

- treatment,” *Algal Res*, vol. 40, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.algal.2019.101511.
- [138] C. E. de Farias Silva and E. Sforza, “Carbohydrate productivity in continuous reactor under nitrogen limitation: Effect of light and residence time on nutrient uptake in *Chlorella vulgaris*,” *Process Biochemistry*, vol. 51, no. 12, pp. 2112–2118, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.procbio.2016.09.015.
- [139] M. Cano, D. A. J. Karns, J. C. Weissman, M. L. Heinnickel, and M. C. Posewitz, “Pigment modulation in response to irradiance intensity in the fast-growing alga *Picochlorum celeri*,” *Algal Res*, vol. 58, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.algal.2021.102370.
- [140] M. Pierangelini, S. Stojkovic, P. T. Orr, and J. Beardall, “Photo-acclimation to low light—Changes from growth to antenna size in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*,” *Harmful Algae*, vol. 46, pp. 11–17, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.hal.2015.04.004.
- [141] F. A. Gorrini *et al.*, “Experimental study of substrate limitation and light acclimation in cultures of the microalgae *Scenedesmus obliquus*—Parameter identification and model predictive control,” *Processes*, vol. 8, no. 12, pp. 1–23, Dec. 2020, doi: 10.3390/pr8121551.
- [142] T. E. Van Den Berg, V. U. Chukhutsina, H. Van Amerongen, R. Croce, and B. Van Oort, “Light acclimation of the colonial green alga *botryococcus braunii* strain showa,” *Plant Physiol*, vol. 179, no. 3, pp. 1132–1143, Mar. 2019, doi: 10.1104/pp.18.01499.
- [143] M. E. Morales-Plasencia, L. Ibarra-Castro, J. M. Martínez-Brown, M. Nieves-Soto, J. F. Bermúdez-Lizárraga, and A. H. Rojo-Cebreros, “The effect of nitrogen limitation on carbohydrates and  $\beta$ -glucan

- accumulation in *Nannochloropsis oculata*,” *Algal Res*, vol. 72, May 2023, doi: 10.1016/j.algal.2023.103125.
- [144] P. Bondioli *et al.*, “Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 and *Tetraselmis suecica* F&M-M33,” *Bioresour Technol*, vol. 114, pp. 567–572, Jun. 2012, doi: 10.1016/j.biortech.2012.02.123.
- [145] I. Brányiková *et al.*, “Microalgae-novel highly efficient starch producers,” *Biotechnol Bioeng*, vol. 108, no. 4, pp. 766–776, Apr. 2011, doi: 10.1002/bit.23016.
- [146] A. Çoban, G. Kendirlioğlu Şimşek, and A. Kadri, “Effect of Nitrogen Source on Growth and Protein and Lipid Amounts of a Freshwater Microalga *Scenedesmus acutus*,” 2021.
- [147] L. Liang, Z. Wang, Y. Ding, Y. Li, and X. Wen, “Protein reserves elucidate the growth of microalgae under nitrogen deficiency,” *Algal Res*, vol. 75, Sep. 2023, doi: 10.1016/j.algal.2023.103269.
- [148] A. F. Esteves, E. M. Salgado, V. J. P. Vilar, A. L. Gonçalves, and J. C. M. Pires, “A growth phase analysis on the influence of light intensity on microalgal stress and potential biofuel production,” *Energy Convers Manag*, vol. 311, Jul. 2024, doi: 10.1016/j.enconman.2024.118511.

## RINGRAZIAMENTI

La conclusione di un percorso così importante è un'emozione grande perché sembra quasi irrealmente riuscire a raggiungere obiettivi che all'epoca, alla veneranda età di 12 anni, erano solo grandi ambizioni, lontane e difficili da raggiungere.

È un'emozione sapere che, nonostante giudizi contrari e scettici dei professori delle medie, sono riuscito a concludere sia il percorso liceale che di laurea triennale che di magistrale cercando di eccellere il più possibile, senza mai arrendermi.

In questi lunghi anni ho incontrato molte persone, che mi hanno insegnato tante cose e regalato molte emozioni, facendomi crescere e diventare la persona che sono adesso.

In primis, per la gentile disponibilità che mi è stata concessa di lavorare nel suo laboratorio di *Bioprocess engineering*, ci terrei a ringraziare la prof.ssa Eleonora Sforza, che mi ha dato l'opportunità di crescere professionalmente e umanamente durante la stesura della mia tesi. Un sincero ringraziamento va anche al dott. Danilo Marchese, per la sua preziosa guida, la disponibilità, nonostante i suoi impegni accademici, e il supporto costante durante tutti gli esperimenti e l'elaborazione dei dati.

Inoltre, ci terrei a ringraziare le persone che in questi lunghi anni di università, e di vita, ora mi vedono concludere un traguardo importante. In particolare, ci terrei a ringraziare la mia mamma Laura e il mio papà Luigi per essere stati sempre costanti nel supporto affettivo, economico e burocratico nel farmi raggiungere questo obiettivo, senza mai farmi mancare nulla. Successivamente un ringraziamento va a mio fratello Davide e Pierluigi per l'ausilio che mi hanno dato. Vorrei ringraziare anche mia nonna MariaTeresa per avermi preparato cibi sempre molto buoni durante le pause pranzo dopo le lezioni e per avermi dedicato molto tempo per l'insegnamento del latino al liceo (*Hoc hopus hic labor est*).

Vorrei ringraziare Chiara per aver condiviso con me dei bei momenti di studio e di vita e, nonostante le divergenze, essersi interessata quotidianamente alla mia salute, ai miei studi e avermi fatto crescere.

La ringrazio per avermi dedicato il suo tempo, nonostante in questo periodo ne abbia poco, e per aver accettato i miei consigli e aiuti per affrontare gli esami

all'università, e per averne dati anche lei a me essendo sempre molto aggiornata in ambito informatico.

Inoltre, ci terrei a ringraziare anche tutte le persone che in questi nove mesi di tesi sperimentale hanno lavorato insieme a me in laboratorio, Danilo, Agnese, Veronica L., Veronica B., Cecilia, Adriano, Nicolò, Giulia e Matteo, facendomi divertire e appassionare al lavoro. In particolare, ringrazio Giulia con cui ho condiviso quotidianamente le pause caffè e brioche per parlare degli esperimenti e dei gossip. Inoltre, avrei piacere di ringraziare i miei amici, in particolare quelli che conosco da più tempo, ovvero il Real United, Nicolò, Daniele, Andrea, Nicolas e Riccardo, che da un semplice gruppo di ragazzi, che si riuniva ogni sabato per giocare a calcio in patronato di Montegrotto Terme, è diventato un gruppo di amici che continuano a vedersi costantemente. Tra questi vorrei ringraziare Andrea in particolare per aver condiviso con me, nelle sue mattine sul treno per andare a Padova, i suoi problemi relativi al mondo del lavoro e all'agognata attesa del venerdì pomeriggio per il meritato riposo.

Ci terrei a ringraziare anche i miei amici del gruppo vacanze di Zuel, in particolare Alberto, Dereje, Federico, Eleonora F., Eleonora T, Silvia, Ilaria e Noemi, che mi hanno permesso di vivere esperienze e avventure indimenticabili, adattandosi senza problemi ai pochi comfort e al poco denaro disponibile pur di stare insieme e viaggiare in ogni dove. In particolare, ci terrei a ringraziare Eleonora T. (anche detta "mamma di Sole") per il costante supporto settimanale da due anni ormai come amica per parlare di problematiche e condividere il bello delle novità quotidiane.

Ci terrei a ringraziare anche le mie amiche Greta T. e Greta P. per avermi permesso di uscire con loro e aver passato delle belle serate piene di divertimento e risate sui muretti di Prato della Valle, ad aperitivi e sagre a parlare e divertirsi, condividendo pareri, novità, racconti e meme.

Vorrei ringraziare anche il gruppo di amici che ho avuto il piacere e la felicità di conoscere in questo ultimo anno di lavoro alla Despar, in particolare Alessia, Francesca, Luca, Edoardo e Matteo, li ringrazio per avermi fatto passare ore lavorative con divertimento. E da semplici colleghi ormai a gruppo di uscite che si ritrova per bere, per giocare a calcetto e per raccontarsi le novità della vita. Ci terrei a ringraziare anche alcuni colleghi che mi hanno sempre aiutato e alleggerito il

lavoro grazie alla loro personalità, in particolare Vanda, Debora, Giacomo Z. e Giacomo D.

Infine, nonostante siano stati anni molto intensi, ci terrei a ringraziare quelle persone che ho incontrato all'interno dell'ambito universitario, in particolare i miei compagni di classe del gruppo "Micini Bacini", con cui ho fatto esami, lavori di gruppo, uscite e vacanze verso terre lontane. In particolare, ci terrei a ringraziare Emilia per avermi sempre fatto da psicologa, Eugenio e Gianmarco per aver condiviso con me le pause alle macchinette del Botta e avermi sempre fatto molto ridere quando si parlava insieme.

Grazie mille a tutti.